

**Charakterisierung und Anwendung von
Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) als therapeutisches System für
die Zell- und Gentherapie von Pankreaskrebs**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der

Fakultät für Biologie

der

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

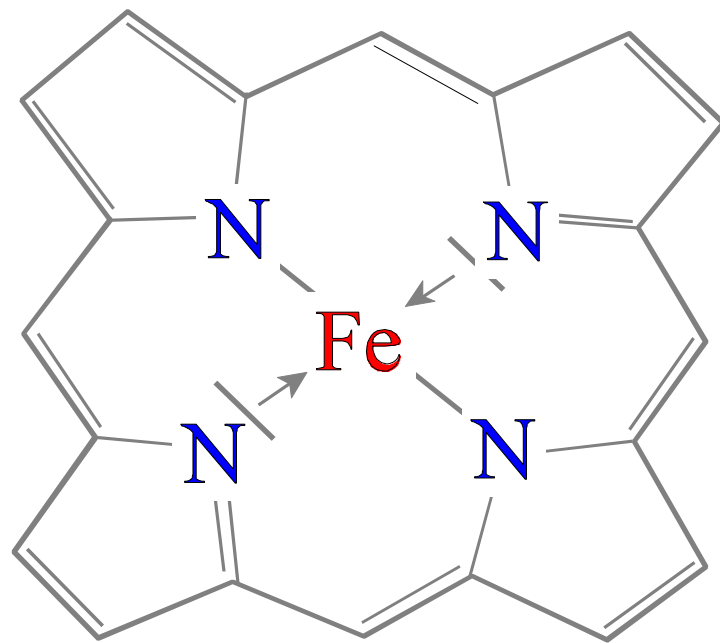
vorgelegt von

Peter Karle

aus Nürnberg

September 2000

Promotionsgesuch eingereicht am: 20. September 2000
Die Arbeit wurde angeleitet von: Dr. habil. Brian Salmons
Prüfungsausschuß: Dr. habil. Brian Salmons (Erstgutachter)
Prof. Dr. Horst Schmieger (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Walter H. Günzburg (Sondergutachter)
Prof. Dr. Elisabeth H. Weiß
Prof. Dr. Jürgen Ebel
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2000



**Meinen Eltern
und
meiner Jessy**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biologie des Pankreas	1
1.1.1 Anatomie des Pankreas	1
A Endokrines Pankreas (Inselorgan)	1
B Exokrines Pankreas (Bauschspeicheldrüse)	2
1.1.2 Neoplastische Veränderungen des exokrinen Pankreas	3
1.1.3 Genetische Veränderungen während der Tumorgenese	3
1.2 Therapeutische Konzepte für Tumorerkrankungen	6
A <i>Antisense</i> -Nukleinsäuren	7
C Das Immunsystem stimulierende Gene	8
D Zellzyklusregulatorgene	10
E Suizidgene	10
1.3 Transportsysteme für DNA	15
1.3.1 Nicht-virale Transfervehikel	15
A Liposomen	15
B Zellen	16
i Autologe Zellen	16
ii Allogene Zellen	17
iii Zellen in einer immunoprotektiven Umgebung	17
1.4 Virale Transfervehikel	18
1.4.1 Adenovirale Vektorsysteme	18
1.4.2 Adenoassoziierte Vektorsysteme	19
1.4.3 Herpesvirale Vektorsysteme	19
1.4.4 Retrovirale Vektorsysteme	20
A Retroviren	20
B Retrovirale Vektoren	23
C Verpackungssysteme	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	30
2.1.2 Medien und Zusätze	32
2.1.3 Antikörper	33
2.1.4 Oligonukleotide	33

A Sequenzierprimer	33
B PCR-Primer	34
2.1.5 Enzyme	34
2.1.6 Nukleinsäuren und Plasmide	34
2.1.7 Bakterien	35
2.1.8 Zelllinien	35
2.1.9 Mäuse	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Mäuse	38
A Haltung von Mäusen	38
B Etablierung von Tumoren	38
C Rekultivierung von Tumoren	38
2.2.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen	39
A Kultivierung	40
B Passagieren von Zellen	40
C Einfrieren von Zellen	40
D Auftauen von Zellen	41
E Transfektion von Zellen	41
i Kalziumphosphat-Kopräzipitation	41
ii Lipofektion	42
F Infektionen	43
i Mediumtransfer	43
ii Titerbestimmung	44
G Selektionsmethoden	44
i HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Selektion (Littlefield, 1964)	44
ii G418-Selektion	45
iii HMX (Hypoxanthin-Mycophenolsäure-Xanthin)-Selektion	46
iv Zeozin TM /Phleomycin-Selektion	47
H Isolierung von Klonen	47
I Färbemethoden	48
i Mycoplasmenfärbung	48
ii Giemsa-Färbung	48
iii Trypanblaufärbung	49
J Zählen von Zellen	49

2.2.3 Methoden zum Nachweis von Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) Aktivität	49
A Resorufin-Test	50
B Cytotoxizitätstest	51
C Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen	52
i Kokultivierung mit β -Galactosidase exprimierenden Zellen	52
ii Kokultivierung mit egfp exprimierenden Zellen	52
iii <i>Transwell System</i>	54
iv Nachweis einer IFO-Aktivierung durch verkapselte Zellen	54
2.2.4 Durchflusscytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> = FACS)	55
2.2.5 Molekularbiologische Methoden	56
A Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Guanidiniumisothiocyanat („Guano“)	56
B Analyse von DNA	57
i Restriktionsverdau	57
ii Gelanalyse	58
C Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	58
2.2.6 Klonierungsmethoden	59
A Präparation von DNA-Fragmenten	59
i Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	59
ii DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen (Qiaquick Gel extraction, Qiagen)	59
B Aufreinigung von DNA-Fragmenten	60
i Phenolextraktion	60
ii Aufreinigung mit dem <i>Nucleotide Removal Kit</i> (Qiagen)	60
C Enzymatische Modifikationen von DNA-Enden	61
i „ <i>Blunt end</i> “ Reaktion	61
ii Dephosphorylierung des Vektors	61
iii Ligation	62
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	62
A Photometrische Bestimmung	62
B Konzentrationsabschätzung im Agarosegel	63
2.2.8 Doppelstrang-Sequenzierung von Plasmiden	63
A Aufreinigung der DNA	64
B Sequenzierreaktion („ <i>cycle-sequencing</i> “)	64
C Aufreinigung der Sequenzierreaktion	65
D Elektrophorese der Sequenzierreaktion	65

2.2.9	Mikrobiologische Techniken	65
	A Transformation von DNA in kompetente Zellen	65
	i Rubidium-Chlorid Methode (Hanahan, 1983)	65
	ii Hitzeschock-Transformation (Cohen et al., 1972)	66
	iii Aufreinigung und Elektroporation	67
	iv Herstellung von Selektionsplatten	68
	B Schnellpräparation von Plasmid DNA (Minipräp)	78
	C Großpräparation von Plasmid DNA mit dem Qiagen Kit (Maxipräp)	69
	D Einfrieren und Auftauen von Bakterien	71
2.2.10	Proteinchemische Analysen	71
	A Western Blot	71
	i Extraktion von Membranproteinen	71
	ii Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	72
	iii Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper	74
	B Unspezifischer Proteinnachweis nach Commassie	77
	C Proteinbestimmung nach Lowry (Biorad)	78
	D Färbung von β -Galactosidase exprimierenden Zellen (Cepko et al., 1993)	78
2.2.11	Nachweis von Zellmembranveränderungen mittels Annexin V/Propidiumiodid	79
2.2.12	Elektronenmikroskopie	81
	A Behandlung der Zellen <i>in vitro</i>	82
	B Chemische Fixierung	82
	i Fixierung von Proteinen	82
	ii Fixierung von Lipiden	83
	C Dehydration mittels Alkohol	83
	D Einbettung	83
	E Semidünnschnitte	84
	F Ultradünnschnitte	85
	G Kontrastierung	85
	H Transmissionselektronenmikroskopische Analyse	86
2.2.13	Kapseln	87
2.2.14	EDV technische Methoden	87
	A Klonierungsstrategien	87
	B <i>Primer</i> -Suche	87
	C Auswertung von Sequenzen	87
	D Darstellung von experimentellen Daten	88

3 Ergebnisse	89
3.1 Konstruktion CYP2B1-exprimierender Zellen	89
3.1.1 Klonierung eines nicht-viralen CYP2B1-Expressionsvektors	89
3.1.2 Herstellung von stabil CYP2B1-exprimierenden Zellklonen	90
A Nachweis der Kontinuität der CYP2B1-Expressionskassette mittels PCR	90
B Nachweis des CYP2B1-Proteins mittels Western Blot	91
C Nachweis der biochemischen Aktivität von exprimierten CYP2B1	93
3.2 Nachweis der CYP2B1-abhängigen Aktivierung von Oxazaphosphorinen <i>in vitro</i>	94
3.2.1 Suizideffekte bei CrFK-Zellen	95
3.2.2 Wirkung auf benachbarte nicht CYP2B1-exprimierende Zellen („ <i>bystander effect</i> “)	99
A Wirkung auf Zellen gleichen Ursprungs	99
B <i>Bystander Effect</i> auf endokrine pankreatische Tumorzelllinien ..	101
i Quantifizierung des <i>bystander effect</i> auf exocrine Pankreaskarzinomzellen	103
ii <i>Bystander Effect</i> auf A20	106
iii Nachweis von frei diffundierbaren aktiven Metaboliten („ <i>Transwell System</i> “)	108
3.2.3 Nachweis des Wirkmechanismus von aktiviertem Ifosfamid	109
A Nachweis von Veränderungen der Zellmembran und der zellulären Beschaffenheit	110
B Morphologische Veränderungen von IFO behandelten Zellen ...	113
3.2.4 Zellvermittelte Therapie von Pankreastumoren <i>in vivo</i>	117
A Enkapsulierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen	117
B Behandlung von xenotransplantierten pankreatische Tumoren in Nacktmäusen	119
3.3 Zellvermittelte intratumorale IFO-Aktivierung beim Menschen	121
3.3.1 Herstellung humaner IFO-aktivierender Zellen	121
3.3.2 Identifizierung von Klonen mit intakter CYP2B1	122
3.3.3 Messung der CYP2B1-Aktivität in isolierten 293-Zellklonen	124
3.3.4 Nachweis der Integration von pc3/2B1 in 22P1G-Zellen	126
3.3.5 Cytostatische und cytotoxische Wirkung von IFO auf 22P1G-Zellen	128
A Nachweis der CYP2B1-Aktivität in Kapseln	130
B Injektion von enkapsulierten Zellen in das porcine Pankreas ...	131
3.4 Retrovirus vermittelte IFO-Aktivierung	134
3.4.1 Eigenschaften einer Retrovirus vermittelten Aktivierung <i>in vitro</i> ...	134

A Bestimmung der Infizierbarkeit von pankreatischen Tumorzellen	135
B Konstruktion eines CYP2B1 transduzierenden Vektors	136
C Herstellung LCSN produzierender Verpackungszelllinien	137
D Etablierung eines „High Producers“	138
E Toxizität von Ifosfamid auf pankreatische Tumorzellen nach endogener Aktivierung	139
F Semiquantitative Bestimmung der MLV-Promotoraktivität in infizierten Zelllinien	141
G Nachweis des CYP2B1-Proteins in infizierten Zelllinien	143
H Kombination von endogener und exogener IFO-Aktivierung	144
3.4.2 Wirksamkeit der Retrovirus vermittelten Aktivierung von IFO <i>in vivo</i>	145
A Etablierung eines geeigneten Tiermodells	145
B Wachstumscharakteristik von PAN02-Tumoren in C57Black	147
C Virusvermittelte Aktivierung von Ifosfamid in C57Black/6-Mäusen	148
4 Diskussion	152
4.1 Zelltherapeutische Behandlung	152
4.1.1 Etablierung und Analyse CYP2B1 produzierender Zellklone	152
A Suizideffekte	157
B <i>Bystander effect</i>	159
i <i>Bystander effect</i> auf Zellen gleichen Ursprungs	159
ii <i>Bystander effect</i> auf pankreatische Tumorzellen	159
4.1.3 Mechanismus des <i>bystander effects</i>	161
4.1.4 Mechanismus des Zelltod	161
4.1.5 Verkapselung von Zellen	166
4.1.6 Klinische Studie	167
4.2 IFO-Behandlung mit retroviralem CYP2B1	170
4.2.1 Retroviraler Gentransfer in Tumorzellen	171
4.2.2 Wirkung einer intrazellulären IFO-Aktivierung	173
4.2.3 Wirkung einer Retrovirus vermittelte CYP2B1/IFO-Behandlung <i>in vivo</i>	176
5 Zusammenfassung	180
6 Literaturverzeichnis	182

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	209
7.1 Tabellen	209
7.1.1 Einleitung	209
7.1.2 Material und Methoden	209
7.1.3 Ergebnisse	209
7.1.4 Diskussion	209
7.2 Abbildungen	213
7.2.1 Einleitung	210
7.2.2 Material und Methoden	210
7.2.3 Ergebnisse	210
7.2.4 Diskussion	212
7.2.5 Anhang	212
8 Abkürzungsverzeichnis	213
9 Anhang	216
9.1 Klonierung von CYP2B1 in Expressionsvektoren	216
9.1.1 Konstruktion von pc3/2B1	216
9.1.2 Konstruktion von pLCSN	216
9.2 Weitere verwendete Plasmide	219
9.2.1 pLXlacZ	219
9.2.2 pLXSN und pLXSNegfp	219
9.2.3 pCMVegfp	220
10 Eigene Veröffentlichungen	222
11 Danksagungen	226
12 Lebenslauf	229

1 Einleitung

1.1 Biologie des Pankreas

1.1.1 Anatomie des Pankreas

Das Pankreas ist ein Zentralorgan bei der Verdauung und Regulation des Blutzuckers. Es liegt unterhalb der Leber und ist direkt mit dem Zwölffingerdarm (Duodenum) verbunden (vgl. Abbildung 1A). Das Pankreas ist in zwei Organe unterteilt: die Bauchspeicheldrüse, diese ist die wichtigste Verdauungsdrüse, und das Inselorgan, eine endokrine Drüse, die entscheidend an der Regulation des Blutzuckers beteiligt ist (Rauber and Kopsch, 1987).

A Endokrines Pankreas (Inselorgan)

Die endokrinen Zellen des Pankreas sind zu großen Inseln im exokrinen Gewebe angehäuft (Inselorgan). Diese Inseln bestehen vor allem aus drei Zellarten, die mit den Buchstaben A, B und D bezeichnet werden (vgl. Abbildung 1B). A-Zellen produzieren Glucagon, welches bei niedriger Blutzuckerkonzentration ausgeschüttet wird. Es stimuliert den Abbau von Glykogen in der Leber zu Glukose und bewirkt damit die Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Dieser Wirkung steht das von den B-Zellen gebildete Insulin entgegen. Es wird bei hoher Blutzuckerkonzentration ausgeschüttet und führt zur Erniedrigung des Blutzuckerspiegels und dem Aufbau von Glykogen in der Leber (Rauber and Kopsch, 1987; Schmidt and Thews, 1990). Die restlichen Zellen des Inselorgans sind D-Zellen, die das Hormon Somatostatin produzieren. Dieses wirkt inhibierend auf die Sekretion von Insulin und Glucagon sowie von Verdauungssäften im exokrinen Pankreas (Rauber and Kopsch, 1987; Schmidt and Thews, 1990).

Die häufigste mit dem endokrinen Pankreas assoziierte Erkrankung ist *Diabetes mellitus* (Classen et al., 1994). Hierbei reicht das produzierte Insulin nicht mehr aus, um die Blutzuckerkonzentration auf einem normalen Wert zu halten. Als Folge steigt der Glukosegehalt im Blut (Hyperglykämie) so hoch, dass Glukose nicht mehr komplett in den Nieren resorbiert werden kann und mit dem Harn ausgeschieden wird (Glykosurie). Die osmotische Wirkung der Glukose in den Nieren verursacht eine vermehrte Harnausscheidung (Polyurie) mit starkem Verlust von Natrium-, Kalium- und Chloridionen. Sowohl *Diabetes mellitus* als auch die sehr viel seltenere Überproduktion von Insulin kann zum Tode führen (Schmidt and Thews, 1990).

In seltenen Fällen können B-Zellen zu einem, in der Regel gutartigen, Tumor entarten (Insulinom). Noch seltener sind Tumoren der A-Zellen (Glucagonom) (Classen et al., 1994).

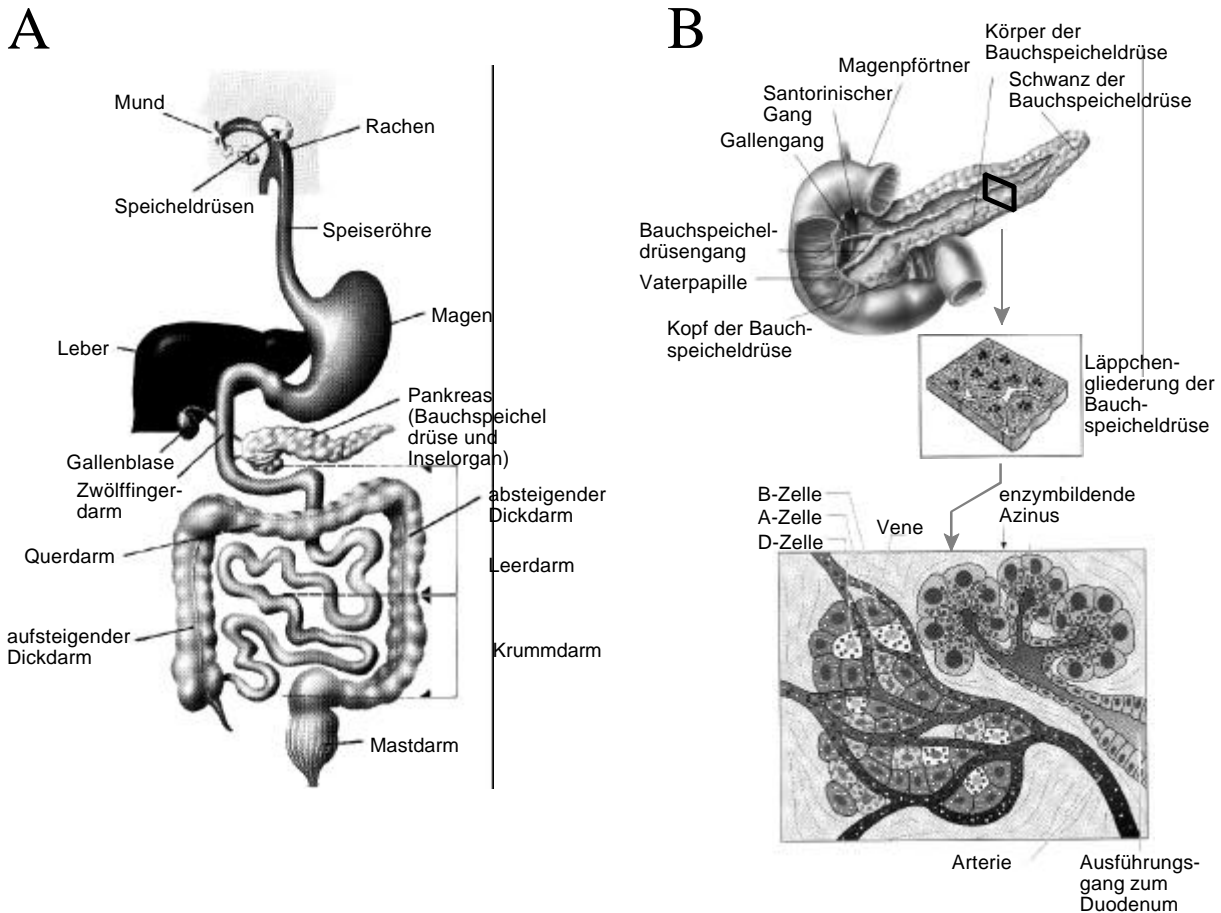


Abbildung 1: Lage und Funktion des Pankreas

(A) Anatomie des Verdauungstrakts mit Pankreas. (B) Querschnitt durch das Pankreas: Darstellung der lappchenartigen Struktur und anatomischen Nachbarschaft von exokrinem (Acini, Ducti) und endokrinem Pankreas (Inselorgan bestehend aus A-, B-, D-Zellen) eingebettet im Gewebe des exokrinen Pankreas (Bauchspeicheldrüse). Vom Inselorgan produzierte Hormone (Insulin, Glucagon, Somatostatin) werden über Kapillaren in das Blut abgegeben. Das Verdauungssekret der acinären Zellen wird über Kanäle (Ducti) in das Duodenum geleitet (aus (Bernabé, 1998; Schwegler, 1998) verändert).

B Exokrines Pankreas (Bauchspeicheldrüse)

Im exokrinen Teil des Pankreas (Bauchspeicheldrüse) wird der Bauchspeichel produziert, der zum einen sehr reich an alkalisch wirkenden Bikarbonaten ist, aber auch eine Vielzahl Eiweiß-,

Kohlenhydrat- und Fett-abbauender Enzyme enthält. Während das Bikarbonat den sauren pH-Wert des vom Magen kommenden Verdauungsbreis neutralisiert, zerkleinern die im Bauchspeichel vorhandenen Enzyme die Nährstoffe; z.B. spaltet das Trypsin Proteine, die α -Amylase bestimmte Polysaccharide und die Lipase Fette in Untereinheiten, die resorbiert werden können. Kleine Zellanhäufungen im Pankreas (Acini) produzieren den Bauchspeichel, der über Kanäle (Ducti) in den Zwölffingerdarm (Duodenum) geleitet wird (Rauber and Kopsch, 1987; Schmidt and Thews, 1990).

Zu den häufigsten Erkrankungen des exokrinen Pankreas gehört die Entzündung (Pankreatitis). Diese kann entweder plötzlich durch eine Verstopfung der Ducti z.B. durch Gallensteine entstehen (akute Pankreatitis) oder langsam fortschreitend, meist durch Alkoholabusus verursacht, auftreten (chronische Pankreatitis) (Classen et al., 1994).

1.1.2 Neoplastische Veränderungen des exokrinen Pankreas

Die häufigste neoplastische Veränderung ist das Adenokarzinom des Pankreas. Als Adenokarzinom wird ein maligner Tumor, der vom epithelialen Gewebe einer Drüse ausgeht, bezeichnet. Es entsteht aus den Gangepithelien als ductales Karzinom, in ca. 10 % der Fälle auch von Zellen der Acini (acinäres Karzinom). Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms liegt bei 10 Fällen auf 100.000 Menschen. Es ist jedoch die vierthäufigste Todesursache männlicher (nach Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinom) und fünfhäufigste Todesursache weiblicher Karzinompatienten (nach Brust-, Lungen-, Kolon- und Urogenitalkarzinom), wobei alle Altersgruppen, mit einer Häufung im 7. und 8. Lebensjahrzehnt, betroffen sind (Classen et al., 1994). Die Diagnose ist sehr schwierig, da Symptome erst relativ spät in der Tumorgenese auftreten. Dies hat zur Folge, dass die 5-Jahres-Lebenserwartung der Patienten bei Einsatz einer Therapie bei weniger als 5 % liegt (Garabrant et al., 1998). Damit besteht für das Pankreaskarzinom von allen Krebsarten die schlechteste Prognose. Selbst wenn der Tumor bei erster Diagnosestellung nur eine Größe von 2 cm besitzt, überleben trotz intensiver medizinischer Behandlung durchschnittlich etwa nur 37 % der Patienten die nächsten fünf Jahre (Poston et al., 1991).

1.1.3 Genetische Veränderungen während der Tumorgenese

Grund für die Entstehung von Tumoren ist die genetische Veränderung mehrerer zellulärer Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene oder DNA-Reparaturgene (Slebos et al., 1998). Eines der ersten durch Mutation von Proto-Onkogenen im Pankreas nachgewiesenen Onkogene ist *K-ras* (Barinaga, 1998). In seiner natürlichen Funktion vermittelt *K-ras* eine Signalübertragung von in der Cytoplasmamembran verankerten Rezeptoren für Wachstumsfaktoren an Proteine der

Signaltransduktionskette (z.B. *raf*). Dadurch wird die Zelle zur Teilung stimuliert (vgl. Abbildung 2B). *Ras*-Proteine binden einen der zellulären Energieträger (GTP) wodurch sie aktiviert werden und Wachstumssignale weiterleiten. Durch ihre GTPase-Aktivität wird das gebundene GTP nach einer gewissen Zeitspanne zu GDP hydrolysiert, wobei *Ras* in einen inaktiven Zustand übergeht. In einer normalen Zelle wechseln *ras*-Proteine zwischen dem aktiven (GTP gebundenen) und inaktiven (GDP gebundenen) Zustand. Durch Mutationen im K-*ras* Proto-Onkogen kann das Protein in einem permanent aktiven Zustand vorliegen und die Zelle zur ungehemmten Teilung anregen (Barinaga, 1998). Zwischen 80 und 100 % der Pankreaskarzinome haben aktivierende Punktmutationen im Kodon 12 des K-*ras*-Gens (Almoguera et al., 1988; Hruban et al., 1993). Es ist zwar noch nicht bekannt, warum K-*ras*-Mutationen so häufig bei Pankreaskarzinomen und vor allem in Kodon 12 auftreten, doch scheint dies in der Regel ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese zu sein (DiGiuseppe et al., 1994; Moskaluk et al., 1997).

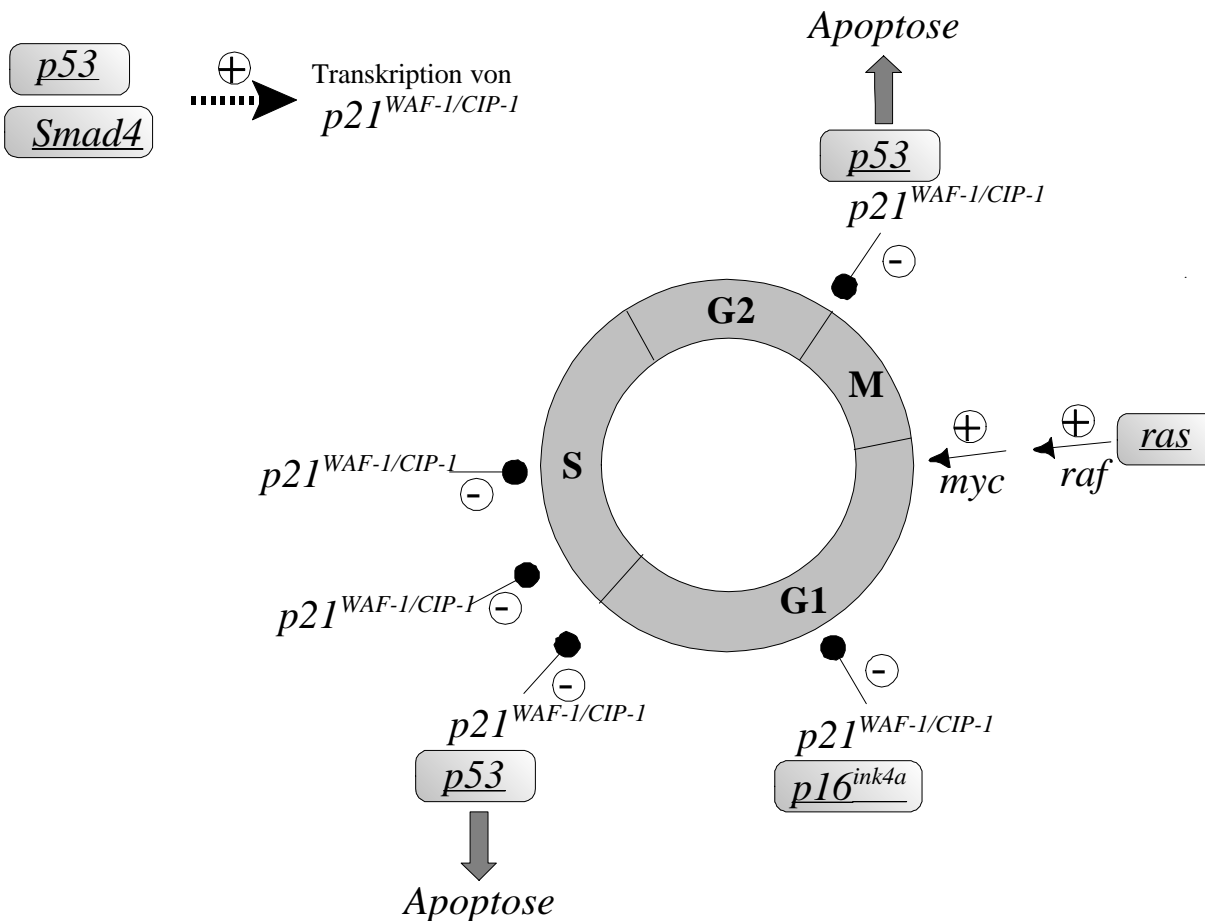


Abbildung 2: Häufig mutierte Gene in Pankreaskarzinomen

(A) $p53$ und $Smad4$ in einer gesunden Zellen stimulieren die Transkription des Zellzyklusinhibitors $p21^{WAF-1/CIP-1}$. Das gebildete $p21^{WAF-1/CIP-1}$ hemmt Cdk-Komplexe und verlangsamt damit den Zellzyklus. (B) $p53$ kann an zwei Checkpoints im Zellzyklus die Apoptose einleiten. *Ras* stimuliert über andere Signalproteine die Zellteilungsaktivität und $p16^{INK4a}$ wirkt auf die Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) 6 und 8, was eine Verlangsamung des Zellzyklus zur Folge hat.

Damit ein Tumorsuppressorgen durch Mutation zur Tumorgenese beitragen kann, müssen in der Regel beide Kopien (Allele) in einer Zelle inaktiviert worden sein. Das am besten untersuchte Tumorsuppressorgen ist p53 (Barinaga, 1998). Es ist ein nukleäres Protein, das mit anderen nukleären Faktoren Komplexe bilden kann. Durch sequenzspezifisches Binden an Promotoren kann p53 die Transkription der entsprechenden Gene stimulieren und durch sequenzunspezifisches Binden reprimieren. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus als auch beim programmierten Zelltod (Apoptose) (Kern et al., 1991; Levine, 1992; Levine, 1997).

Der Zellzyklus ist sehr genau durch spezifische Proteine (Cycline) reguliert, die mit Cyclin abhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, Cdk) Komplexe bilden. Diese Komplexe vermitteln den Übergang der Zelle in die jeweils nächste Phase des Zellzyklus. Die Wirkung der Cyclin-Cdk Komplexe wird auf der anderen Seite durch die Cdk-Inhibitoren (z.B. p16^{INK4a}, p21^{WAF-1/CIP-1}) gehemmt. Falls die Cyclin-Cdk-Komplexe nicht gehemmt werden, kann die Zelle permanent neue DNA synthetisieren und den Zellzyklus beenden (Alison and Sarraf, 1997).

Bei vorheriger Schädigung der DNA einer gesunden Zelle akkumuliert p53 und verhindert über andere Signal-vermittelnde Proteine (z.B. p21^{WAF-1/CIP-1}) den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase (G1-/S-Checkpoint). Damit kann sich die Zelle nicht mehr weiter teilen. Ist die Schädigung der DNA so stark, dass sie nicht mehr von der Zelle repariert werden kann, leitet p53 in einer normalen Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) ein (vgl. Abbildung 2B). Selbst wenn in Krebszellen p53 gebildet wird, ist das vorhandene p53 häufig inaktiv, wodurch sich die Zelle auch bei DNA-Schädigung und trotz vermehrter Produktion von p53 weiter teilt (Slebos et al., 1998). In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass 50-75 % aller Pankreaskarzinome Mutationen oder Deletionen in beiden Allelen des p53-Gens zeigen, so dass zwar Protein gebildet werden kann, dieses aber nicht funktionell ist. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration von p53 in der Zelle dramatisch zunimmt (Hall and Lane, 1994). Unter normalen Bedingungen ist p53 in der Zelle durch immunhistochemische Methoden nicht nachweisbar, bei inaktiven p53 kann jedoch eine Anhäufung im Tumor gezeigt werden (DiGiuseppe et al., 1994). Allerdings werden mit dieser Methode nur Mutationen nachgewiesen, bei denen noch ein Protein gebildet wird. Mutationen, die die Synthese des Proteins unterbinden (vorzeitiges Stop-Kodon, Leserastermutation) werden mit der Immunhistochemie nicht erfasst, so dass die Prävalenz von p53-Mutationen wahrscheinlich noch höher ist, als durch immunhistochemische Methoden gezeigt (Sarkar and Dugan, 1998).

In gesunden Zellen wirkt p16^{INK4a} als Cdk-Inhibitor auf die Cyclin abhängige Kinasen 4 und 6 (Cdk4 und Cdk6). Sowohl Cdk4 als auch 6 induzieren den Übergang der Zelle von der G1- zur S-Phase (vgl. Abbildung 2B) (Alison and Sarraf, 1997; Slebos et al., 1998). Ein nicht

funktionelles p16^{INK4a} kann Cdk4 and Cdk6 nicht mehr binden, wodurch diese permanent aktiv sind und dadurch nicht mehr auf Signale, die das Wachstum kontrollieren, reagieren (Slebos et al., 1998). Veränderungen im p16^{INK4a}-Gen können damit direkt zum immortalisierten Phänotyp einer Krebszelle beitragen (Hara et al., 1996; Zindy et al., 1997). In 80 % der untersuchten Pankreaskarzinome wurden Veränderungen durch Deletionen oder Mutationen in beiden Allelen des p16^{INK4a}-Gens gefunden (Caldas et al., 1994). Ein anderer Mechanismus, der hier eine Rolle zu spielen scheint, ist die Modifikation der Promoterregion von p16^{ink4a} durch Methylierung, wodurch die Aktivität des Promotors auf ein nicht nachweisbares Maß gesenkt wird (Herman et al., 1995). Interessanterweise ist die Promotor-Methylierung reversibel und stellt damit eine Möglichkeit für eine neue Strategie der Behandlung dar (Slebos et al., 1998).

Ein erst vor wenigen Jahren entdecktes Gen, das in 50 % der pankreatischen Karzinomen deletiert oder mutiert ist, ist Smad4/DPC4 (*small mothers against decapentaplegic/deleted in pancreatic carcinomas locus 4*). Unter normalen Bedingungen überträgt das Protein zellwachstumshemmende Signale, die von Angehörigen der TGFβ (*transforming growth factor Beta*)-Proteinfamilie an die Zelle gegeben werden (Grau et al., 1997). Generell werden freigesetzte Proteine, die eine proliferative oder zellwachstumshemmende Wirkung auf Zielzellen ausüben (z.B. TGFβ) als Cytokine bezeichnet. Smad4/DPC4 aktiviert die Transkription von p21^{WAF-1/CIP-1} (vgl. Abbildung 2A), welches wiederum inhibierend auf mehrere Cyclin-Cdk-Komplexe wirkt und damit das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus stoppt (vgl. Abbildung 2B) (Grau et al., 1997). Das Smad4/DPC4-Gen kann damit auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet werden. Neueren Ergebnissen zur Folge scheint Smad4 auch in der Lage zu sein Apoptose einzuleiten (Atfi et al., 1997). In einer Krebszelle sind häufig nicht genügend funktionelle Smad4-Moleküle vorhanden, wodurch die Hemmung der Zellteilungsaktivität durch TGFβ über Signaltransduzierende Smad4-Moleküle nicht mehr existiert und die Zelle sich ungehemmt weiterteilt (Hunt et al., 1998).

Neben den typischen mit Pankreaskrebs assoziierten genetischen Veränderungen (K-ras, p53, p16^{INK4a}, Smad4) gibt es weniger häufig auftretende Veränderungen in anderen Genen. So finden sich in ca. 20 % - 50 % der Tumoren erhöhte Konzentrationen von ErbB (*erythroblastosis*)-2, einem veränderten Rezeptor für Wachstumsfaktoren (Slebos et al., 1998) und in 10 % der Tumoren eine Amplifizierung des AKT2-Gens (Day et al., 1996; Dugan et al., 1997), dessen Produkt an der Übertragung von Signalen innerhalb der Zelle beteiligt ist (Franke et al., 1995).

1.2 Therapeutische Konzepte für Tumorerkrankungen

Die Gentherapie stellt eine moderne Möglichkeit zur Therapie dar, um bisher kaum oder nicht heilbare Krankheiten zu behandeln. Dazu gehören Krankheiten, die sich auf den Defekt in einem Gen zurückführen lassen (monogenetische Defekte) wie zum Beispiel Hämophilie (Fallaux and

Hoeben, 1996), Hypercholesterinämie (Tzeng et al., 1996), das schwere kombinierte Immundefizienzsyndrom (*severe combined immune deficiency*, SCID) (Bordignon, 1998) und cystische Fibrose (Rosenecker et al., 1998). Zur Zeit ist es jedoch nicht möglich, effizient ein defektes Gen gegen ein intaktes auszutauschen (*gene replacement*). Daher zielen die derzeitigen Strategien daraufhin das therapeutische Gen zusätzlich in die Zelle einzubringen (*gene adding*). Voraussetzung hierfür ist, dass die zusätzliche Kopie des Gens für ein Genprodukt kodiert, das dominant gegenüber dem schadhafte ist.

Sehr viel Augenmerk wird auch zur Zeit auf die gentherapeutische Behandlung von HIV (Humanes Immundefizienz Virus)-Infektionen (Morgan, 1999) und vor allem auf Krebserkrankungen aller Art (Haber and Fearon, 1998; Kohler et al., 1998) gelegt. Sehr weit fortgeschritten ist die Therapie von verschiedensten Tumorarten. Solche Therapien wurden bereits in klinischen Studien geprüft. Eine ideale Therapie hat sich aber bisher noch nicht herauskristallisiert (Davis et al., 1996). Ein Grund hierfür ist, dass die molekularen Veränderungen in einer Zelle, die letztendlich zur Tumorgenese führen, mehrere und sehr unterschiedliche Gene betreffen können. Dies beeinflusst das Verhalten der entarteten Zelle auf unterschiedliche Weise und prägt damit die Effizienz des gewählten Therapiekonzepts. Alle bisherigen Konzepte haben jedoch die Gemeinsamkeit, dass am Anfang stets zwei grundlegende Fragen zu beantworten sind. Die Frage nach dem geeigneten Transportmittel für den Gentransfer (Vektor) und die Frage nach dem therapeutischen Konzept (Rabkin et al., 1997).

A Antisense-Nukleinsäuren

Die Regulation der Expression von Genen durch komplementäres Paaren von *sense*- und *antisense*-Nukleinsäuresträngen ist ein Mechanismus, um die Genexpression zu regulieren (Mercola and Cohen, 1995). *Antisense*-DNA oder -RNA bindet sequenzspezifisch an komplementäre Ziel-RNA-Moleküle und bildet dabei DNA-RNA-Hybrid- oder RNA-RNA-Doppelstränge. DNA-RNA-Stränge sind Substrat für die nukleäre RNase H, welche die Hybridstränge abbaut (Kashihara et al., 1998). RNA-RNA-Doppelstränge hingegen sind Substrat für ein anderes zelluläres Enzym, die Adenosin-Desaminase, welches in beiden RNA-Strängen Adenosin zu Inosin modifiziert. Dadurch wird die RNA unleserlich für die Translation (Rossi, 1995). Eine weitere Hemmung der Genexpression kann durch sterische Hinderung der Translation auftreten, doch spielt diese eine eher untergeordnete Rolle, da Ribosomen eine helikale Entwindungsaktivität besitzen (vgl. Abbildung 3A) (Mercola and Cohen, 1995; Rossi, 1995).

Angewendet wird die *Antisense*-Technologie z.B. um die Expression von Onkogenen so weit zu vermindern, dass die Zelle sich nicht mehr teilt (Mercola and Cohen, 1995).

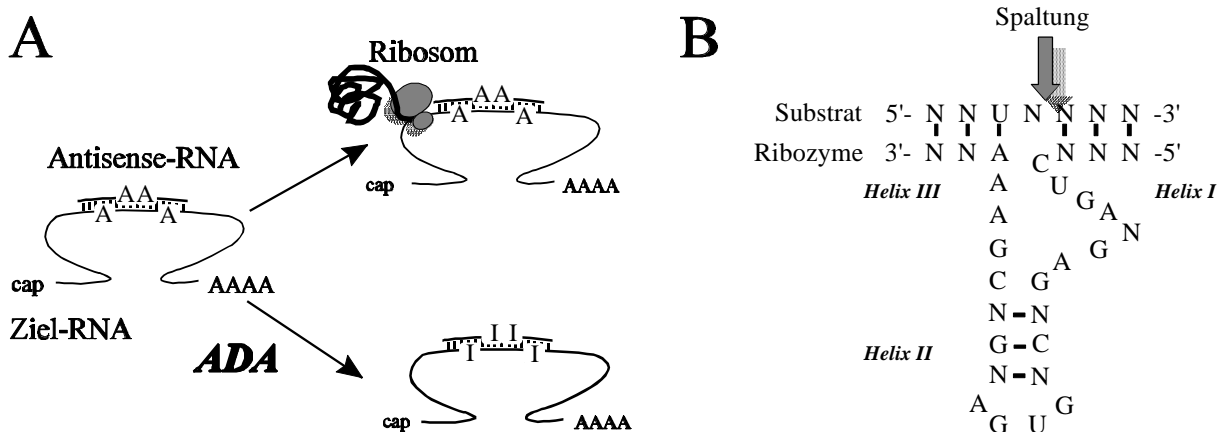


Abbildung 3: Gentherapie mittels antisense-Nukleinsäuren und Ribozymen

(A) Inaktivierung einer Ziel-RNA durch Bildung eines RNA-RNA-Doppelstranges mit der *antisense*-RNA: der RNA-RNA-Duplex hemmt Ribosomen bei der Translation und ist Substrat für die Adenosin-Desaminase (ADA). ADA modifiziert Adenosin (A) zu Inosin (I), wodurch die RNA inaktiviert wird. (B) Konservierte Sequenz eines *hammerhead*-Ribozyms nach Haseloff und Gerlach (Haseloff and Gerlach, 1988): Das Ribozym bindet sequenzspezifisch mit Helix I und III an die Substrat-RNA. Helix II formt eine charakteristische Sekundärstruktur (*hammerhead*), die die spezifische Spaltung katalysiert.

B Ribozyme

Ribozyme sind einzelsträngige RNA-Moleküle, die eine sequenzspezifische *endo*-RNase-Aktivität zeigen. Sie sind relativ klein, mit typischerweise 40 bis 50 Nukleotiden, von denen ca. 30 hochkonserviert sind und die Spaltung bewirken. Zwei variable Bereiche flankieren die katalytisch aktive Kernregion und lagern sich sequenzspezifisch an das zu spaltende RNA-Molekül (Substrat) an. Dadurch wird das katalytische Zentrum genau zur Zielregion dirigiert und spaltet dort die Ziel-RNA (vgl. Abbildung 3B) (Kashani-Sabet and Scanlon, 1995).

Bisher wird diese Technik in präklinischen Studien zur Hemmung von *ras*-Onkogenen in Pankreaskarzinomen (Li et al., 1996; Ohta et al., 1994; Tsuchida et al., 1998) und in klinischen Studien zur Behandlung von HIV-Infektionen angewandt (Brower et al., 1998; Wong-Staal et al., 1998).

C Das Immunsystem stimulierende Gene

Die meisten Tumoren exprimieren Tumor-spezifische Antigene. Diese Tumorantigene können entweder durch Mutation und/oder durch eine Überexpression von bestehenden Proto-Onkogenen oder „normaler“ Gene gebildet werden. Dazu gehören unter anderen die regelmäßig

in Colon- und Adenokarzinomen auftretenden Tumor-assoziierten Antigene CEA (*carcino-embryogenic antigen*), MAGE (*melanoma antigen encoding gene*) und MUC1 (*mucin 1*) (Kim et al., 1990; Nash and Said, 1986; O'Rourke et al., 1997). Trotz dieser spezifischen Antigene ist der Tumor in der Regel weitgehend unsichtbar für das Immunsystem und kann wachsen und Metastasen bilden. Um das Immunsystem so zu stimulieren, dass es Tumorgewebe erkennt und zerstört, gibt es die Möglichkeit Gene für Immunzellen-aktivierende Botenmoleküle (immunstimulatorische Cytokine) einzuschleusen (Baskar, 1996; Plautz et al., 1993).

Neben der Stimulierung von Immunzellen durch Cytokine sind für eine wirksame Antigenerkennung und damit eine effektive T-Zellaktivierung zusätzliche sekundäre Signale, die von Hilfsmolekülen (z.B. B7-Moleküle) vermittelt werden, notwendig (Chen et al., 1992; Plautz et al., 1993; Townsend and Allison, 1993). Durch Transfer dieser costimulatorischen Moleküle werden Tumorzellen leichter von cytotoxischen T-Zellen erkannt, wodurch diese aktiviert werden und sich vermehren. Erst dadurch können T-Zellen wirksam Tumorzellen bekämpfen (vgl. Abbildung 4A und B) (Cavallo et al., 1995; Nabel et al., 1995; Plautz et al., 1993). Jedoch entkommen viele Tumoren den Angriffen des Immunsystems, in dem sie keine Antigen-präsentierenden MHC-I-Moleküle bilden oder die Prozessierung von Antigenen fehlerhaft ist (Rees and Mian, 1999). Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass Tumorzellen durch eine fehlerhafte Signalkaskade dem apoptotischen Zelltod entkommen oder durch Überexpression von FasL, den vorzeitigen Tod der angreifenden T-Zelle induzieren (Ungefroren et al., 1999).

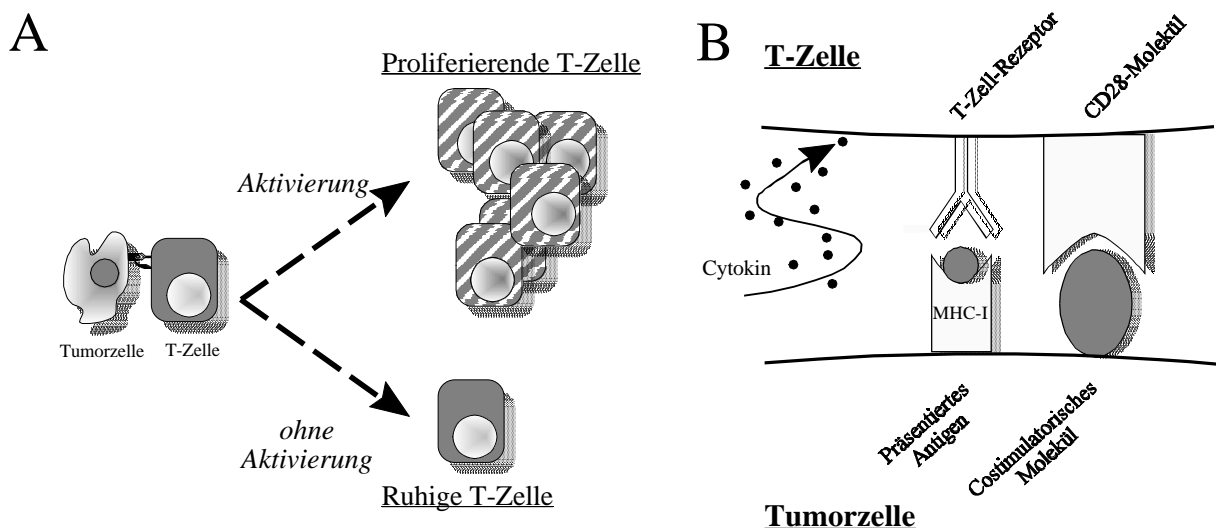


Abbildung 4: Mechanismen der T-Zell-Stimulierung

(A) Aktivierung einer T-Zelle: Ein T-Zelle, die eine Tumorzelle erkennt und einen entsprechenden Stimulus bekommt, wird aktiviert und beginnt sich zu vermehren. Eine nicht-stimulierte Zelle teilt sich nicht. (B) Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Tumorzelle und einer T-Zelle: Der T-Zellrezeptor erkennt das von der Tumorzelle auf einem MHC-I-Molekül präsentierte Antigen und wird durch freigesetzte Cytokine oder costimulatorische Moleküle auf der Tumorzelle stimuliert.

D Zellzyklusregulatorgene

Allen neoplastischen Veränderung von Geweben geht eine Inaktivierung von Zellzyklusregulatorgenen (z.B. p16^{ink4a}) bzw. Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) und eine Aktivierung von Proto-Onkogenen (z.B. *ras*) zu Onkogenen voraus (vgl. Abbildung 2B) (Alison and Sarraf, 1997). Inaktivierte Tumorsuppressorgene oder Zellzyklusregulatorgene können häufig durch das Einbringen einer intakten Kopie in die Zelle korrigiert werden (Skuse and Ludlow, 1995). Das Produkt des zu transferierenden Gens muss zentral in den Zellzyklus eingreifen, wodurch entweder die unkontrollierte Teilung der Zelle gestoppt oder der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet wird (Bartkova et al., 1997).

Da in ca. 50 % aller Tumoren das Gen für p53 mutiert ist, versuchen verschiedene gentherapeutische Ansätze, durch Einschleusen einer normalen (Wildtyp) Kopie die Tumorzellen zur Apoptose zu stimulieren oder zumindest ihr Wachstum zu stoppen (Bellamy, 1997; Nielsen and Maneval, 1998; Steele et al., 1998). Der Transfer des p53-Gens führte in klinischen Studien zur Behandlung von *non-small cell lung cancer* (NSCLC) teilweise zur Stabilisierung oder Reduktion des Tumors (Swisher et al., 1999).

E Suizidgene

Im Zuge der konventionellen Chemotherapie von Krebs wird versucht Drogen zu finden, die den Tumor stark schädigen, aber möglichst geringe Nebenwirkungen auf das normale Gewebe zeigen. Die gentherapeutische Anwendung von Suizid- oder „Sensitivitäts-“, Genen zielt darauf ab, Proteine in Tumorzellen zu produzieren, welche eine relativ harmlose Prodroge in eine hochtoxische Form überführen können (vgl. Abbildung 5A) (Connors, 1995; Plautz et al., 1991; Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf, 1996). Dadurch können Tumorzellen selektiv gegenüber der Droge empfindlich gemacht werden, auch wenn das Medikament dem Patienten systemisch verabreicht wird (Schmidt-Wolf and Schmidt-Wolf, 1996).

Suizidgene wirken weitgehend unabhängig von den exprimierten Onkogenen in der Tumorzelle. Daher sind sie für die meisten Tumoren einsetzbar. Die derzeitige Vektortechnologie erlaubt bisher noch keinen hundertprozentigen Gentransfer in ein Gewebe. Um dennoch einen Tumor komplett eliminieren zu können, ist es wichtig, die Wirkung des Suizidsystem nicht nur auf die Zelle, die gerade das Suizidgen exprimiert, zu beschränken, sondern auch auf umgebende, nicht exprimierende Tumorzellen auszudehnen. Dieses Phänomen wird „*bystander effect*“ benannt. Es wird durch aktive Metaboliten hervorgerufen, die aus der aktivierenden Zelle entweichen und benachbarte Zellen schädigen können (vgl. Abbildung 5B) (Dilber and Smith, 1997).

Das am besten untersuchte und am häufigsten in präklinischen und klinischen Studien angewandte System ist die Aktivierung von Ganciclovir durch die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSVtk). Ursprünglich wurde Ganciclovir (GCV) als antivirale Droge bei Infektionen mit Herpes Simplex eingesetzt.

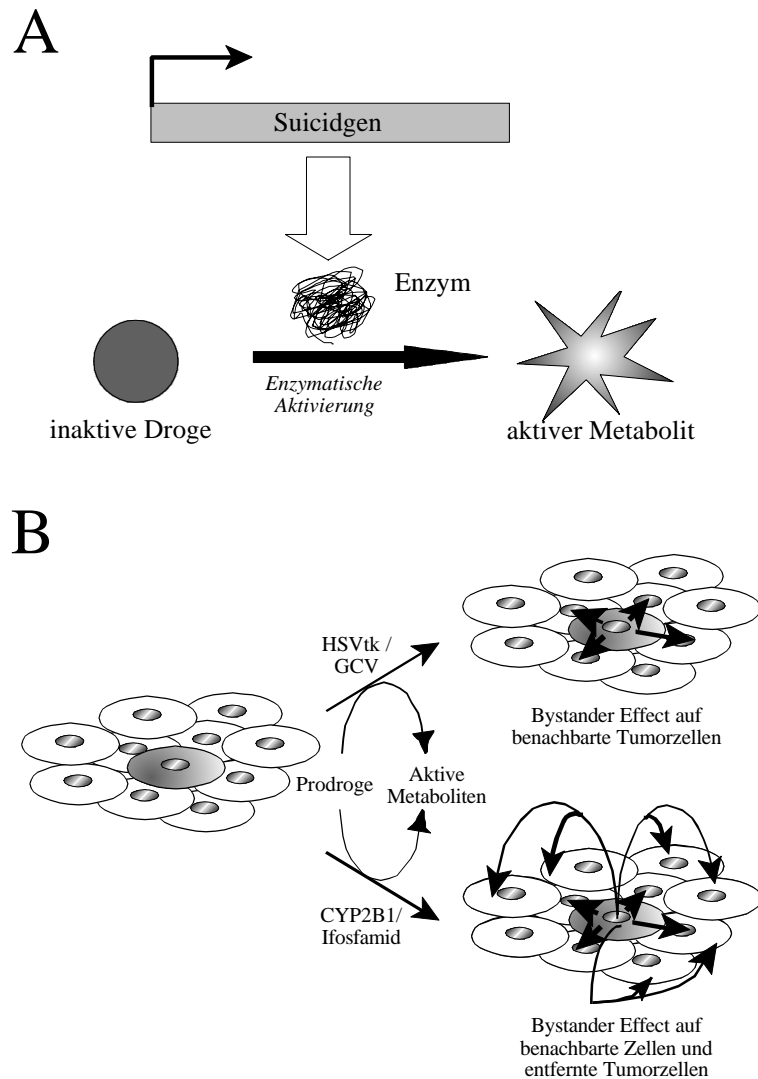


Abbildung 5: Funktionsweise eines Suizidsystems

(A) Prinzip eines Suizidsystems: Vom eingebrachte Suizidgen wird in der Zelle ein Enzym synthetisiert, das inaktive Prodrogen zu aktiven Metaboliten aktiviert. (B) *Bystander effect* verschiedener Suizidsysteme: Durch die Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus (HSVtk) aktiviertes Ganciclovir (GCV) wird nur an unmittelbar benachbarte Zellen weitergegeben, während Ifosfamid, das durch das Enzym Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) aktiviert wurde, zusätzlich weiter entfernte Zellen trifft (nach (Waxman et al., 1999)).

Enzym	Ursprung	Prodroge	aktiver Metabolit	Mechanismus	Bystander Effect
Herpes simplex Thymidin-kinase (HSVtk)	Virus	Ganciclovir (GCV)	GCV-Triphosphat	Termination der Replikation	über <i>gap junctions</i>
Cytosin Desaminase	Bakterium Pilz	5-Fluorocytosin	5-Fluorouracil	Hemmung der Nukleotid-synthese	diffundierende Metaboliten
E. coli Nitroreduktase (ntr)	Bakterium	CB1954	5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxyamino-2-nitrobenzamid (AHN)	DNA-Alkylierung	diffundierende Metaboliten
CYP2B1	Säuger	Ifosfamid (IFO) Cyclophosphamid (CPA)	Phosphoramid-mustard Acrolein	DNA-Alkylierung	diffundierende Metaboliten

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Suizidsysteme

Verwendete Abkürzungen: HSVtk, Herpes simplex Virus Thymidinkinase; GCV, Ganciclovir, CYP2B1, Cytochrom P450 2B1; CPA, Cyclophosphamid; IFO, Ifosfamid

In der Antitumorthherapie wird durch die übertragene HSVtk GCV monophosphoryliert und durch zelluläre Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert. Das Triphosphat wird als Substrat während der Replikation in den wachsenden DNA-Strang eingebaut und bewirkt durch das fehlende 3'-OH-Ende einen Abbruch der DNA-Synthese und den Zelltod (vgl. Tabelle 1) (Field et al., 1983; Smith et al., 1982). Ruhende oder sich nur sehr langsam teilende Tumorzellen werden von dieser Therapie nicht angegriffen (Connors, 1995).

Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung der von Escherichia coli (E. coli) oder Hefen stammenden Cytosin-Desaminase in Verbindung mit 5-Fluorocytosin dar. Das Enzym desaminiert 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil, welches die Thymidilat-Synthase während der Nukleotidsynthese hemmt (vgl. Tabelle 1) (Stryer, 1990). Bei ausreichender Schädigung kann dies letal für die Zelle sein (Connors, 1995). Das in der konventionellen Chemotherapie bereits etablierte 5-Fluorouracil (Stryer, 1990) wurde in mehreren *in vitro* und *in vivo* Tumormodellen (Lan et al., 1996; Nishiyama et al., 1982; Ohwada et al., 1996; Rowley et al., 1996) und wenigen klinischen Studien getestet (FDA, 1999).

Ein recht neuartiges, allerdings noch nicht für den klinischen Einsatz zugelassenes Medikament ist CB1954, welches durch eine bakterielle Nitroreduktase zu einer toxisch wirkenden

Verbindung (5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxyamino-2-nitrobenzamid, AHN) aktiviert wird (vgl. Tabelle 1) (Bailey and Hart, 1997; Bailey et al., 1996). AHN besitzt zwei funktionelle Gruppen, die eine Alkylierung von Nukleinsäuren bewirken (Connors, 1995). Bisher wurde es in wenigen präklinischen Studien getestet (Bailey et al., 1996; Bridgewater et al., 1997; Green et al., 1997).

Zu einem ähnlichen System gehören Isoformen der Cytochrom P450 Enzymfamilie. Diese katalysieren unter normalen Bedingungen eine Vielzahl von Reaktionen im menschlichen Körper (Detoxifizierung, Steroidstoffwechsel, Stoffwechsel von Fremdverbindungen). Obwohl es eine sehr große Anzahl von verschiedenen Isoformen gibt, zeigen sie zum Teil keine sehr hohe Substratspezifität. Die von der Ratte stammende Isoform 2B1 (CYP2B1) ist hauptsächlich am Steroidstoffwechsel beteiligt (He et al., 1995), spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von Oxazaphosphorinen (z.B. Ifosfamid (IFO) oder Cyclophosphamid (CPA)), die bereits in der konventionellen Chemotherapie von Tumoren angewandt werden (vgl. Tabelle 1) (Yu and Waxman, 1996). Das Enzym CYP2B1 hydroxyliert IFO/CPA am C4-Atom, wodurch das instabile 4-OH-IFO bzw. 4-OH-CPA ($t_{1/2} = 17\text{min}$ (Wright et al., 1995)) entsteht. Die hydroxylierte Verbindung z.B. 4-OH-IFO stellt die aktivierte, frei diffundierbare Transportform der Oxazaphosphorine dar. Beim spontanen Zerfall von 4-OH-IFO entstehen die zwei hochreaktiven Verbindungen Acrolein und Phosphoramidmustard (vgl. Abbildung 6A). Das monofunktionelle Acrolein alkyliert vor allem Proteine oder DNA am O6-Atom von Guaninen, während Phosphoramidmustard, das zwei funktionelle Gruppen besitzt, DNA vor allem am N7-Atom von Guaninen alkyliert. Dabei treten zum Teil kovalente intermolekulare Verbindungen (*interstrand cross links*) zwischen zwei DNA-Strängen auf (vgl. Abbildung 6B) (Lawley and Phillips, 1996). Im Vergleich zu Phosphoramidmustard ist die therapeutische Wirkung von Acrolein gering. Die notwendige Aktivierung des Cytostatikums findet bei der konventionellen Therapie vor allem in der Leber statt (Yu and Waxman, 1996). Dabei verbreiten sich die kurzlebigen Metaboliten im ganzen Körper, wobei sie zum Tumor, aber auch in gesunde Organe gelangen und dort Nebenwirkungen wie z.B. eine Toxizität in der Blase (Urotoxizität) verursachen können (Fleming, 1997; Wagner, 1994).

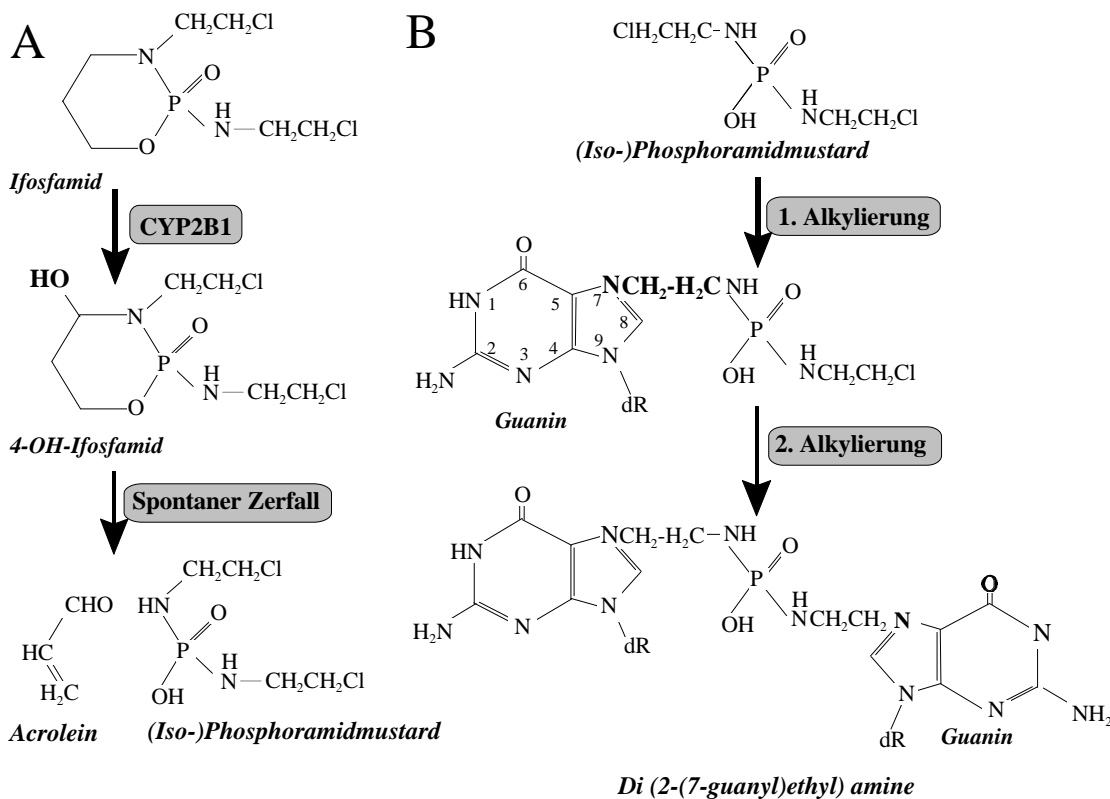


Abbildung 6: Funktionsweise von CYP2B1 und Phosphoramidmustard.

(A) CYP2B1 hydroxyliert Ifosfamid, wodurch eine instabile Verbindung entsteht, die in die aktiven Metaboliten (Iso-)Phosphoramidmustard und Acrolein zerfällt. (B) (Iso-)Phosphoramidmustard hat zwei funktionelle Gruppen, die vor allem mit N7-Atomen von Guaninen kovalente Bindungen eingehen. Dadurch kann es zu Kreuzverbindungen zwischen zwei DNA-Strängen (*interstrand cross links*) kommen (Lawley and Phillips, 1996).

Wichtig für die Wirkung eines Suizidsystems ist ein potenter *bystander effect*. HSVtk/GCV zeigt einen *bystander effect*. Allerdings sind die phosphorylierten GCV-Moleküle zu groß um durch die Zellmembran diffundieren zu können. Daher müssen die toxischen Metaboliten über direkte Zell-Zell-Verbindungen (*gap junctions*) weitergegeben werden. (Cirenei et al., 1998; Duflot-Dancer et al., 1998; Yang et al., 1998). Ein anderer, allerdings weniger bedeutender Mechanismus des *bystander effects* ist die Weitergabe der toxischen Metaboliten durch Vesikel, die nach dem programmierten Zelltod (Apoptose) entstehen und von anderen Zellen aufgenommen (phagozytiert) werden (Freeman et al., 1993). Interessanterweise tritt jedoch in manchen Tiermodellen ein *bystander effect* auf, der nicht nur Tumorzellen in unmittelbarer Nähe des Aktivierungsorts betrifft, sondern auch Tumoren in anderen Bereichen des Körpers (*distant bystander effect*). Verantwortlich dafür scheint das Immunsystem zu sein (Kianmanesh et al., 1997). Andere Suizidsysteme, die membrangängige alkylierende Metaboliten erzeugen (z.B.

CYP2B1/IFO), sind unabhängig von *gap junctions*. Die Metaboliten können frei diffundieren und so in das umgebende Tumorgewebe eindringen (vgl. Abbildung 5B).

1.3 Transportsysteme für DNA

Genauso wichtig wie die Frage nach dem therapeutischen Gen ist die Auswahl eines geeigneten Transportsystems. Ein ideales Gentransfersystem sollte folgende Eigenschaften besitzen: Schutz und effizienter Transport der DNA in die Zielzelle, geringe Toxizität und Immunogenität, auch in großen Mengen leicht produzierbar. Zwar gibt es das ideale Transfersystem noch nicht, jedoch erfüllen manche Vektorsysteme einzelne Kriterien schon recht gut.

1.3.1 Nicht-virale Transfervehikel

A Liposomen

Liposomen bestehen aus amphiphilen Verbindungen, d.h. ein Ende ist hydrophil, bedingt durch eine kationische Komponente, während das andere Ende eine lipophile Kohlenwasserstoffkette enthält. Sie bilden mit DNA Komplexe und schützen sie vor Degradation (Gao and Huang, 1995). Durch die kationische Komponente binden Liposomen an negativ geladene Zellmembranen, verschmelzen mit diesen direkt oder werden über Endocytose aufgenommen. Kritisch beim Liposomen-vermittelten Transfer von DNA in Zellen (Lipofektion) ist die Freisetzung der DNA aus dem Vesikel in das Cytoplasma. Geschieht dies nicht rechtzeitig, besteht die Möglichkeit, dass das Vesikel mit einem Endosom verschmilzt und der daraus resultierende pH-Abfall die Degradation der DNA bewirkt (Gao and Huang, 1995). Ist die DNA ins Cytoplasma freigesetzt worden, gelangt ein Teil in den Nukleus, wo es in der Regel zu einer vorübergehenden (transienten) Expression kommt. Für eine Langzeittherapie müßte daher die Behandlung wiederholt werden (Gao and Huang, 1995). Im Gegensatz zu vielen anderen biologischen Transfermethoden sind Liposomen jedoch nicht immunogen. Inzwischen ist die Technik so weit entwickelt, dass Liposomen in klinischen Versuchen verwendet werden. Sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* war ein meßbarer und therapeutisch wirksamer Gentransfer bei der Behandlung von cystischer Fibrose als auch von Melanomen nachweisbar (Middleton and Alton, 1998; Nabel et al., 1993).

B Zellen

i Autologe Zellen

Zellen sind das bisher am häufigsten verwendete Vehikel zum Transport von neuen Genen in den Körper eines Patienten. Bei den ersten verwendeten Zellen handelte es sich um Tumorf infiltrierende Lymphozyten (TILs). Diese Zellen wandern typischerweise in das Tumorgewebe ein, akkumulieren dort und setzen Cytokine frei. Durch die genetische Veränderung von TILs ist es möglich, das gewünschte Gen und dessen Genprodukt in den Tumor einzuschleusen.

Bei den ersten dahingehenden Untersuchungen wurden TILs aus dem Serum von Krebspatienten gewonnen und so verändert, dass sie ein zusätzliches Gen exprimieren. Anschließend wurden diese autologen Zellen den Patienten wieder reinfundiert. Das erste mit dieser Methode übertragene Gen war das Markergen für eine Resistenz gegenüber dem Toxin Neomycin. Die Analyse der TILs zeigte, dass abgesehen von dem zusätzlichen Genprodukt keine Änderungen bei der Produktion der zellulären Proteine vorlag (Kasid et al., 1990). In weiteren Experimenten wurden statt dem Markergen therapeutische, immunstimulatorische Gene in TILs eingebracht. Damit konnte die Produktion von Cytokinen wie z.B. von $\text{TNF}\alpha$ oder Interleukinen, in den Zellen messbar erhöht werden (Hwu et al., 1993; Kaiser et al., 1996; Tan et al., 1996). Die Menge an synthetisiertem $\text{TNF}\alpha$ in den autologen TILs war verglichen mit der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion einer im Labor etablierten und gentechnisch veränderten Ziellinie jedoch 30fach geringer (Hwu et al., 1993).

Inzwischen werden auch andere Zelltypen für den Transport von (Fremd-)Genen in den Organismus genutzt. Die bisher etablierten Techniken setzen jedoch voraus, dass bei der Verwendung von autologen Zellen diese relativ leicht aus dem Körper isoliert und *ex vivo* manipuliert werden können. Um eine häufige Wiederholung der Therapie zu vermeiden, werden als Ziel für die Expression von neuen Genen bevorzugt Zellen gewählt, die eine lange Lebensdauer erwarten lassen. Dazu gehören somatische Stammzellen, die ein nahezu unendliches Teilungspotenzial besitzen (Yanez and Porter, 1998). Sie werden entweder aus der Haut (Palmer et al., 1989) oder sehr viel häufiger aus dem Blut der Patienten isoliert (von Kalle et al., 1998). Im Falle der aus dem Blut gewonnen (hämatopoetischen) Stammzellen verteilen sie sich nach Reinfusion und produzieren das Genprodukt in allen Bereichen des Körpers (Brenner et al., 1995). Auf diese Art konnten bereits Gene zur Kompensierung von monogenetischen Defekten wie z.B. Adeonsin-Desaminase-Defizienz oder Resistenzgene gegen Cytostatika (z.B. *multi-drug resistance, mdr*) in den Körper gebracht werden (Hesdorffer et al., 1994; Williams and Moritz, 1994). Eine Tumorbehandlung mit gentechnisch veränderten Zellen beschränkte sich bisher auf leicht zugängliche Tumoren (z.B. Melanome) und den Transfer von immunstimulatorischen Genen. Dabei wurde ein Teil des Tumorgewebes entfernt und *ex vivo* so verändert, dass die

Tumorzellen ein Cytokin exprimieren. Um eine unkontrollierte Vermehrung der reinfundierten Tumorzellen in den Patienten zu vermeiden, wurden sie vorher bestrahlt. Diese Tumorzellen verteilten sich im ganzen Körper und stimulierten die systemische Immunantwort gegen Tumorgewebe (Abdel-Wahab et al., 1997) .

ii Allogene Zellen

Die meisten Ansätze eines zellvermittelten Gentransfers wurden mit autologen Zellen durchgeführt. Dadurch ist zwar die Gefahr einer nachteiligen Immunreaktion minimal, jedoch erfordert diese Methode einen hohen technischen und medizinischen Standard. Das hat zur Folge, dass die Therapie immer langfristig vorbereitet werden muss und damit nur einem begrenzten Personenkreis zugänglich ist.

Weniger aufwendig ist der Einsatz von Zellen, die von der gleichen Spezies, aber nicht vom gleichen Individuum stammen (allogene Zellen). Diese können bereits Wochen oder Monate im voraus für eine Behandlung vorbereitet, optimiert und bis zum Tag der Anwendung gelagert werden. Die Verwendung von allogenen Zellen setzt jedoch voraus, dass diese zumindest den gleichen HLA-Typ wie der Empfängerorganismus haben, d.h. die Zellen müssen die zur gleichen Gruppe gehörenden Oberflächenproteine, die für die Antigenpräsentation verantwortlich sind, tragen (Guarini et al., 1995). Mit dieser Methode wurde unter anderem versucht durch eine Expression des Cytokins IL-2 in allogenen Krebszellen eine Immunisierung gegen verschiedene Krebsarten, wie z.B. gegen Melanome (Guarini et al., 1995) oder Nierenzellkarzinome (Schendel et al., 1993) zu erreichen. Unter Umständen können jedoch allogene Zellen eine unerwünschte Immunreaktion herbeiführen, die gegen die Antigene der fremden Zelle gerichtet ist (Bordignon et al., 1999).

iii Zellen in einer immunoprotektiven Umgebung

Um nicht-autologe Zellen vor den Angriffen des zellulären Immunsystems (T-Zellen, Natürliche Killerzellen) zu schützen und um einer entzündlichen Reaktion des Patienten vorzubeugen, können Zellen vor dem Immunsystem geschützt werden. Dazu werden sie in Kapseln mit einer definierten Porengröße eingebettet und am gewünschten Ort im Körper platziert. Die poröse Kapselwand gewährleistet einen Stoffaustausch mit dem umgebenden Gewebe, verhindert jedoch ein Eindringen oder Freisetzen von Zellen (Chang, 1997; Chang and Prakash, 1998).

Kapseln aus Alginat, die Insulin produzierende Zellen des endokrinen Pankreas enthielten, wurden bereits in Diabetespatienten implantiert. Die enkapsulierten Zellen waren über Monate lebensfähig und produzierten Insulin. Dabei reichte die Menge an Insulin aus um die Patienten über einen Zeitraum von neun Monaten unabhängig von exogenem Insulin zu machen (Soon-Shiong et al., 1994).

Als Beispiele, bei denen gentechnisch veränderte Zellen in einer immunprotektiven Umgebung wirkungsvoll *in vitro* und in Tiermodellen einen therapeutischen Effekt zeigten, sind die Produktion von Hormonen zur Behandlung von Zwergwüchsigkeit, von neurotrophen Faktoren für amyotrophe Lateralsklerose, von β -Endorphin zur Schmerzstillung, von Faktor XI für Hämophilie B und von Nervenwachstumsfaktoren zum Schutz von Neuronen zu nennen (Chang and Prakash, 1998).

1.4 Virale Transfervehikel

1.4.1 Adenovirale Vektorsysteme

Adenoviren besitzen ein doppelsträngiges Genom von 36 kb, das für die viralen Proteine kodiert. Das Kapsid von Adenoviren kann maximal 105 % des viralen Genoms aufnehmen. Damit können nur 1,8 bis 2 kb zusätzliche DNA untergebracht werden ohne virale Sequenzen deletieren zu müssen (Hitt et al., 1997; Kozarsky and Wilson, 1993). Da die Sequenzen in der Regel essentiell für die Virusreplikation sind, müssen bei einer Deletion von Teilen des Genoms die entsprechenden Genprodukte *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Diese können bei kleinen Deletionen durch eine Verpackungszelllinie oder bei größeren Sequenzverlusten durch einen wildtyp Helfervirus ersetzt werden (Hitt et al., 1997). Die Produktion von Adenoviren endet immer mit der Lyse der Zelle und der Freisetzung der reifen Virionen. Solche Adenovirale Vektoren (ADVs) erreichen einen Titer von ca. 10^8 bis 10^{10} pro Milliliter. ADVs infizieren ein weites Spektrum an sich teilenden und ruhenden Zellen (Kozarsky and Wilson, 1993). Nach der Infektion einer Zielzelle gelangt das Nukleocapsid in den Zellkern wo die extrachromosomale Transkription und Replikation abläuft. ADVs können, bedingt durch Deletion essentieller Sequenzen, sich nicht mehr vermehren oder die Zelle verlassen. Trotzdem bewirken die in der Zelle produzierten viralen Fremd-Proteine häufig eine Reaktion des Immunsystems im Wirtsorganismus. Eine damit verbundene entzündliche Reaktion kann mit unangenehmen Nebenwirkungen verbunden sein. Dabei wird die infizierte Zelle in der Regel durch das Immunsystem eliminiert und ein immunologisches Gedächtnis gegen die viralen Antigene im Körper aufgebaut (Hitt et al., 1997). Da Adenovirale Vektoren nicht in das Wirtsgenom integrieren, also auch nicht an Tochterzellen weitergeben werden, sinkt innerhalb von Wochen die Expression des übertragenen Gens. Eine erneute Infektion kann jedoch, bedingt durch das stimulierte Immunsystem, ineffektiv sein (Hitt et al., 1997). Auf der anderen Seite ist mit dem extrachromosomalen Zustand von ADVs das Risiko einer nachteiligen Veränderung der Zelle durch eine zufällige Integration der viralen DNA in das Genom der Zelle minimiert (Channon and George, 1997).

1.4.2 Adenoassoziierte Vektorsysteme

Adenoassoziierte Viren (AAVs) sind kleine lineare Einzelstrang-DNA-Viren, welche zur Familie der Parvoviren gehören. AAVs können ausschließlich in der Anwesenheit von Helferviren wie Adenoviren oder Herpesviren replizieren. Jedoch gibt es inzwischen auch ein Verpackungssystem, bei dem die nötigen Helferfunktionen mit einem Plasmid in die Zelle eingebracht werden können (Collaco et al., 1999). Bei Deletion aller AAV-Sequenzen bis auf die minimal-notwendigen *cis*-aktiven Bereiche können AAVs bis zu 4,5 kb Fremd-DNA in ihr Kapsid aufnehmen. Das wildtyp Virus (wt) scheint eine Präferenz für eine ortsspezifische Integration auf Chromosom 19 zu besitzen, wo es häufig unter Bildung von Konkatermen und anderen Rearrangements integriert (Giraud et al., 1995; Linden and Berns, 1997; Muzyczka, 1994; Samulski, 1993). AAV-Vektoren, denen das virale Protein rep78 fehlt integrieren rein zufällig in das Wirtsgenom (Linden and Berns, 1997). Da der Großteil des Genoms bei AAV-Vektoren deletiert ist, verursacht der Vektor keine oder nur eine geringe Immunantwort (Pearson et al., 1998). AAVs besitzen ein weites Infektionsspektrum, wobei sie sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen infizieren können. Das größte Problem bei AAVs ist jedoch die Erzeugung von ausreichenden Mengen an Helfervirus freien AAV-Vektoren für die klinische Anwendung (Grimm and Kleinschmidt, 1999).

1.4.3 Herpesvirale Vektorsysteme

Herpesviren sind DNA-Viren mit einem Genom zwischen ca. 100 - 250 kb. Sie können lebenslang extrachromosomal im Nukleus als zirkuläre DNA persistieren, jedoch sind sie sehr divers bezüglich Genomgröße, Zelltropismus und Pathogenese, sowie in ihrem unterschiedlichen Potenzial therapeutische Gene zu übertragen (Efstathiou and Minson, 1995). Herpesvirale Vektorsysteme basieren vor allem auf dem Herpes Simplex Virus (HSV) oder Epstein-Barr Virus (EBV). Im Falle von HSV ist es möglich, durch Deletion nicht essentieller Sequenzen und Ausnutzung der gesamten Verpackungskapazität der Kapside bis zu 40 kb zu übertragen (Glorioso et al., 1997). Bis jetzt sind herpesvirale Vektoren jedoch noch nicht ausreichend charakterisiert um sie in klinischen Studien anwenden zu können. Die am meisten Erfolg versprechende Anwendung liegt bei der Infektion von ruhenden Zellen, wie z.B. Neuronen mit HSV und/oder unter Ausnutzung des Gewebetropismus (bei HSV: Neuronen, bei EBV: B-Zellen) (Glorioso et al., 1997). Im weiteren kann die cytotolytische Aktivität der herpesviralen Vektoren bei der Replikation zur Therapie von verschiedenen Tumorerkrankungen angewendet werden (Aghi et al., 1999; Chase et al., 1998). Herpesviren haben spezielle Strategien entwickelt um der Immunantwort zu entkommen. HSV z.B. produziert sehr früh im viralen Lebenszyklus

(*immediate early*) ein Protein (ICP47), das die Antigenpresentation durch *major histocompatibility complex* (MHC)-I-Moleküle inhibiert und damit die infizierte Zelle für cytotoxische T-Zellen weitgehend unsichtbar macht (Glorioso et al., 1997).

1.4.4 Retrovirale Vektorsysteme

A Retroviren

Retroviren besitzen umhüllte Nukleokapside mit einem Durchmesser von 80-130 nm. Ein Retrovirus, wie das Murine Leukämie Virus (MLV) besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen, mit einer Größe von 8,2 kb (Uckert and Walther, 1994; Webster and Granoff, 1994) und einer zentral lokalisierten Nukleoprotein-Struktur (*core*), die von einer Membran mit viralen Glykoproteinen und zellulären Membranproteinen umhüllt wird. Retrovirale Partikel (Virionen) infizieren Zielzellen durch spezifische Interaktion der viralen Glykoproteine mit einem zellulären Membranprotein, das als Rezeptor dient (Uckert and Walther, 1994). Nach dem Eindringen des Virions in die Zelle, wird die Membranhülle entfernt (*uncoating*) und der virale *core* in das Cytoplasma entlassen. Hier werden die beiden Kopien der viralen RNA als Matrize für die Reverse Transkription verwendet um eine doppelsträngige DNA-Kopie zu synthetisieren (vgl. Abbildung 8A). Die lineare DNA wird in den Nukleus geschleust und in eine zirkuläre Form überführt um dort durch die virale Integrase in die Wirts-DNA eingebaut zu werden (Uckert and Walther, 1994). Die integrierte doppelsträngige DNA des Retrovirus wird als Provirus bezeichnet. Dieses wird wie alle anderen Wirtszellgene exprimiert und stabil an jede Tochterzelle weitergegeben (Uckert and Walther, 1994).

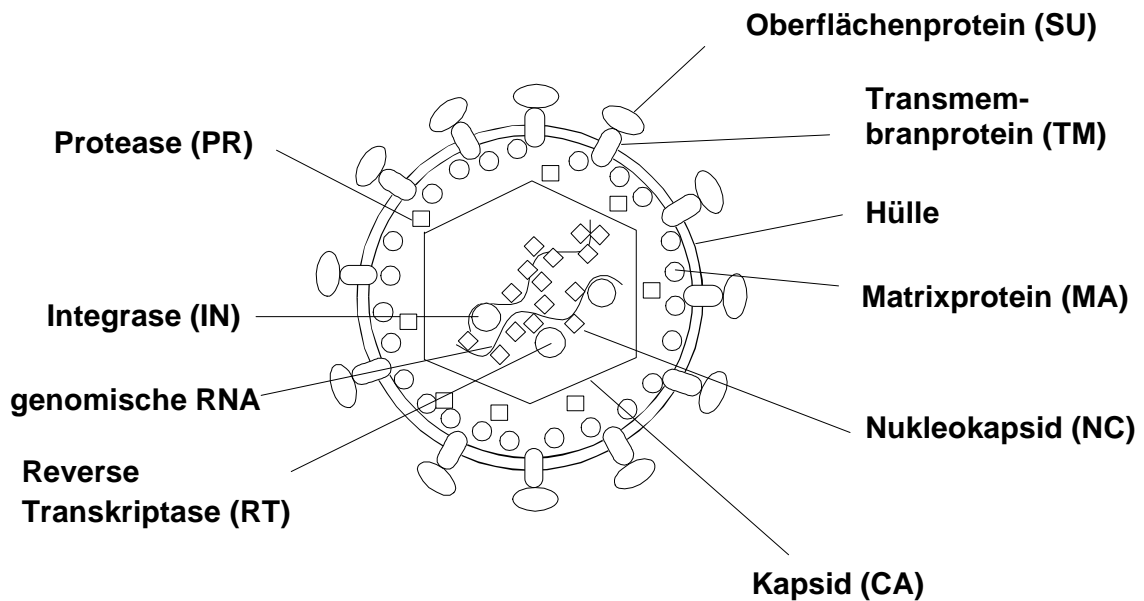


Abbildung 7: Struktur eines retroviralen Virions

Diese schematische Darstellung zeigt die relative Lage der einzelnen viralen Komponenten (aus (Günzburg and Salmons, 1997) verändert)

Die RNA von MLV codiert für drei Gene: 1.) das gruppen-spezifischen Antigen (*gag*) der inneren Strukturproteine, 2.) das Polymerase Gen (*pol*) für die reverse Transkriptase (RT) Protease (PR) und Integrase (IN) sowie 3.) das Hüllproteingen (*envelope, env*), das für das Transmembranprotein (TM) und das Glykoprotein (*surface, SU*) der Virushülle codiert (vgl. Abbildung 8B). Die *gag*- und *pol*-Proteine werden als Polyproteinvorläufer von den Transkripten genomischer Länge translatiert. Durch proteolytische Prozessierung werden diese Vorläuferproteine Stück für Stück in die reifen *gag*-Proteine (*matrix MA, capsid CA, nucleocapsid NC*) und *pol*-Proteine (RT, IN) gespalten. Dies ist ein autokatalytischer Prozess, bei dem die Proteasedomäne (PR) des Vorläuferproteins beteiligt ist.

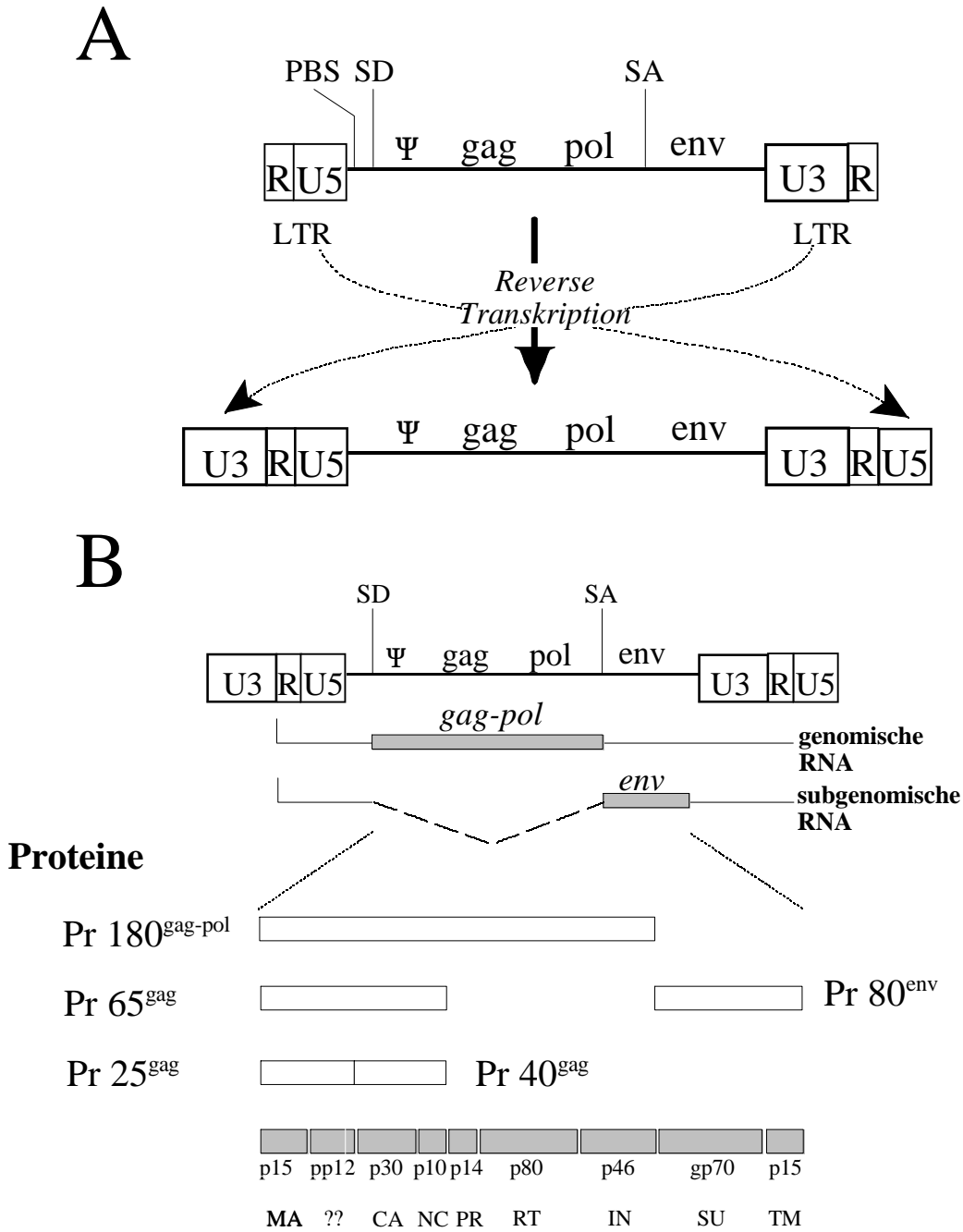


Abbildung 8: Struktur und Proteinsynthese von MLV

(A) Struktur des MLV-Genoms vor und nach der reversen Transkription: Die Reverse Transkriptase startet an der Primerbindestelle (PBS) und schreibt die RNA in doppelsträngige DNA um. Während der reversen Transkription wird die U3-Region in den 5'-LTR kopiert und die U5-Region in den 3'-LTR. Das resultierende virale Genom besteht aus doppelsträngiger DNA mit zwei identischen LTRs. (B) Transkription des integrierten Provirus, Translation der Polyproteine und Prozessierung: Beginnend vom 5'-Ende der R-Region startet die Transkription unter Bildung einer genomischen RNA. Ein Teil der RNA-Moleküle wird zwischen Spleissdonor (SD) und Spleissakzeptor (SA) zur subgenomischen RNA verkürzt. Das nach der Translation resultierende gag-pol Polyprotein wird durch die Proteasedomäne (PR) in seine einzelnen Polypeptide gespalten. Das env-Polyprotein wird erst im fertigen Virion nach einer Reifespaltung in die SU und TM-Domäne prozessiert. Weitere verwendete Abkürzungen: Ψ (Verpackungssignal); R (*direct repeat*), gag (gruppenspezifisches Antigen), pol (Polymerase), env (*envelope*) (aus (Günzburg and Salmons, 1997))

Während die viralen Gene *gag* und *pol* von einer genomischen RNA codiert werden, wird das *env*-Gen von einer gespleissten subgenomischen RNA translatiert (vgl. Abbildung 8B). Durch eine spezifische Interaktion zwischen der NC-Domäne des *gag*-Polyproteins und einer Region der genomischen RNA (Ψ -Region), wird ein Teil der synthetisierten ungespleissten RNA als virales Genom in Viruspartikel verpackt. Die reifen Viruspartikel (vgl. Abbildung 7) knospen (*budding*) aus der zellulären Membran unter Einlagerung von Hüllproteinen (Uckert and Walther, 1994).

Das Provirus enthält zwei lange terminale Repetitionen (LTRs), deren Sequenzen bei der Regulation und Expression des viralen Genoms beteiligt sind. Ein LTR wird in drei Regionen unterteilt (U3, R, U5) (Fields and Knipe, 1991). Die U3-Region besitzt neben *cis*-aktiven Elementen für die reverse Transkription essentielle Bereiche für die Integration und die transkriptionell aktiven Regulatorelemente des Virus. Die R-Region wird im Falle von MLV durch den Startpunkt der Transkription sowie die Polyadenylierungsstelle definiert und ist auf der RNA bei allen Retroviren terminal redundant. Die U5-Region enthält die essentiellen Sequenzen für die Integration und den Startpunkt der reversen Transkription (Primer-Bindestelle, PBS). Die LTRs zeigen auf der genomischen RNA die Struktur R-U5 im 5'-LTR bzw. U3-R im 3'-LTR. Bei der reversen Transkription kommt es zu Rearrangements, bei denen die U5-Region des 5'-LTRs in den 3'-LTR und die U3-Region des 3'-LTRs in den 5'-LTR kopiert wird. Dadurch entsteht ein DNA-Virus mit zwei identischen LTRs (vgl. Abbildung 8A) (Fields and Knipe, 1991).

B Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind Abkömmlinge von replikationskompetenten wildtyp Retroviren, bei denen ein Teil des Genoms (*gag*, *pol*, *env*) durch andere Gene, die in eine Zelle eingeschleust werden sollen, ersetzt wurde. Aus diesem Grund bestehen alle retrovirale Vektorsysteme aus 1.) einem replikationsunfähigen rekombinanten retroviralen Vektor, der die *cis*-aktiven viralen Sequenzen (beide LTRs, PBS für die reverse Transkription, das Verpackungssignal Ψ) enthält und 2.) einer Zelle, die die retroviralen Funktionen (Strukturproteine) *trans*-komplementiert (Verpackungszelle). Diese beiden Komponenten erlauben die Produktion von rekombinanten Virus-Vektor Partikeln, die in der Lage sind Zielzellen zu infizieren (Uckert and Walther, 1994).

Bei den einfachsten retroviralen Vektoren wurden die Strukturproteine (*gag*, *pol*, *env*) deletiert und durch ein oder zwei Fremdgene ersetzt. Dabei stehen beide Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des viralen Promotors im 5'-LTR. Das erste Gen wird von Transkripten genomischer Länge (analog zum *gag-pol-env*-Transkript) und das zweite Gen als gespleisstes Transkript (analog dem *env*-Transkript) exprimiert (vgl. Abbildung 9A). Das zweite Gen kann aber auch von einem internen heterologen Promotor entweder in *sense*- (vgl. Abbildung 9B i) oder in *antisense*-Orientierung (vgl. Abbildung 9B ii) anstelle der *gag*-, *pol*- und *env*-Gene exprimiert werden. Doppel-Kopie (*double copy*) retrovirale Vektoren tragen häufig ein Gen, das mit einem Promotor

in der U3- oder R-Region des 3'-LTR inseriert ist. Nach Verpackung der RNA des Vektorgenoms und der Infektion von Zellen mit diesen Partikeln wird durch reverse Transkription doppelsträngige DNA synthetisiert, wodurch das entsprechende Gen verdoppelt wird, so dass im 5'-LTR ein zweite Kopie vorliegt (vgl. Abbildung 9C).

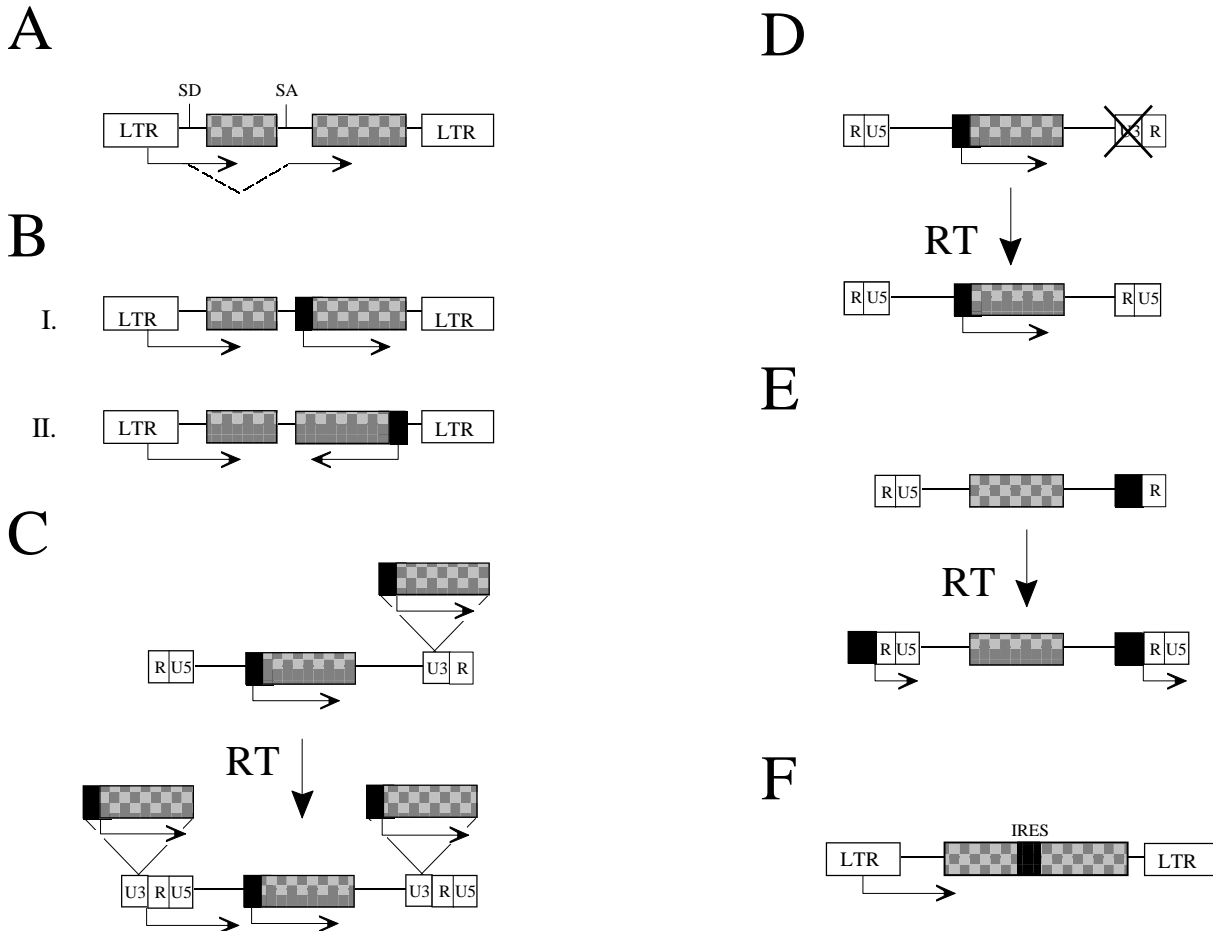


Abbildung 9: Grundtypen verwendeter retroviraler Vektoren (RVs)

(A) Einfacher Vektor: trägt an Stelle von *gag*, *pol* und *env* ein oder zwei heterologe Gene (graues Viereck). Beide Gene stehen unter der Kontrolle des viralen Promotors im LTR. (B) Das zweite Gen kann von einem internen heterologen Promotor exprimiert werden. Diese Expressionskassette kann in *sense* oder *antisense* integriert sein. Das Einklonieren von heterologen Sequenzen in die U3- oder R-Region des 3'-LTR kann zu folgenden Vektoren führen: (C) Doppel-Kopie (*double copy*) RVs: Ein Gen mit Promotor wird während der Reversen Transkription (RT) in den 5'-LTR dupliziert. (D) Selbst-inaktivierender (SIN) RVs: Die Deletion der U3-Region bewirkt, dass nach der RT der 5'-LTR keine Promotoraktivität hat. Das heterologe Gen wird ausschließlich vom heterologen Promotor exprimiert. (E) Promotorkonversion (ProCon) RVs: Die U3-Region des 3'-LTR wird gegen einen heterologen Promotor ersetzt, der nach der RT ein promotorloses heterologes Gen treibt. (F) *Internal ribosomal entry site* (IRES) RVs: Eine Expression von mehreren Genen von einem Promotor aus kann durch eine IRES bewirkt werden.

Anstatt eine komplette Expressionskassette in den 3'-LTR zu inserieren, kann die U3-Region im 3'-LTR deletiert werden. Bei diesen selbst-inaktivierenden Vektoren (SIN) ist nach der reversen Transkription der virale Promotor nicht mehr vorhanden, so dass ausschließlich der heterologe Promotor vor dem inserierten Gen aktiv ist (vgl. Abbildung 9D). Retrovirale ProCon-Vektoren (Promotorkonversionsvektoren) (vgl. Abbildung 9E) tragen zur gerichteten Expression anstelle der kompletten U3-Region, die normalerweise im 3'-LTR vorliegt, heterologe Promotoren. Nach Infektion und reverser Transkription wird der heterologe Promotor in den 5'-LTR dupliziert. Dies ist dann der einzige Promotor, von dem aus die übertragenen Gene exprimiert werden können. Durch Verwendung spezifischer heterologer Promotoren kann die Expression gezielt auf bestimmte Zelltypen ausgerichtet werden. IRES-(*internal ribosomal entry site*) Vektoren (vgl. Abbildung 9F) tragen zwei Gene, die vom viralen Promotor als einzelnes Transkript exprimiert werden. Beide Gene werden von diesem Transkript translatiert. Dabei wird die Translation des zweiten Gens durch eine IRES ermöglicht (Günzburg and Salmons, 1997). Die dargestellten Vektoren entsprechen den verwendeten Grundtypen. Natürlich sind auch verschiedene Kombinationen der einzelnen Vektoren denkbar.

Retrovirale Vektoren integrieren in das Genom der Wirtszelle. Die Wirtszelle gibt den Vektor mit dem rekombinanten Gen an alle Tochterzellen weiter. Dadurch ist eine langzeitliche Expression gewährleistet. Retrovirale Vektoren übertragen zwar die genetische Information für das heterologe Gen, aber keine viralen Gene, die exprimiert werden können. Daher sind sie für das Immunsystem kaum erkennbar. Virionen, die von murinen Zellen produziert wurden, werden jedoch durch einen anderen Abwehrmechanismus im Körper, dem Komplementsystem, inaktiviert. Auch aus diesem Grund sind neuere Verpackungszelllinien humanen Ursprungs.

C Verpackungssysteme

Replikationsdefiziente retrovirale Vektoren besitzen keine viralen Strukturgene (*gag*, *pol*, *env*) und sind daher nicht in der Lage sich alleine zu vermehren. Zur Produktion von viralen Partikeln, die zur Verpackung der retroviralen Vektoren notwendig sind, müssen die viralen Strukturproteine *in trans* zur Verfügung gestellt werden. Eine Zelle, die in der Lage ist die viralen Funktionen zu transkomplementieren, wird als Verpackungszelle bezeichnet. Im Gegensatz zur Produktion von Adenoviren und adenoassoziierten Viren endet bei Retroviren die Fertigstellung von viralen Partikeln nicht mit der Lyse der Zelle, sondern die Zelle setzt kontinuierlich neue Viren frei, ohne dabei wesentlich in ihren sonstigen Stoffwechselforgängen beeinträchtigt zu sein (Günzburg and Salmons, 1997).

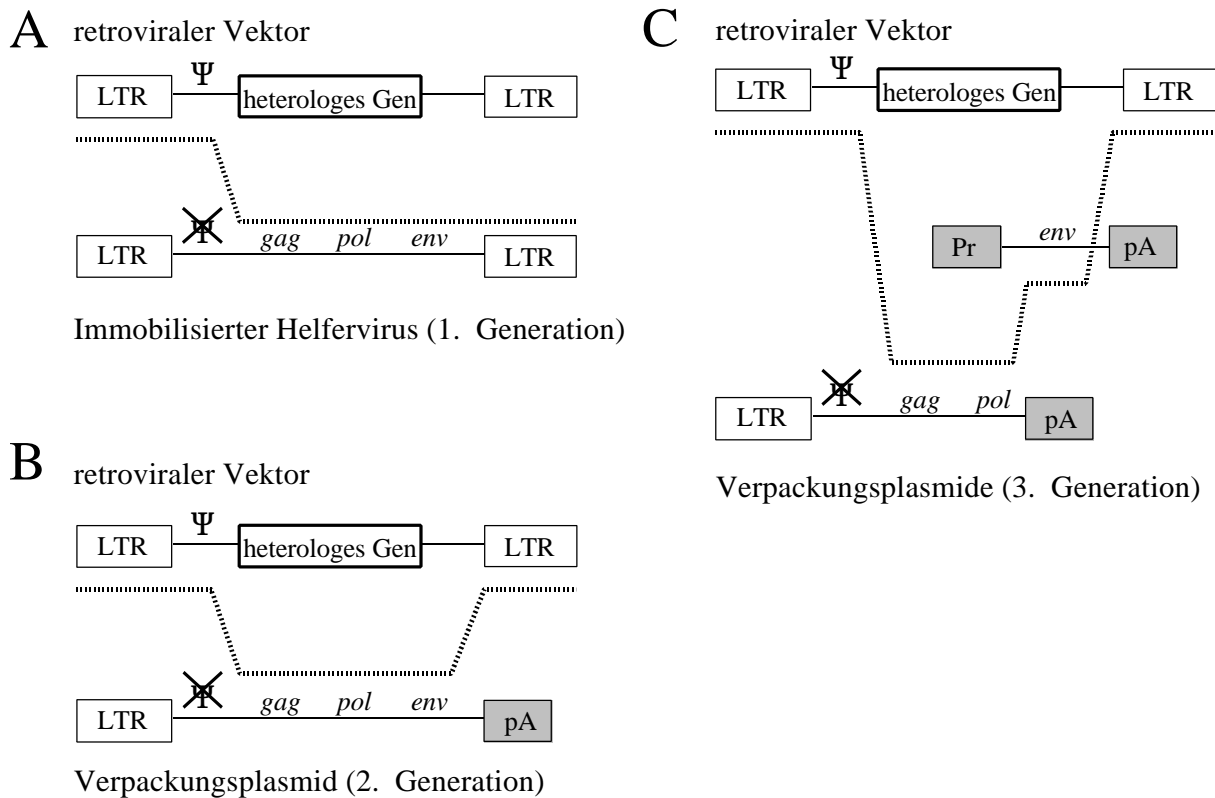


Abbildung 10: Entwicklung der Verpackungszelllinien für Retrovirale Vektoren (RV)

(A) 1. Generation: Lediglich das Verpackungssignal (Ψ) des Helfervirus wurde mutiert. Durch ein Rekombinationsereignis (gepunktete Linie) entsteht wieder ein replikationskompetentes Retrovirus (RCV). (B) 2. Generation: Zusätzlich zum mutierten Verpackungssignal wurde der 3'-LTR entfernt und durch ein heterologes Polyadenylierungssignal ersetzt. Zur Produktion eines RCV sind zwei Rekombinationsereignisse notwendig. (C) 3. Generation: Die viralen Gene liegen auf zwei getrennten Plasmiden mit heterologem Polyadenylierungssignal und teilweise heterologem Promotor (Pr). Für einen RCV sind mindestens drei Rekombinationsereignisse notwendig.

Parallel zur Entwicklung von effizienten Vektoren wurden die Verpackungssysteme immer sicherer gemacht. Bei retroviralen Vektorsystemen, bestehend aus retroviralem Vektor und Verpackungszelle, der ersten Generation gab es stets einen Anteil an replikationskompetenten Viren (*replication competent viruses*, RCV) (Cone and Mulligan, 1984). RCVs entstehen durch homologe Rekombination zwischen den viralen Sequenzen in der Verpackungszelle und dem retroviralen Vektor, wodurch ein Retrovirus mit allen für die Vermehrung essentiellen Sequenzen entsteht (vgl. Abbildung 10A). In infizierten Organismen können sie eine Virämie und eine ungewollte Genexpression bewirken (Vile and Russell, 1995). Die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von RCVs ist umso größer je länger die homologen Bereiche zwischen retroviralem

Vektor und den Verpackungssequenzen sind und je weniger Rekombinationen notwendig sind. Aus diesem Grund versuchte man, die homologen Bereiche so weit wie möglich zu deletieren bzw. durch analoge heterologe Sequenzen zu ersetzen (Vile and Russell, 1995). Bei dieser zweiten Generation waren zwei homologe Rekombinationen nötig um einen RCV zu produzieren. Dadurch war die Häufigkeit eines Auftretens von RCVs deutlich verringert, jedoch noch nicht komplett eliminiert (vgl. Abb. 10B) (Miller and Buttimore, 1986). Unter weiterer Beachtung des Sicherheitsaspekts wurden Verpackungszellen der dritten Generation entwickelt. Als weitere Sicherheitsmaßnahme wurden die Gene für *gag-pol* und *env* auf zwei separaten Plasmiden in die Zelle eingebracht. Bei dieser Generation von Verpackungszellen konnten nur drei Rekombinationsereignisse einen RCV entstehen lassen (vgl. Abb. 10C). Dies gilt aber als so unwahrscheinlich, dass mit RCVs nicht zu rechnen ist (Günzburg and Salmons, 1997; Vile and Russell, 1995). In bisherigen Untersuchungen mit Vektorsystemen der 3. Generation wurden auch noch keine RCVs nachgewiesen (Forestell et al., 1997).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Syntheseprodukt des CYP2B1-Gens katalysiert die Umsetzung von Ifosfamid in seine cytostatisch wirkenden Spaltprodukte Phosphoramidmustard und Acrolein. Die Expression von CYP2B1 findet *in vivo* fast ausschließlich in der Leber statt. Durch Transfer von rekombinanten CYP2B1-exprimierenden Zellen in den Tumor sollte es möglich sein, Ifosfamid direkt im Tumor zu aktivieren und damit eine hohe lokale Konzentration an aktiviertem Ifosfamid im Tumor mit geminderten Nebenwirkungen zu erreichen.

Um dies zu erreichen sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit die Möglichkeiten einer *in vitro*-Manipulation von geeigneten Zellen und einer anschließenden Aktivierung von IFO durch das exprimierte CYP2B1 untersucht werden. Dabei soll die Wirkung von CYP2B1 mittels geeigneter molekularbiologischer und biochemischer Methoden nachgewiesen werden. Besonderes Augenmerk soll daher auf die Untersuchung der Wirksamkeit von durch CYP2B1 aktiviertes IFO auf verschiedene Zielzelltypen gelegt werden. Dabei soll untersucht werden, wie stark sich der cytotoxische Effekt auf die CYP2B1-exprimierenden Zellen sowie auf benachbarte nicht CYP2B1-exprimierende Zellen auswirkt und wie weit bestimmte zelluläre Strukturen (*gap junctions*), die bei anderen Suizidsystemen eine entscheidende Rolle spielen, auch für das CYP2B1-System wichtig sind. Da Zellen auf verschiedenen Wegen sterben können und dies einen entscheidenden Einfluß auf das Verhalten eines Tumors bei einer Therapie haben kann, soll weiterhin der Mechanismus, der zum Zelltod führt, analysiert werden.

Als erste Strategie zum sicheren Gentransfer in Menschen soll das CYP2B1-Gen durch Expression in *in vitro* manipulierten Zellen in das Tumorgewebe eingebracht werden. Um diese Möglichkeit zu testen wird es notwendig sein, eine Kollaboration mit einer Arbeitsgruppe, die bereits ein etabliertes, aber immundefizientes Tiermodell für pankreatische Tumoren besitzt, aufzubauen und gemeinsam eine Strategie zum Einschleusen der Zellen in den Organismus zu entwickeln. Da nicht-autologe Zellen durch verschiedene Mechanismen des Empfängerorganismus sehr schnell eliminiert werden, soll eine Möglichkeit gefunden werden, um die übertragenen Zellen effizient davor zu schützen ohne die Wirksamkeit der CYP2B1 vermittelten IFO-Toxizität zu reduzieren. Hier bietet sich eine Kooperation mit der Firma Bavarian Nordic an, die eine neuartige Enkapsulierungsstrategie entwickelt hat. Im Falle eines positiven Ergebnis bei den präklinischen Versuchen am Tiermodell soll in Kooperation mit medizinischen Einrichtungen die Möglichkeit der Applikation solcher Kapseln in das humane Pankreas an einem Großtiermodell überprüft werden. Nach Demonstration der Sicherheit von enkapsulierten CYP2B1-exprimierenden in Verbindung mit IFO soll in Kooperation mit klinischen und industriellen Einrichtungen die Wirksamkeit in einer klinischen Studie der Phase I demonstriert werden.

Der Nachteil der zellulären Therapie liegt darin, dass die Aktivierung von IFO nicht in den Tumorzellen selbst, sondern durch Fremdzellen erfolgt. Dies kann eine Minderung der Effizienz und nur geringe Auswirkung auf mögliche Metastasen bedeuten. Um die Wirkung von CYP2B1 /IFO weiter zu verbessern, soll überprüft werden, ob retrovirale Vektoren in der Lage sind, das CYP2B1-Gen in pankreatische Tumorzellen einzuschleusen und damit gegenüber IFO empfindlich zu machen. Um die Wirksamkeit dieser durch Retroviren vermittelten Gentherapie *in vivo* testen zu können soll ein geeignetes immunkompetentes Tiermodell, das weitgehend die Situation im humanen Patienten widerspiegelt, etabliert werden. Mit diesem soll die Möglichkeit einer durch CYP2B1 transduzierende retrovirale Vektoren vermittelte Sensitivierung des Tumorgewebes überprüft werden. Diese Voruntersuchungen sollen als *“proof-of-concept”* für weitere Arbeiten auf diesem Sektor dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Biorad
Agarose (Elektrophoresegrad)	Gibco
6-Aminohexanonsäure	Sigma
Aminopterin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampizillin	Sigma
Annexin V-Apoptose-Kit (mit 100 x Annexin V, 10 x Bindepuffer, 10 x Propidiumiodidlösung)	Trevigen
Bisbenzamid (Hoechst 33258)	Sigma
Bleinitrat	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
BSA	Sigma
Cäsiumchlorid	Gibco
CellPfect Transfektionskit	Pharmacia
Chloroform	Sigma
Cyclophosphamid	Asta Medica
Desoxynukleosidtriphosphate	Promega
Dicumarol	Sigma
Diethylether	Sigma
Di-Kalium-Hydrogenphosphat	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
DMSO	Sigma
2-Dodecenylnsuccinylsäure	Elisabeth Gröbel
DTT	Sigma
Ectochrome 400-Filme	Kodak
Ethidiumbromid	Sigma
Ethanol	Sigma
Fastread 10, Einmalobjektträger	Madaus Diagnostik
Ficoll	Sigma

Gaze	Becton Dickenson
Giemsa	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerol	Sigma
Glyzidether	Elisabeth Gröbel
Glyzin	Sigma
4-Hydroxy-Ifosfamid	Asta Medica
Hypoxanthin	Sigma
Ifosfamid	Asta Medica
Isopropanol	Merck
Kalium-Di-Hydrogenphosphat	Sigma
Lipofectamin	Gibco
Magnesiumsulfat	Merck
Medicon	Consul ^{TS}
Methalnadid Anhydrid	Elisabeth Gröbel
Methanol	Sigma
MOPS	Sigma
Mycophenolsäure	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumcarbonat	Sigma
Natriumzitrat • 5 1/2 H ₂ O	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Osmiumtetroxid	Elisabeth Gröbel
7-Pentoxyresorufin	Sigma
Phenol	Roth
PMSF	Sigma
1,2-Propylenoxid	Elisabeth Gröbel
Qiaquick-Kit	Qiagen
Qiagen Tissue Kit	Qiagen
Qiagen Maxi Kit	Qiagen
Qiaspin Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Ready-To-Go-DNA-labelling-Kit	Pharmacia
Resorufin	Sigma
Rubidiumchlorid	Sigma
SDS	Sigma
Sephadex	Pharmacia
Silikonfett	Beckmann
Sucrose	Merck
TEMED	Sigma

Thymidin	Sigma
Toluidinblau	Sigma
TRIS	Merck
TRIS Base	Merck
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Elisabeth Gröbel
Trypanblau	Sigma
Tween	Ameresco
Uranylacetat	Sigma
Vistra Blocking Agent	Amersham
Xanthin	Sigma
X-Gal	Loewe
Xylencyanol	Sigma
Zeozin	Invitrogen

2.1.2 Medien und Zusätze

Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten	Tagga
Ampizillin	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco
Fötale Kälberserum	Gibco
Glucose	Merck
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Polybren	Sigma
Hefeextract	Gibco
Penizillin/Streptomycin	Gibco
Phleomycin	ICN
Genitizin	Gibco
Gentamycin	Gibco
RPMI 1640 Medium	Gibco
Zeozin	Invitrogen

2.1.3 Antikörper

Kaninchen IgG anti-CYP2B6 (A143)	Gentest
Kaninchen IgG anti-Ziege konjugiert mit Peroxidase (A5420)	Amersham
Ziege IgG anti-CYP2B1 (210112)	Gentest (Daichi)
Ziege IgG anti-Kaninchen konjugiert mit alkalischer Phosphatase (A143)	Gentest

2.1.4 Oligonukleotide

A Sequenzierprimer

Name	5'-3'-Sequenz
2B1seq1	CGA AGC TGC ATG AAG
2B1seq2	TCC TGG ATG CCA ATG
CAseq1	GCG GCT GCG AGT TTG ACC TT
CAseq2	CTG TCA CCT CTG CCT GTC AC
CMVseq1	GGC GTA CTT GGC ATA TGA
GKseq1	GGG TGA CCA CTT GGT ATT GA
GKseq2	AAC CAC AGG CCC TCT CAG GA
lucseq1	TTGCGCGGAGGAGTTGTGTT
ZEOseq1	AGG TCG TGT CCA CGA ACT T
polyA-1	AGG GCA CAG TCG AGG CTG AT
psi-1	TTC TCT AGG CGC CGG AA
SV40-1	GCC TGG TTG CTG ACT AA
sp6-1	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
TFseq1	TCG GCT CAC AGG TCT
TFseq2	AGG GTC CCG GAG TTT CCT AC

B PCR-Primer

Name	5'-3'-Sequenz
2Bcons	CCT TCT GCG CAT GGA GAA GGA GAA
2Bcons-c	CTG TGG GTC ATG GAG AGC TG
CMV22	TATGCCGCGGACGCGTTGACATTGATTA
CMVpk1	GGC AAG GCT TGA CCG ACA AT
CYP2B1pk1	CCG GAT CAC CGA GCT GAG AA

2.1.5 Enzyme

β-Glucuronidase/Arylsulfatase	Boehringer Mannheim
CIP (alkalische Phosphatase vom Kalb)	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Gibco, Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim
Taq-Polymerase	Perkin Elmer

2.1.6 Nukleinsäuren und Plasmide

1kb-Leiter	Boehringer Mannheim
100bp-Leiter	Gibco
pcDNA3	Invitrogen
pCMVegfp	(Walter et al., 2000)
pLXSN	Clontech
pLXSNegfp	(Klein et al., 1997)
pLXPCMTVegfp (pLESN3MP)	Klein, nicht veröffentlicht
pSVzeo	Clontech
pSW1	(Kedzie et al., 1991)
pTFβ	Löhr, nicht veröffentlicht

2.1.7 Bakterien

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), supE44, thi-1, lambda ⁻ , recA1, gyrA96, relA1, Φ 80dlacZ M15 (Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> DH10b	F ⁻ , mcr B, mrr, hsd520(r _B ⁻ , m _B ⁻), recA13, supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20 (5m ^r), xyl5, lambda ⁻ , leu, mtl 1

2.1.8 Zelllinien

293

Diese humanen embryonalen Nierenzellen tragen das 5'-Ende des Adenovirus 5 und produzieren das Adenovirus-spezifische Antigen E1A (Graham et al., 1977).

2GP19Talf8P

Die auf 293 Zellen (Graham et al., 1977) beruhende Verpackungszelllinie trägt die Expressionsplasmide für die viralen Gene *gag-pol* (pGagPolGpt, (Markowitz et al., 1988)) und *env* (pALF, (Cosset et al., 1995)) im Genom integriert und exprimiert diese stabil.

A20

A20 Zellen sind nicht adhärent wachsende B-Zellen, die aus einem Lymphom einer Balb/C Maus stammen (Kim et al., 1979).

CrFK

CrFK Zellen entstammen dem kortikalen Nierenanteil einer 10-12 Wochen alten weiblichen Hauskatze (*Felis catus*). Die Zellen haben eine epithelähnliche Morphologie und durchschnittlich 38 Chromosomen (Crandell et al., 1973).

FlyA

Die parentalen Zellen (HT1080) entstammen einem humanen Fibrosarkom. In sie wurden die Expressionsplasmide für amphotropes *env* (pALF) und *gag-pol* (pGagPol-Gpt) transfiziert. (Cosset et al., 1995)

MiaPaca-2

MiaPaca-2 Zellen entstammen einem undifferenziertem humanen pankreatischen Karzinom. Sie zeigen in hohem Ausmaß Aneuploidie und haben die Tendenz übereinander zu wachsen (Yunis

et al., 1977). Sie besitzt Mutationen in den Genen *p53*, *ras*, *Smad4* und *p16* (Chen et al., 1997; Furuwatari et al., 1998; Grau et al., 1997; Seufferlein et al., 1999)

NIH3T3

Die kontaktinhibierte Mausfibroblastenzelllinie wurde aus Mäuse-Embryo-Kulturen gewonnen (Jainchill et al., 1969)

PA317

Diese Zelllinie wurde etabliert, indem die Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 mit dem Plasmid pAM3, das ein MLV-Genom mit Deletionen in der Ψ -Region und in der Enhancerregion des 5'LTR trägt, transfiziert wurde. Weiterhin wurde die 3'LTR Region durch das Polyadenylierungssignal des SV40 Virus ersetzt (Miller and Buttimore, 1986).

PACA-44

Diese Zelllinie wurde aus dem ductalen Gewebe eines humanen exocrinen pankreatischen Tumors etabliert. Die Zelllinie ist nur moderat oder schwach differenziert. Sie enthält Mutationen im *ras*- und *p53*-Gen (Löhr et al., 1994).

PALSG/S

Es handelt sich hierbei um PA317-Zellen, die den Vektor pLXSNegfp (Klein et al., 1997) stabil integriert haben. Sie produzieren *gfp* und *neoR* transduzierende MLV-Vektoren mit einem Titer von $\geq 1 \times 10^6$ pfu/ml.

PAN02

Die Zelllinie PAN02 wurde aus einem in C57Black/6 Mäusen mit 3-Methyl-cholanthrene induzierten ductalen pankreatischen Tumor gewonnen. Sie zeichnet sich durch einen hohen Dedifferenzierungsgrad und eine weitreichende Resistenz gegenüber den meisten Cytostatika einschließlich Cyclophosphamid (CPA) aus (Corbett et al., 1984).

PANC1

Die Zelllinie PANC1 wurde aus dem ductalen Gewebe eines humanen pankreatischen Karzinoms etabliert. Die epithelioide Zelllinie besitzt 63 Chromosomen, hat eine Verdopplungszeit von ca. 52 h und besitzt die typischen Merkmale einer transformierten Zelllinie (Lieber et al., 1975). Sie besitzt Mutationen in den Genen *p53*, *ras*, *p16* aber nicht in *Smad4* (Chen et al., 1997; Furuwatari et al., 1998; Grau et al., 1997; Seufferlein et al., 1999)

Rin5

Diese Zelllinie entstammt endokrinen Tumorzellen einer Albinoratte des NEDH Stammes. Der Tumor wurde durch Bestrahlung des endocrinen Pankreasgewebes induziert (Insulinom). Er bestand vor allem aus Granula-reichen β -Zellen, die Insulin produzierten (Chick et al., 1977,

Gazdar, 1980 #518).

Vero

Vero-Zellen wurden 1962 aus der Niere eines erwachsenen afrikanischen „*green monkey*“ (*Cercopithecus aethiops*) von Yasamura und Kawakita etabliert (Vanderzant and Splittstoesser, 1996). Sie sind hypodiploid und für eine Vielzahl an human-pathogenen Viren z.B. Influenza empfänglich (Pugachev et al., 1997).

2.1.9 Mäuse

C57BL/6JO1aHsd-Mäuse (Harlan Winkelmann)

Eine Maus dieses immunokompetenten Inzuchtstamms ist der Ursprung der pankreatischen Tumorzelllinie PAN02. Da C57Black/6 Mäuse syngam mit PAN02-Zellen sind, eignen sie sich als immunkompetentes Tiermodell für Pankreaskarzinome (Artzt, 1972).

Nacktmäuse, CD1^R nu/nu (Charles River)

Nacktmäuse bilden, verursacht durch einen genetischen Defekt, nur einen rudimentären Thymus. Dies hat zur Folge, dass nur sehr wenige reife T-Zellen produziert werden. Der genetische Defekt ist eng verbunden mit der Haarproduktion, wodurch die Mäuse auch kein Fell besitzen (Holub et al., 1975).

C.B.17/IcrHsd-scid-bg-Mäuse (Harlan Winkelmann)

Diese Mäuse tragen die SCID-Mutation, welche zu einer schweren kombinierten Immunkrankheit („*severe combined immune deficiency*“) führt. Durch diese Krankheit ist die Differenzierung der T- und B-Zellen stark gestört, was dazu führt, dass kaum Lymphozyten vorhanden sind (Bosma et al., 1983). Zusätzlich zur SCID-Mutation tragen die verwendeten Mäuse noch die *beige*-Mutation. Diese bewirkt eine Dysfunktion bei der Bildung von Lysosomen. Dadurch wird unter anderem die Freisetzung von proteolytischen Enzymen der Natürlichen Killer- (NK-) Zellen unterbunden (Spicer et al., 1981).

2.2 Methoden

2.2.1 Mäuse

A Haltung von Mäusen

Die Mäuse wurden mit Alleinfuttermittel (Tagga) gefüttert. Sowohl das Futter als auch das H₂O wurden den Tieren *ad libidum* zur Verfügung gestellt. Für die Scid/bg- und die Nacktmäuse wurden das Futter und das H₂O vorher autoklaviert.

B Etablierung von Tumoren

<i>Injektionsmedium</i>	50 Einheiten/ml Penizillin 50 µg/ml Streptomycin in DMEM
<i>phosphate buffered saline (PBS)</i>	0,21 g/l KH ₂ PO ₄ 9,0 g/l NaCl 0,726 g/l NaH ₂ PO ₄ •7H ₂ O in H ₂ O

Zur Etablierung wurden Tumorzellen aus einer subkonfluenten Flasche trypsiniert (vgl. 2.2.2 B Passagieren von Zellen) und mit Normalmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 450 x g für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Um Reste des immunogen wirkenden *fetal calf serum* (FCS) zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit 10 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und erneut pelletiert. Nach dem Resuspendieren wurden sie gezählt (vgl. 2.2.3 G Zählen von Zellen), die gewünschte Anzahl in ein neues Gefäß überführt und dieses auf 10 ml mit PBS (vgl. 2.2.2 B Passagieren von Zellen) aufgefüllt. Nach Abzentrifugation der Zellen wurden diese in 0,2 ml Injektionsmedium pro Injektion in einer 1 ml-Insulinspritze aufgenommen.

Die Maus wurde mit Diethylether ca. 20-30 sec betäubt und die Einstichstelle mit Desinfektionsmittel benetzt. Die Zellen in der Spritze wurden durch mehrmaliges Invertieren gemischt, die Nadel (23G x 1.1/4") 1 cm subcutan an der Flanke vorgeschoben und 0,2 ml Zellsuspension eingespritzt. Die Tumoren entwickelten sich je nach Maus- und Zelltyp nach 2 bis 6 Wochen.

C Rekultivierung von Tumoren

Bei der Rekultivierung von Tumoren werden Tumorzellen isoliert und können *in vitro* analysiert und modifiziert werden.

NM/PenStrep

100 Einheiten/ml Penizillin

100 µg/ml Streptomycin

in Normalmedium (vgl. 2.2.2 A)

Zur Rekultivierung der Tumorzellen wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, das Tumorgewebe entnommen, kurzzeitig bis zur weiteren Aufbereitung in NM/PenStrep aufbewahrt und anschließend mit einem scharfen Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Tumorstücke in ein Medicon (50 µm Porengröße) überführt, dieses in einer Medimachine (DAKO) 10 s zerkleinert und anschließend das zerkleinerte Tumorgewebe in eine 25 cm² Flasche mit NM/PenStrep überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS (vgl. 2.2.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen) gewaschen und frisches Medium zugegeben.

2.2.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

A Kultivierung

Normalmedium

95 % Dulbecco's modified Eagles's minimal medium (DMEM, (Dulbecco and Freeman, 1959)) mit GlutaMAXTM

5 % Fötale Kälberserum

A20-Medium

90 % RPMI 1640 (Moore et al., 1967)

10 % Fötale Kälberserum

0,05 mM 2-Mercaptoethanol

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C inkubiert. Die Luft enthielt 5 % CO₂ und war mit Wasserdampf gesättigt. Alle Zelllinien außer A20-Zellen wurden in Normalmedium kultiviert. Bei den Zelllinien 2GP19T bzw. 2GP19Talf8P wurde alle vier Wochen ein Medium mit HMX- bzw. mit HMX- alternierend mit Phleomycinselektion verwendet. Das Medium für PA317 besass eine zugesetzte HAT-Selektion (vgl. 2.2.3 D Selektionsmethoden).

Bei allen Zelllinien wurden Komponenten des bovine Komplementsystems im FCS durch Erwärmung auf 56 °C über 30 min inaktiviert.

B Passagieren von Zellen

Unter Passagieren versteht man das Loslösen der Zellen vom Zellkulturgefäß und die Überführung in ein neues.

<i>Trypsin/EDTA</i>	<i>8,0 g/l NaCl</i>
	<i>0,4 g/l KCl</i>
	<i>0,35 g/l NaHCO₃</i>
	<i>0,726 g/l NaH₂PO₄•7H₂O</i>
	<i>1,0 g/l D-Glukose</i>
	<i>0,2 g/l EDTA</i>
	<i>0,5 g/l Trypsin</i>
	<i>0,005 g/l Phenolrot</i>
	<i>in H₂O</i>

Um Trypsin-Inhibitoren im Nährmedium zu entfernen wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend mit einem geringen Volumen Trypsin/EDTA entsprechend der Flaschengröße (3 ml, 175 cm²; 2 ml, 75 cm²; 1 ml, 25 cm²) überschichtet und bei 37 °C wenige Minuten inkubiert. Nach Abrunden und Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde ein Aliquot der Suspension in eine neue Flasche mit frischem vorgewärmten Medium überführt. Bei Zellen, die sich nur sehr schlecht lösen, wurde der Vorgang des Ablöses beschleunigt, indem zweimal mit PBS gewaschen und nach Einwirkung des Trypsins mit der Hand gegen die Flasche geklopft wurde.

C Einfrieren von Zellen

Mit dem Einfrieren von Zellen bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff ist es möglich diese über Jahre hinweg lebensfähig zu erhalten. Um eine zerstörerische Kristallbildung in den Zellen beim Einfrieren zu vermeiden, wird dem Gefriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt.

<i>Gefriermedium</i>	<i>75 % DMEM</i>
	<i>20 % FCS</i>
	<i>5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)</i>

Die Zellen wurden trypsiniert (vgl. 2.2.2 D Passagieren von Zellen) und das Volumen mit

Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 461 x g für 5 min wurde das Zellpellet in 2 ml PBS (vgl. 2.2.2 D Passagieren von Zellen) resuspendiert und die Zellen erneut pelletiert. Das gewonnene Pellet wurde in Gefriermedium aufgenommen und in ein Gefriergefäß überführt. Es wurde versucht dabei ein Zelldichte von ca. 10^7 Zellen pro Milliliter zu erreichen. Die Zellen wurden 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend in einer auf 4 °C vorgekühlten Styroporschachtel auf -80 °C gestellt. Die Einlagerung erfolgte am nächsten Tag bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff.

D Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen in der Hand möglichst schnell erwärmt. Die Zellen wurden in ein neues Gefäß überführt, das Volumen mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 461 x g über 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert, anschließend in Nährmedium aufgenommen und in eine Flasche mit vorgewärmten Medium gegeben. Die Zentrifugationsschritte wurden durchgeführt um das DMSO aus dem Medium zu entfernen.

E Transfektion von Zellen

Die Transfektion ist eine Methode um auf chemisch-physikalischem Weg heterologe DNA in eukaryonte Zellen einzuschleusen.

i Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Die Kalziumphosphat-Kopräzipitation ist eine sehr häufig verwendete und effiziente Methode zur Einschleusung von DNA in Eukaryontenzellen. Die DNA wird mit einer Kalziumchloridlösung gemischt. Gibt man dazu noch eine Lösung, die Phosphat enthält, fällt Kalziumphosphat als Präzipitat (Niederschlag) aus. Die DNA, die auch Phosphatgruppen besitzt, fällt bei dieser Methode mit aus und wird mit dem Kalziumphosphat über Endocytose in die Zellen aufgenommen.

Puffer A

0,5 M CaCl₂

0,1 M HEPES

pH 7,0

in H₂O

<i>Puffer B</i>	<i>0,28 M NaCl</i>
	<i>0,05 M Hepes</i>
	<i>0,75 mM NaH₂PO₄</i>
	<i>0,75 mM Na₂HPO₄</i>
	<i>pH 7,0</i>
	<i>in H₂O</i>

Am Tag vor der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen in 3 ml Normalmedium in einer 3 cm-Schale ausgesät. Damit sich der für die Transfektion optimale pH-Wert einstellt, wurde das Medium drei Stunden vor der Transfektion gewechselt und die Schale wieder in den Inkubator gestellt. 10 µg Plasmid-DNA für die Herstellung stabil transfizierter Populationen bzw. 2 µg für transiente Expressionsstudien wurden mit Wasser in einem Polystyrol-Gefäß auf 240 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 120 µl Puffer A und anschließendem Mischen folgte eine Inkubation über 10 min bei Raumtemperatur. Darauf wurden 240 µl von Puffer B zugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise und gleichmäßig auf dem Medium der Zellen verteilt.

Nach 18 Stunden wurde, je nach dem Ziel des Experimentes, mit den Zellen unterschiedlich verfahren: für eine transiente Transfektion wurde das Medium gewechselt und für 48 Stunden auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen analysiert. Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurden die Zellen 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt, der Rest in eine T175 Flasche überführt und nach 24 Stunden das Medium durch Selektionsmedium ersetzt. Nach 10-14 Tagen wurden entweder einzelne Klone isoliert und weiterkultiviert oder eine Population gewonnen. Bei allen Transfektionen wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne Plasmid-DNA mit angesetzt (Mock-Transfektion).

ii Lipofektion

Bei dieser Methode wird die DNA nicht wie bei der Transfektion durch Endocytose sondern durch Membranfusion in die Zelle eingebracht. Die DNA komplexiert spontan mit dem Lipofectin in der Lösung und gelangt in Form von kleinen Vesikeln (Liposomen) auf die Membran der Zellen. Die beiden Membranen von Liposom und Zelle fusionieren, wobei die DNA in das Cytoplasma der Zelle entlassen wird (Felgner et al., 1987).

Am Tag vor der eigentlichen Lipofektion wurden 5×10^5 Zellen in eine 10 cm Petrischale eingesät. Dadurch wurde ein Konfluenz von ca. 70 % erreicht. 2 µg DNA wurden mit 100 µl Serum-freien Medium versetzt. Parallel dazu wurden 5 µl Lipofectin (*DOTMA/DOPE (1:1)*) zu 100 µl serumfreien Medium pipettiert. Beide Lösungen wurden vereinigt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl serumfreies Medium zugefügt. Der gesamte Ansatz wurde über den zweimal mit PBS gewaschenen Zellen verteilt und für 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Lipofektionsmedium gegen 2 ml Normalmedium

ausgetauscht. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsiniert und je nach Ziel des Experimentes unterschiedlich verfahren (vgl. Kalziumphosphat-Kopräzipitation).

F Infektionen

Die Infektion im ursprünglichen Sinn ist der Befall einer Zelle durch ein Virus, der anschließenden Expression der viralen Gene in der Zelle und die Produktion neuer Viren. Im engeren molekularbiologischen Sinn stellt die Infektion eine Alternative zum DNA-Transfer mittels Transfektion dar. Es handelt sich hierbei allerdings um eine Methode unter Verwendung biologischer Mechanismen, bei denen Gene mit Hilfe eines modifizierten Virus (Vektor) in Zellen eingeschleust werden. Es wurden zwei Arten von Infektionen durchgeführt. Bei beiden wurde jeweils eine Mock-Infektion mitgeführt. Das bei der Infektion eingesetzte Polybren ist ein positiv geladenes Makromolekül, das als Adapter fungiert und so den negativ geladenen Viren die Adhäsion an der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran erleichtert (Hornsby and Salmons, 1994).

i Mediumtransfer

Bei der Infektion mittels Mediumtransfer wird das konditionierte Medium von retroviralen Vektoren produzierenden Zellen auf Zielzellen übertragen. Der übertragene virale Vektor kann dann die Zielzellen infizieren.

Polybren-Stammlösung *8 mg/ml (w/v) Polybren*
in H₂O

24 Stunden vor dem Experiment wurden pro 10 cm Schale 5×10^5 Zielzellen ausgesät und in Normalmedium (vgl. 2.2.2 A Kultivierung) inkubiert. Parallel dazu wurden 1×10^6 vektorproduzierende Zellen in eine 3 cm Schale mit 3 ml Normalmedium ausgesät.

2 ml des vektorhaltigen Überstandes wurden direkt vor dem Transfer abgenommen und, um eine Übertragung von vektorproduzierender Zellen zu vermeiden, mit einem Spritzen-Filteraufsatz gefiltert (Millipore, Porengröße 0,45 μm). Danach wurden aus einer Polybren-Stammlösung 2 μl zum Virusüberstand zugegeben. Sollte ein möglichst hoher Titer erreicht werden, bei dem die Anzahl der produzierenden Zellen beliebig war, wurde zur Infektion der Überstand eines stark konfluenten Zellrasens genommen. Sechs Stunden nach dem Mediumtransfer wurden 6 ml Normalmedium zugegeben und damit die Konzentration des toxischen Polybrens erniedrigt. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsiniert und je nach erwartetem Titer 1:20 und 1:100 bzw. 1:50 und 1:250 verdünnt und nach einem weiteren Tag in Selektionsmedium gegeben.

ii Titerbestimmung

Mit der Titerbestimmung werden die Infektionsereignisse nach Infektion von Zielzellen bestimmt. Als Zielzellen für eine Titerbestimmung wurden in der Regel NIH3T3 Zellen verwendet. Da der virushaltige Überstand erst ein Tag nach dem Aussähen auf die Zellen gegeben wurde und die Zielzellen in der Zeit durchschnittlich eine Zellteilung machen, hat sich die Zellzahl verdoppelt. Daher muss mit zwei multipliziert werden. Die Berechnung wurde wie folgt durchgeführt:

Für eine stabile Infektion mit Selektion:

$$\frac{\text{Kolonien/Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2}{\text{Gesamtvolumen der Infektion (ml)}} = \text{Kolonien/ml Medium (cfu/ml)}$$

Für eine transiente Infektion mit einem *gfp* (*green fluorescent protein*) tragenden Virus wurden die Zellen mit einem FACS (*fluorescence activated cell sorter*, vgl. 2.2.4 Durchflusszytometrie) analysiert. Hierbei wurde der Titer wie folgt errechnet:

$$\frac{\text{Prozentsatz der gfp-positiven Zellen} \times \text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \times 2}{\text{Gesamtvolumen der Infektion (ml)}} = \text{Infizierte Zellen/ml Medium (cells/ml)}$$

G Selektionsmethoden

i HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Selektion (Littlefield, 1964)

Eukaryontische Zellen sind normalerweise nicht sensitiv gegenüber Aminopterin, einem der Bestandteile des HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-Mediums, das die Thymidylat-Synthetase und somit die *de novo* Synthese von Thymidin-Monophosphat hemmt. Bei Hemmung der *de novo* Synthese von Thymidin-Monophosphat gewinnt die Zelle im „*salvage-pathway*“ mit Hilfe der Thymidinkinase Thymidin-Monophosphate aus bereits synthetisierten Purinen und Pyrimidinen, die in der Zelle unter anderem auch durch den Abbau von Nukleinsäuren gewonnen werden. Zellen hingegen, die keine oder eine inaktive Thymidinkinase (*tk*) tragen, sind gegen Aminopterin sensitiv. Werden *tk*⁻ Zellen mit *tk* oder Herpes Simplex Virus (HSV)-*tk* Expressionsplasmide transfiziert, überleben nur die Zellen die HAT-Selektion, die aufgrund der Aufnahme eines funktionellen Thymidinkinasegens das Enzym Thymidinkinase synthetisieren und so den Thymidin „*salvage pathway*“ bestreiten können (vgl. Abbildung 11). Da Aminopterin

auch die Purinsynthese hemmt, enthält das HAT-Medium neben Thymidin auch Hypoxanthin, das als Quelle für die Purinbiosynthese fungiert.

1000x HAT-Medium

750 µg/ml (w/v) Hypoxanthin

50 µg/ml (w/v) Aminopterin

250 µg/ml (w/v) Thymidin

in Normalmedium

Diese Selektion wurde ausschließlich für PA317-Zellen verwendet. Da diese Zellen eine stabile Population darstellen, wurde die Selektion nur alle 10 Passagen für zwei Wochen durchgeführt.

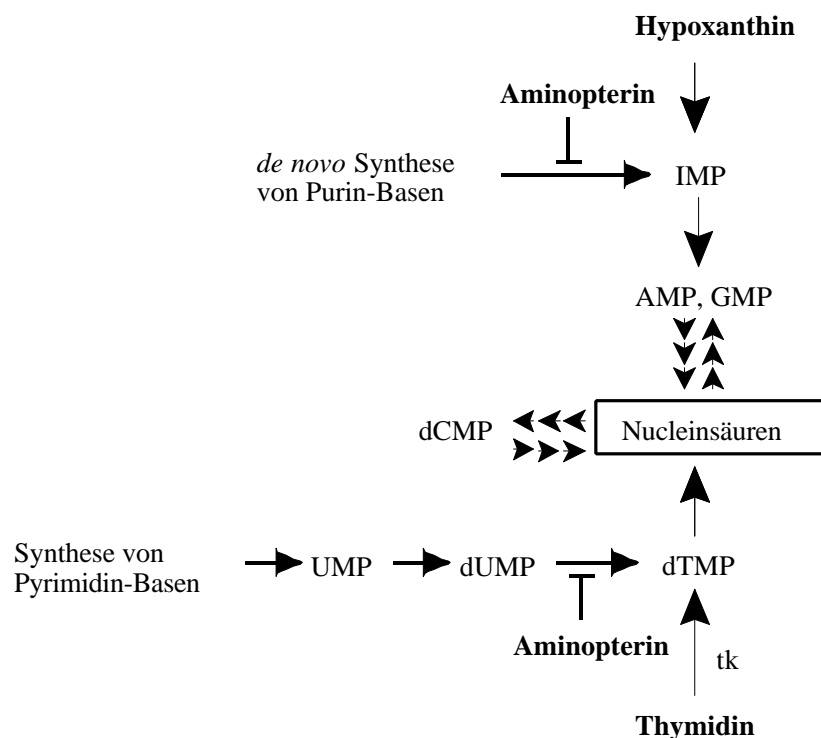


Abbildung 11: Prinzip der HAT-Selektion

AMP, Adeninmonophosphat; GMP, Guaninmonophosphat; IMP, Inosinmonophosphat; dCMP, Desoxycytidinmonophosphat; dUMP, Desoxyuridinmonophosphat; tk, Thymidinkinase; TMP, Thymidinmonophosphat; UMP, Uridinmonophosphat; XGPT, Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

ii G418-Selektion

Eukaryontische Zellen sind sensitiv für das Aminoglycosid-Antibiotikum G418, das die Proteinsynthese durch Bindung an die 80S-Untereinheit eukaryontischer Ribosomen inhibiert. Zellen, die das prokaryontische neoR-Gen für die Neomycin-Phosphotransferase II (NPT II) erhalten haben, sind resistent gegenüber dem Neomycin-Analogen G418 (Southern and Berg, 1982). NPT II phosphoryliert G418, das damit inaktiviert wird (Colbere-Garapin et al., 1981;

Colbere-Garapin et al., 1981).

G418-Medium

400 µg/ml (w/v) G418

in Normalmedium (vgl. 2.2.2 A)

Zur Selektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und gegen G418-Medium ersetzt. Eine 100 %ige G418 Resistenz stellte sich je nach Zelltyp nach ungefähr 7-14 Tagen Selektion ein (Southern and Berg, 1982).

iii HMX (Hypoxanthin-Mycophenolsäure-Xanthin)-Selektion

Im HMX-Medium können nur Zellen mit dem bakteriellen Gen für Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPT) überleben (Mulligan and Berg, 1981). Bei der *de novo* Synthese von Purin-Nukleotiden wird Inosinmonophosphat (IMP) durch die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMP-DH) zu Xanthinmonophosphat (XMP) dehydriert (vgl. Abbildung 12). Im daran anschließenden Schritt katalysiert das Enzym Xanthylat-Aminase (XTA) die Bildung von Guanosinmonophosphat (GMP) aus XMP. Mycophenolsäure ist ein Inhibitor der IMP-DH. Den damit behandelten Zellen geht das Zwischenprodukt XMP für die GMP-Synthese verloren. Das bakterielle Enzym Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (XGPT) eröffnet den Zellen eine zweiten Weg zur XMP-Synthese aus Xanthin („*salvage pathway*“). Werden zusätzlich zu Mycophenolsäure Xanthin, sowie dessen Vorstufe Hypoxanthin, zugegeben, können Zellen, die das Gen für XGPT exprimieren, überleben (Ibelgaufts, 1990).

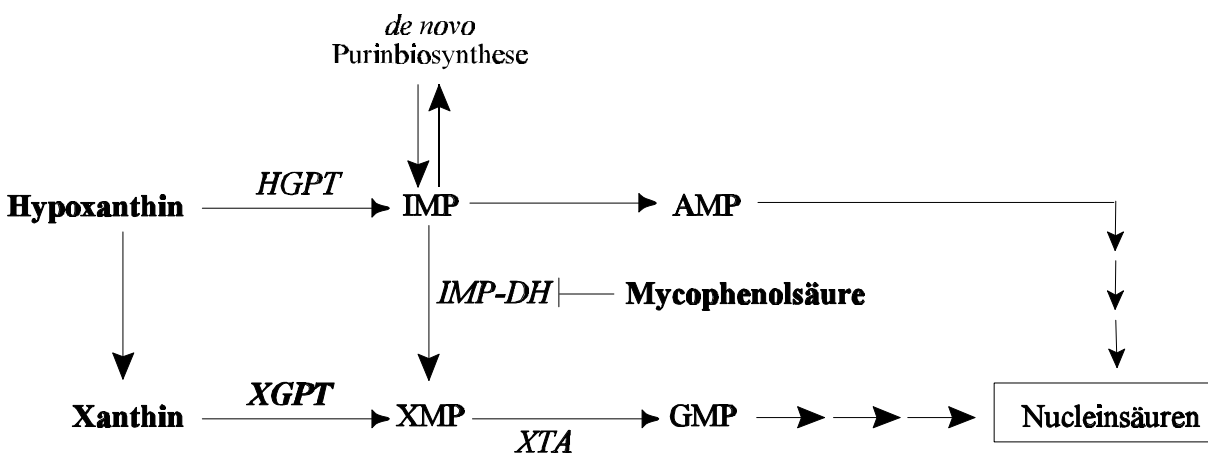


Abbildung 12: Prinzip der HMX-Selektion

AMP, Adenosinmonophosphat; GMP, Guanosinmonophosphat; IMP, Inosinmonophosphat; *HGPT*, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; *IMP-DH*, Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, XMP, Xanthinmonophosphat; *XGPT*, bakterielle Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; *XTA*, Xanthylat-Aminase, nach (Ibelgaufts, 1990) verändert.

<i>1000 x HMX-Medium</i>	<i>15 µg/ml (w/v) Hypoxanthin</i>
	<i>25 µg/ml (w/v) Mycophenolsäure</i>
	<i>250 µg/ml (w/v) Xanthin</i>
	<i>in Normalmedium</i>

Die HMX-Selektion wurde ausschließlich bei der Verpackungszelllinie 2GP19Talf8P verwendet. Es wurde analog zur HAT-Selektion verfahren.

iv Zeozin™/Phleomycin-Selektion

Die von *Streptomyces verticillus* isolierten Aminoglycoside Zeozin™ und Phleomycin gehören zur Bleomycin-Familie von Antibiotika. Die mit Cu^{2+} chelatierte Form ist inaktiv. Gelangt das Antibiotikum aber in die Zelle, wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert und durch Sulfhydrylgruppen innerhalb der Zelle entfernt. Durch den Verlust des Kupfers, wird Zeozin™ und Phleomycin aktiviert, bindet DNA, spaltet sie und verursacht den Zelltod (Sleigh, 1976).

Das in Eukaryonten und Prokaryonten aktive Protein des Resistenzgens (*Sh ble*) bindet stöchiometrisch an Zeozin™ bzw. Phleomycin und hemmt deren Wirkung. Die Resistenz zu diesem Antibiotikum wurde ursprünglich in Bakterien auf Transposon Tn5 gefunden.

<i>Phleomycin-Medium</i>	<i>50 mg/l (w/v) Phleomycin</i>
	<i>in Normalmedium</i>
<i>Zeozin™-Medium</i>	<i>100 mg/l (w/v) Zeozin</i>
	<i>in Normalmedium</i>

Da die beiden Aminoglycoside die DNA verändern und dadurch vor allem die Replikationsmaschinerie der Zelle hemmen, war es nötig, die Zellen ständig in der Teilungsphase zu kultivieren.

H Isolierung von Klonen

Zur Isolierung und Charakterisierung von einzelnen Zellklonen müssen diese einzeln von der Zellkulturschale trypsiniert werden. Dazu wurden die im Selektionsmedium gewachsenen Kolonien zweimal mit PBS gewaschen, mit einem sterilen, auf der Unterseite gefetteten Klonierungszyylinder aus Edelstahl (Durchmesser 1 cm) umgeben und mit Trypsin vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension im Zylinder wurde danach mit einer automatischen Pipette aufgesaugt und auf eine 24-Lochplatte überführt. Der Selektionsdruck wurde weiterhin

aufrecht erhalten.

I Färbemethoden

i Mycoplasmenfärbung

Eine Mycoplasmakontamination kann die Virusproduktion in Verpackungszellen reduzieren, aber auch die Infektion und Transfektion von Zellen behindern. Mycoplasmen sind intrazelluläre Parasiten, die durch Anfärbung von DNA im Cytoplasma nachweisbar sind.

<i>Methanol/Eisessig</i>	<i>25 % (v/v) Methanol</i> <i>75 % (v/v) Eisessig</i>
<i>Bisbenzamidlösung</i>	<i>50 µg/l (w/v) Bisbenzamid</i> <i>in PBS</i>

Am Tag vor der Färbung wurden $1 - 5 \times 10^5$ Zellen auf einer 6 cm Platte ausgesät. Zur Färbung wurde das Medium abgenommen und die Zellen 10 min mit Methanol/Eisessig fixiert. Der Überstand wurde abgenommen und die fixierten Zellen an der Luft getrocknet. Zum Färben wurden 3 ml Bisbenzamidlösung auf die Zellen gegeben und die Zellen 10 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurden die Zellen dreimal mit Leitungswasser gewaschen und die Schale mit den Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX70, NU-Filter) bei 360 - 370 nm Anregung, 400 nm Tellerspiegel und Emission 420 nm geprüft. Bei einer Mycoplasmenkontamination erscheint zusätzlich zum Zellkern auch das Cytoplasma blau fluoreszierend. Mycoplasmen-positive Zellen wurden verworfen und frische Zellen aufgetaut.

ii Giemsa-Färbung

Bei der Giemsa-Färbung werden fixierte und luftgetrocknete Zellen *in situ* angefärbt. Die Zellen nehmen dabei eine violette bis blaue Farbe an.

<i>Giemsa-Lösung</i>	<i>12,5 % (v/v) Giemsa</i> <i>in H₂O</i>
----------------------	--

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 30 min mit Methanol/Eisessig (vgl. 2.2.3 F Mycoplasmenfärbung) bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierflüssigkeit wurde entfernt und der Zellrasen mit handwarmer Giemsa-Lösung gefärbt. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit entfernt, die Zellen zweimal mit H₂O gewaschen und über Nacht getrocknet.

iii Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung ist eine Methode mit der die Vitalität von Zellen in Suspension bestimmt werden kann. Tote oder absterbende Zellen haben keine intakte Zellwand mehr, wodurch der Farbstoff in die Zellen eindringen kann und die Zelle im Lichtmikroskop blau erscheint. Bei einer Zählung von Zellen können somit tote Zellen ausgeschlossen werden.

Trypanblau

*0,4 % (w/v) Trypanblau
in PBS*

Das gelöste Trypanblau wurde vor der Verwendung einmal filtriert (0,2 µm Porengröße). 100 µl von trypsinierten und resuspendierten Zellen wurden mit dem gleichen Volumen einer Trypanblaulösung gemischt. Die Zellen wurden eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Lichtmikroskop analysiert. Tote Zellen erscheinen dabei blau, vitale Zellen weiß. Da der Farbstoff selbst cytotoxisch wirkt, muß die Inkubationszeit exakt eingehalten werden.

J Zählen von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert (vgl. 2.2.2 B Passagieren von Zellen) und das Trypsin durch Zugabe von serumhaltigen Medium inaktiviert. Ein kleines Aliquot der Zellsuspension wurde auf ein Einmalobjektträger gegeben und die Zellzahl in einem definierten Feld ausgezählt. Die Zellzahl multipliziert mit dem Faktor 10^4 ergab die Anzahl der Zellen in 1 ml Suspension.

2.2.3 Methoden zum Nachweis von Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) Aktivität

Hepatische Cytochrom P450-Enzyme zeigen keine sehr hohe Substratspezifität, sondern katalysieren den Metabolismus einer Vielzahl lipophiler, körpereigener oder -fremder Verbindungen. Für die von der Ratte stammende Isoform 2B1 konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedliche Verbindungen hydroxylieren kann. Dazu gehören endogene Hormone (He et al., 1995), Medikamente wie Ifosfamid (Weber and Waxman, 1993) oder andere synthetische Verbindungen wie 7-Pentoxyresorufin (Donato et al., 1993).

A Resorufin-Test

Diese Methode ist spezifisch für die Cytochrom-P450-Isoformen 2B1 und 1A1. Die Alkoxyresorufin-O-Dealkylase Aktivität dieser Isoformen dealkyliert 7-Pentoxyresorufin zu dem durch Fluoreszenz nachweisbaren Resorufin. Zugewetztes Dicumarol verhinderte die Inaktivierung durch das zelleigene Enzym Diaphorase. Um sicher zu sein, dass nach der Umsetzung sämtliche Resorufinkonjugate hydrolysiert werden, wird der Ansatz mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert (Donato et al., 1993).

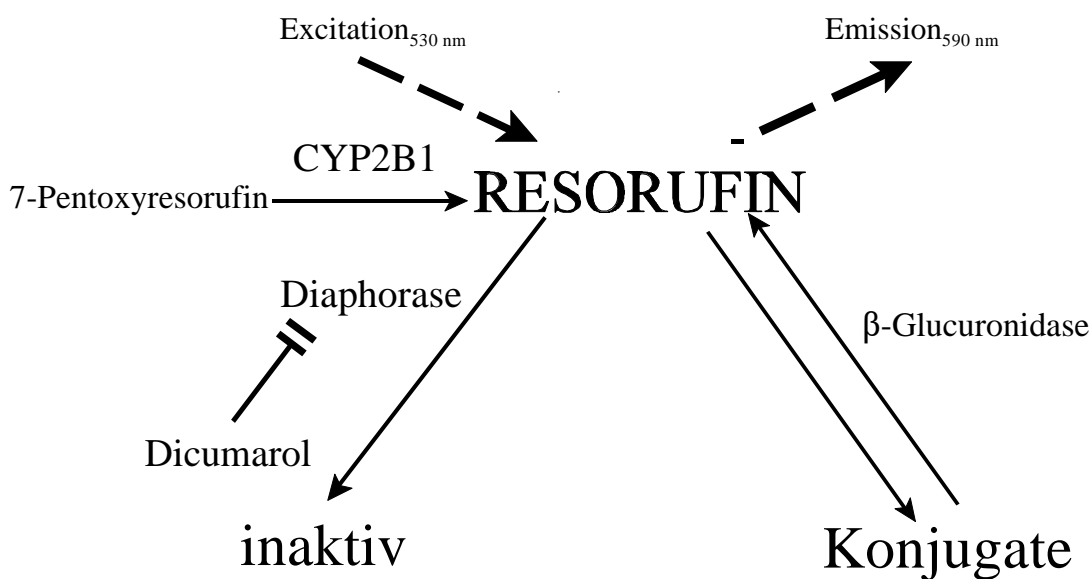


Abbildung 13: Prinzip des Resorufintests

*Lösung I**0,015 mM 7-Pentoxyresorufin**0,01 mM Dicumarol**in DMEM**Lösung II**75 Fishman Einheiten* *β -Glucuronidase/600 Roy Einheiten**Arylsulfatase**0,1 M NaAc, pH 4,5**in H₂O*

Die 7-Pentoxyresorufin- und die Dicumarolstocklösung wurden in DMSO bzw. in PBS angesetzt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in eine 3 cm Schale ausgesät, so dass am nächsten Tag der Zellrasen konfluent war. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 500 µl Lösung I überschichtet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 375 µl in ein Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 125 µl Lösung II gegeben und zusammen 3 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 100 %igen Methanol wurden die Proteine gefällt und anschließend bei 5.500 x g bei Raumtemperatur über 10 min pelletiert. Vom Überstand wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emission bei 590 nm gemessen.

Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve mit Resorufin in 375 µl Lösung I und 125 µl Lösung II hergestellt.

B Cytotoxizitätstest

Cytochrom P450 2B1 hydroxyliert Ifosfamid am C4-Atom (vgl. Abbildung 6). Durch diese Aktivierung entsteht nach einem spontanen Zerfall der Verbindung unter anderem cytotoxisches Phosphoramidmustard. Die Produktion von 4-Hydroxyifosfamid kann somit indirekt durch Absterben bzw. Wachstumsinhibition der exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Wachstumsinhibition wurde bei allen Cytotoxizitäts- und Kokultivierungsexperimenten als Überlebensrate angegeben. Diese ist definiert als Quotient zwischen der Zellzahl mit IFO-Behandlung zu der Zellzahl ohne IFO-Behandlung angegeben.

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{Zellzahl}_{+IFO} \times 100\%}{\text{Zellzahl}_{-IFO}}$$

Ifosfamidstammlösung

*200 mM Ifosfamid (Holoxan^R)
in DMEM*

Am ersten Tag des Experiments wurden entweder 4 x 10⁴ (CrFK) bzw. 1 x 10⁵ (pankreatische Zelllinien, NIH3T3) in einer 3-cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde Ifosfamid aus einer Stammlösung zugegeben und mit dem Überstand vermischt. Nach fünf weiteren Tagen wurde das Experiment ausgewertet. Dazu wurden die Zellen entweder gezählt oder mit Giemsa (vgl. 2.2.3 F Färbemethoden) gefärbt. Für die Experimente mit CrFK-Zellen wurde dazu eine Lebend-Tot-Unterscheidung durch eine Trypanblaufärbung vorgenommen. Da die toten Zellen im Überstand schwammen und beim Trypsinieren mit entfernt wurden, gab es keinen Unterschied in der Anzahl der lebenden Zellen im Vergleich mit Experimenten ohne Färbung. Aus diesem Grund wurde bei den weiteren Cytotoxizitätsexperimenten auf eine Trypanblaufärbung verzichtet.

C Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen

Die Kokultivierung ist eine Möglichkeit um die Wirkung der zu untersuchenden Zellen auf Nachbarzellen (Reporterzellen) beobachten zu können. Beide Zelltypen werden zusammen ausgesät und teilen das gleiche Medium. Freiwerdendes aktiviertes Ifosfamid beeinflusst somit auch die Reporterzellen.

i Kokultivierung mit β -Galactosidase exprimierenden Zellen

4×10^4 Cytochrom P450 2B1 exprimierende Zellen und die gleiche Anzahl an β -Galactosidase exprimierenden Reporterzellen (CK1x2 bzw. RIN1x2) wurden zusammen in einer 3 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde wie beim Cytotoxizitätstest (vgl. 2.2.3 B Cytotoxizitätstest) beschrieben, Ifosfamid zugegeben und am siebten Tag die Zellschicht mit X-gal gefärbt (vgl. 2.2.10 D Färbung von β -Galactosidase exprimierenden Zellen (Cepko et al., 1993)).

ii Kokultivierung mit egfp exprimierenden Zellen

1×10^5 egfp-exprimierende pankreatische Tumorzellen (PANC1) wurden mit der gleichen Anzahl einer gemischten Population, die aus CYP2B1 produzierenden und unveränderten CrFK-Zellen bestand, in einer 6 cm-Schale ausgesät (vgl. Tabelle 2 und Abbildung 4). Am nächsten Tag wurde Ifosfamid zu einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Am siebten Tag wurden die Zellen gezählt und der Anteil der egfp-exprimierenden Subpopulation mittels *FACS* (vgl. 2.2.4 Durchflusscytometrie) bestimmt.

#	Gruppe	PANCgfp1	C8III-1 (CYP2B1)	CrFKwt (wt)
1	PANCgfp1	2×10^5		
2	C8III-1		2×10^5	
3	CrFKwt			2×10^5
4	100 %	10^5	10^5	
5	90 %	10^5	9×10^4	1×10^4
6	50 %	10^5	5×10^4	5×10^4
7	10 %	10^5	1×10^4	9×10^4
8	0 %	10^5		10^5

Tabelle 2: Zusammensetzung der gemischten Population von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen (C8III-1) oder CrFKwt-Zellen und egfp positiven pankreatischen Tumorzellen

Normalmedium

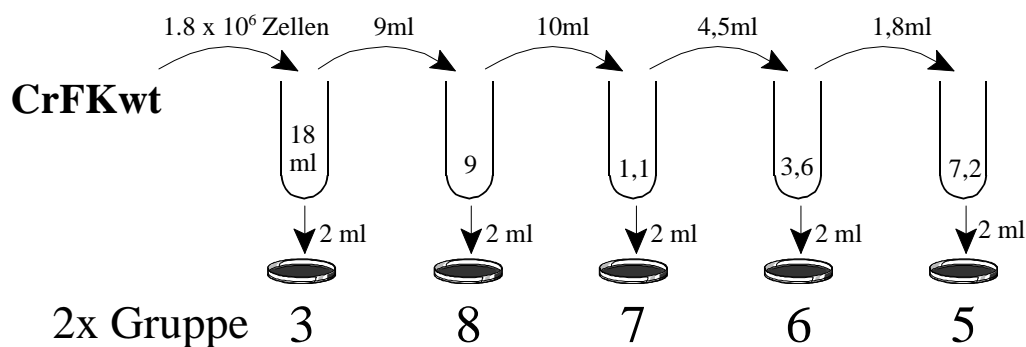
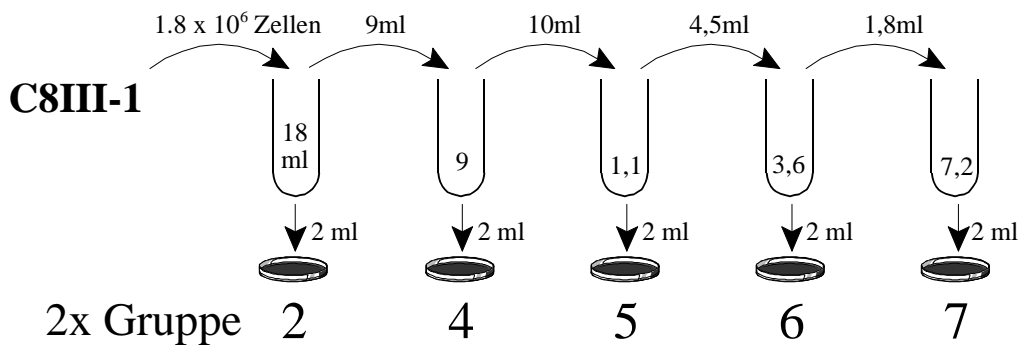
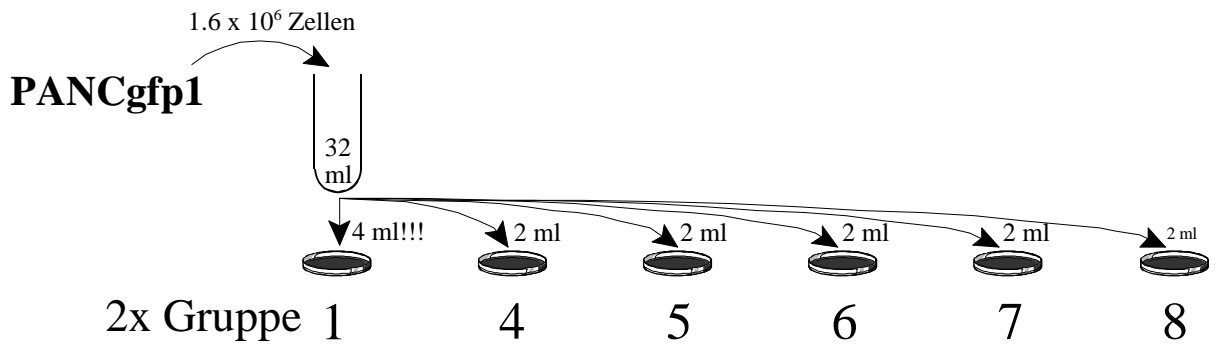
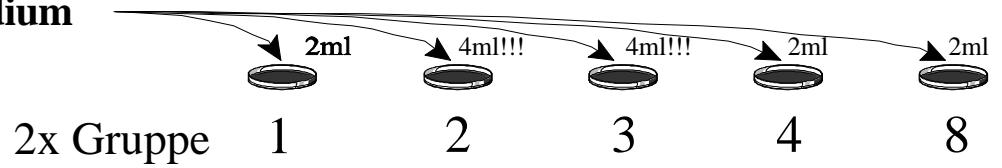


Abbildung 14: Pipettierschema für den Kokultivierungsversuch mit PANCgfp1-Zellen

Für die acht verschiedenen Gruppen des Kokultivierungsexperiments mit PANCgfp1-Zellen wurden nacheinander in je zwei Zellkulturschalen Normalmedium, PANCgfp1-, C8III-1- und CrFKwt-Zellen aus unterschiedlichen Zellsuspensionsverdünnungen in eine 6 cm-Schale pipettiert. Am nächsten Tag wurde eine der paarweise ausgelegten Schalen mit 0,5 mM IFO behandelt und am 7. Tag sowohl die verbleibende Gesamtzellzahl als auch der Anteil der PANCgfp1-Zellen bestimmt.

iii *Transwell System*

Mit dem *transwell system* ist es möglich frei diffundierbare Metaboliten, die von Zellen abgegeben werden nachzuweisen. Zwei Zelltypen teilen dabei das gleiche Medium, sind aber durch eine Membran mit 0,45 µm Poren getrennt, die zwar einen Stoffaustausch ermöglicht, aber die Ausbildung von einem direktem Zell-Zell-Kontakt unterbindet.

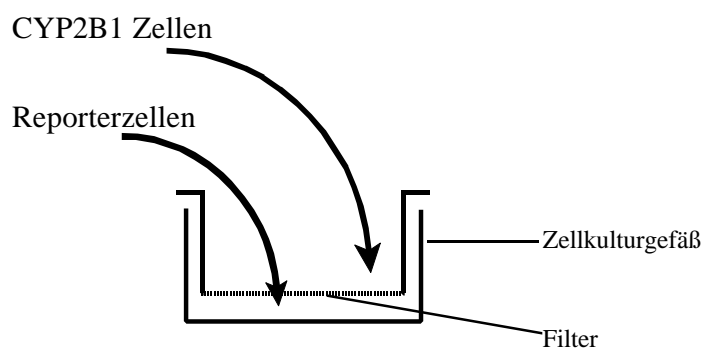


Abbildung 15: Prinzip des *Transwell System*

2×10^4 Zellen (Reporterzellen) wurden in einer 3 cm-Schale in Normalmedium ausgesät, darauf ein Transwell gegeben und im Transwell die CYP2B1 produzierenden Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wurde Ifosamid in unterschiedlicher Konzentration zugegeben und nach fünf weiteren Tage die Reporterzellen gezählt (vgl. 2.2.3 G Zählen von Zellen)

Zur Untersuchung wurden 2×10^4 Reporterzellen in ein 3 cm-Zellkulturgefäß und in das darüber eingesetzte Transwell die gleiche Anzahl an CYP2B1-exprimierenden Zellen ausgesät. Am zweiten Tag wurde IFO zu gleichen Teilen in das Transwell und in das darunter liegende Gefäß gegeben und am siebten Tag die Reporterzellen mit 0,5 ml Trypsin losgelöst, 1,5 ml Normalmedium zugegeben, vereinzelt und anschließend gezählt (vgl. 2.2.2 J Zählen von Zellen).

iv Nachweis einer IFO-Aktivierung durch verkapselte Zellen

Für einen Nachweis von toxischen Metaboliten nach einer Aktivierung durch enkapsulierte CYP2B1-exprimierende Zellen wurden jeweils 1×10^5 CrFK-Zellen als Reporterzellen in 2 ml Normalmedium in sechs 3 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde in jedes der Zellkulturgefäße ein Transwell eingesetzt. In jeweils zwei der Transwells wurden

entweder 100 Kapseln, 5×10^5 22P1G-Zellen in 2 ml Normalmedium oder nur 2 ml Normalmedium ausgelegt. Das dritte Schalenpaar erhielt 2 ml Normalmedium. Nach dem Auslegen wurde in jeweils eine Schale eines Paares IFO mit einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Am siebten Tag wurden die Transwells entfernt, die CrFK-Reporterzellen mit 0,5 ml Trypsin abgelöst und mit 1,5 ml Normalmedium gemischt. Von der Zellsuspension wurde ein Aliquot auf ein Hematocytometer pipettiert und die Zellzahl bestimmt (vgl. 2.2.3 G Zählen von Zellen).

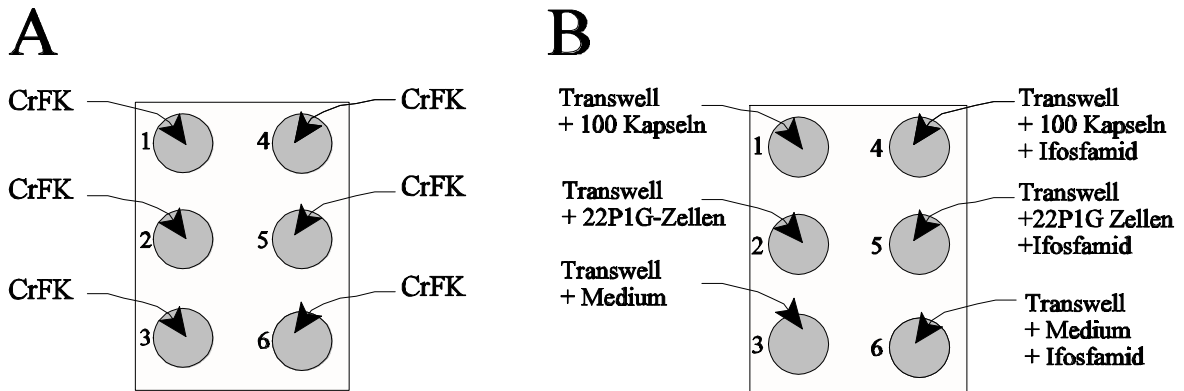


Abbildung 16: Nachweis einer IFO-Aktivierung durch verkapselte 22P1G-Zellen

Am ersten Tag des Versuchs wurden 1×10^5 CrFK-Zellen in jeweils eines von sechs 3 cm Zellkulturschalen ausgelegt (A). Am darauffolgenden Tag wurde in alle Schalen ein Transwell gesetzt und anschließend auf jeweils zwei der Transwells 100 Kapseln bzw. 5×10^5 22P1G-Zellen in Normalmedium oder 2 ml Normalmedium pipettiert. Jeweils ein Ansatz jedes Paares erhielt IFO mit einer Endkonzentration von 0,5 mM zu gleichen Teilen in das Transwell und in die darunterliegende Schale pipettiert (B).

2.2.4 Durchflusscytometrie (*fluorescence activated cell sorting* = FACS)

Die Durchflusscytometrie ist eine Methode um einzelne Zellen auf ihre Größe, Oberflächenbeschaffenheit und die Expression von bestimmten Genen untersuchen zu können. Proteine auf der Zellmembran können durch fluoreszierende Antikörper markiert und damit sichtbar gemacht werden. Noch einfacher ist der direkte Nachweis fluoreszierender Proteine wie egfp (*enhanced green fluorescence protein*).

PBS/FCS

95 % PBS

5 % FCS

Die zu analysierenden Zellen wurden trypsinisiert (vgl. 2.2.2 B Passagieren von Zellen) und mit Normalmedium auf 10 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und $400 \times g$ wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 0,5 - 1 ml PBS/FCS gut resuspendiert. Um verklumpte Zellen zu entfernen, wurde die Suspension durch eine Gaze grob

gefiltert. Zur Analyse wurde das FACScalibur (Becton Dickinson) verwendet. Dabei wurde für egfp-Analysen ein Filter für die Emission mit 530 nm (Becton Dickenson BP530/30) Wellenlänge verwendet (Parks et al., 1984).

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

A Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Guanidiniumisothiocyanat („Guano“)

Die „Guano“-Methode kann zur gleichzeitigen Gewinnung von DNA und RNA angewendet werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei dieser Methode die DNA-Ausbeute hoch ist und die DNA bei der Präparation nur wenig durch Scherkräfte degradiert wird.

<i>Guanidiniumisothiocyanat</i> („Guano“)	<i>6 M Guanidiniumisothiocyanat</i> <i>5 mM Natriumzitat</i> <i>0,1 M β-Mercaptoethanol</i> <i>0,5 % (w/v) Natrium-N-Laurylsarcosyl</i> <i>in H₂O</i>
<i>Cäsiumchlorid-Lösung</i>	<i>5,7 M CsCl</i> <i>0,1 M EDTA</i> <i>in H₂O</i>
<i>TE-Puffer</i>	<i>10 mM Tris/HCl pH 7,2</i> <i>1 mM EDTA</i> <i>in H₂O</i>
<i>SDS</i>	<i>20 % (w/v) SDS</i> <i>in H₂O</i>
<i>NaAc</i>	<i>3 M Natriumacetat pH 5,2</i> <i>in H₂O</i>
<i>Proteinase K</i>	<i>10 mg/ml (w/v) Proteinase K</i> <i>in H₂O</i>

Die adhärennten Zellen von zwei konfluenten T175 Flaschen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 7 ml „Guano“ vom Boden abgekratzt und auf 3 ml vorgelegtes Cäsiumchlorid in ein Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Nach Ultrazentrifugation bei

110.000 x g in einem Ausschwingrotor (SW41, Beckmann) bei 20 °C wurde überschüssiges Guano/Cäsiumchlorid entfernt, die viskose DNA, die sich überhalb des Cäsiumchloridkissen befindet, im doppelten Volumen H₂O aufgenommen und das Gefäß mehrfach invertiert. Die DNA wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol ausgefällt, mit einem sterilen Glashaken „herausgefischt“ und an der Luft getrocknet. Die kristalline DNA wurde in 4 ml TE-Puffer mit 100 µl 20 % SDS und 40 µl Proteinase K resuspendiert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt, danach phenolisiert und die DNA über Nacht bei -20 °C mit Ethanol gefällt. Nach Pelletierung der DNA bei 8000 x g, 4 °C und 20 min wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet und in 1 mM EDTA über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde durch OD-Messung im Photometer bestimmt (OD₂₆₀). Die Qualität der gewonnenen DNA wurde sowohl photometrisch (OD₂₆₀/OD₂₈₀) als auch durch Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5 A Restriktionsverdau) bestimmt.

B Analyse von DNA

i Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau wird unter Verwendung von sequenzspezifisch DNA schneidenden Enzymen (Restriktionsendonukleasen) die zu untersuchende DNA in Fragmente gespalten. Durch geschickte Wahl der Enzyme kann aufgrund des erhaltenen Fragmentmusters der Zustand und die Korrektheit der DNA beurteilt werden. Da die einzelnen Enzyme meist nur in einem bestimmten Ionenmilieu optimal arbeiten, muß zu jedem Enzym ein entsprechender Puffer verwendet werden. Zumeist wurden Enzyme und die dazugehörigen Puffer der Firma New England Biolabs verwendet. Teilweise wurden jedoch auch die Enzyme der Firmen Gibco und Promega verwendet.

In der Regel wurden pro Mikrogramm DNA mindestens 5 U Enzym eingesetzt. Die für eine optimale Enzymaktivität erforderlichen Pufferbedingungen wurden durch Verwendung des jeweiligen von der Firma mitgelieferten 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers eingestellt. Zur ausreichenden Verdünnung des Glycerins im Enzym-Lagerpuffer wurde der Reaktionsansatz mit H₂O auf mindestens das 10fache Volumen des eingesetzten Enzyms aufgefüllt. Die für die meisten der verwendeten Restriktionsendonukleasen optimale Temperatur betrug 37 °C und in einigen besonderen Fällen auch 25 °C oder 50 °C. Der Länge der Inkubation richtete sich zum einen nach der Aktivität, zum anderen nach der Menge des eingesetzten Enzyms und der DNA und betrug 2 bis 14 Stunden.

ii Gelanalyse

Die Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Der Bewegung der DNA-Moleküle wirkt bei der Elektrophorese die Matrix des Gels entgegen. Dabei werden große Moleküle stärker gebremst als kleine, was eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe zur Folge hat. Die DNA im Gel kann durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid ist eine fluoreszierende Substanz, die in die DNA interkaliert und durch UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 320 nm zur Fluoreszenz angeregt wird.

50 x TAE-Puffer

2 M Tris

1 mM Natriumacetat

0,1 mM EDTA, pH 8,1

in H₂O

Ladepuffer

40 % (w/v) Sucrose

0,1 % (w/v) Xylencyanol

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

in H₂O

Ethidiumbromid

1 mg/l (w/v)

in 1x TAE

Die DNA Gelelektrophorese wurde mit horizontalen 0,8 - 1,2 % Agarosegelen in 1 x TAE durchgeführt. Die Gele wurden bei Raumtemperatur mit einer Spannung von ca. 20 - 90 Volt gefahren anschließend für 20 min mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Bildverarbeitungssystem (EagleEyeII, Stratagene) photographiert.

C Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Dabei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen genutzt, durch Einbau von freien Nukleotide einen Einzelstrang zum Doppelstrang polymerisieren zu können, sofern ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Durch den Einsatz thermostabiler Polymerasen bleibt die Enzymaktivität auch bei mehrfachen Denaturierungsschritten über 90 °C weitgehend erhalten.

Für die CYP2B1 spezifische PCRs wurde ein Mastermix (Boehringer Mannheim) verwendet Er

enthielt PCR-Puffer, dNTPs und taq-Polymerase. Zu 50 µl des Mastermixes wurden 1 µl der Stocklösungen der Primer (40 µM) zugegeben. Als *template* wurde 2 µg chromosomaler DNA eingesetzt, als Positivkontrolle 10 pg des Plasmids pc3/2B1. Anschließend wurden die Reaktionen mit H₂O aufgefüllt. Als Negativkontrollen wurden Reaktionen mit jeweils nur einem Primer, bzw. ohne Template angesetzt. Das Zyklusprofil war:

5 min 94 °C,	35 x Zyklen	1 min 94 °C	
		1 min 60 °C	
		2 min 72 °C	hold 4°C

Nach Beendigung der PCR wurden 10 µl der Proben auf einem Agarosegel analysiert (vgl. 2.2.4 B Gelanalyse)

2.2.6 Klonierungsmethoden

A Präparation von DNA-Fragmenten

i Restriktionsverdau und Gelektrophorese

Für einen präparativen Verdau wurden abhängig von der Größe des gewünschten Fragments 5-10 µg Plasmid DNA eingesetzt. Es wurden ausschließlich Restriktionspuffer der Firma New England Biolabs, Promega oder Gibco in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht und wurde durch Zugabe des Ladepuffers (vgl. 2.2.4 B Analyse von DNA) abgestoppt. Da mehr als 1 µg DNA in einer normalen Geltasche zur Überladung des Gels und damit zu unsauberen Banden führen, wurden bei präparativen Gelen mehrere Zähne des Taschenkamms vor dem Gießen des Gels mit einem dünnen Klebeband überklebt, so dass eine größere Geltasche entstand. Die Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen 0,8 % - 1,2 % Agarosegelen in 1 x TAE (vgl. 2.2.4 B Analyse von DNA), je nach Größe des Fragments über 1-3 Stunden bei einer Spannung von 80 V.

ii DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen (Qiaquick Gel extraction, Qiagen)

Mit der DNA-Extraktion kann ein gewünschtes Fragment nach der elektrophoretischen Auftrennung wieder aus dem Gel gewonnen werden und steht damit zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das Gelstück mit der gewünschte Bande mit

einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Volumen von Puffer QX (Qiagen) versetzt. Bei 50 °C und ständigem Schütteln wurde die Agarose innerhalb von 10 min aufgelöst. Nach Zugabe und Mischen mit dem gleichen Volumen Isopropanol wurde die Lösung auf eine Qiaquick-Säule gegeben und die Lösung bei einer Zentrifugation von 20.000 x g durch den Filter gedrückt. Die an der Matrix der Säule gebundene DNA wurde zuerst durch Zentrifugation mit 750 µl Puffer QX und anschließend mit 500 µl Puffer PE (Qiagen) gewaschen. Danach wurden etwaige Pufferreste durch einen zusätzlichen Zentrifugationschritt abgetrennt. Auf die Säule wurden 50 µl H₂O gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die DNA bei einer weiteren Zentrifugation in ein frisches Gefäß eluiert. Die eluierte DNA wurde stets auf Reinheit und Konzentration auf einem Agarosegel überprüft.

B Aufreinigung von DNA-Fragmenten

i Phenolextraktion

Zur Erhöhung der Effizienz enzymatischer Modifikationen von DNA wurden etwaige Proteinreste durch eine Phenolextraktion entfernt.

Dazu wurde der Restriktionsansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und das gleiche Volumen wassergesättigtes Phenol zugegeben. Nach einer Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge bei 22.000 x g wurde die Wasserphase in ein neues Gefäß überführt und eine erneute Phenolisierung durchgeführt. Zur Entfernung etwaiger Phenolreste wurde die verbleibende wässrige Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gut gemischt und wieder zentrifugiert (s.o.). Die DNA in der wässrigen Phase wurde unter Zugabe von 1/10 Volumen NaAc (vgl. 2.2.5 A Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Guanidiniumisothiocyanat („Guano“)) und 2,5 Volumen Ethanol gefällt, in einer Eppendorffzentrifuge bei 22.000 x g abzentrifugiert, das verbleibende Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in einem Rotationsverdampfer getrocknet.

ii Aufreinigung mit dem *Nucleotide Removal Kit* (Qiagen)

Alternativ zur Phenolextraktion wurde der schneller durchzuführende Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen verwendet.

Zur DNA-Lösung wurde das zehnfache Volumen des mitgelieferten Puffers PN gegeben, gut gemischt, auf eine mitgelieferte Säule transferiert und 1 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Die an die Säule adsorbierte DNA wurde mit 750 µl Puffer PE und einer einminütigen Zentrifugation bei 4.000 x g gewaschen. Anschließend wurde der durchzentrifugierte Puffer entfernt und die Säule zum Trocknen 1 min bei 22.000 g zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule auf ein

frisches Gefäß gesetzt und 100 µl H₂O oder TE-Puffer auf die Mitte der Säule gegeben, Nach 1 min bei Raumtemperatur wurde die DNA bei 22.000 x g 1 min eluiert.

C Enzymatische Modifikationen von DNA-Enden

Mit Hilfe von eukaryonten und bakteriellen Enzymen ist es möglich die Enden von DNA-Fragmenten so zu modifizieren, dass sie füreinander passend sind und in einer vorbestimmten Weise miteinander rekombiniert werden können.

i „Blunt end“ Reaktion

Wenn Enden an DNA-Fragmenten für eine Ligation nicht kompatibel waren, wurden sie durch eine 5'-3'-Polymerisations- beziehungsweise 3'-5'-Exonukleasereaktion glatt (*blunt ended*) und somit ligierbar gemacht. Da die Polymerase des Bakteriophagen T4 neben der Polymeraseaktivität eine 3'-Exonukleaseaktivität besitzt, war es möglich beide Reaktionen bei gleichen Bedingungen in einem Ansatz durchzuführen.

Dazu wurde die DNA in 1x DNA-Polymerase-Puffer gelöst und 1 mM dNTPs, 1,5 µg BSA und 5 U T4 DNA Polymerase zugesetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 12 °C inkubiert und anschließend die T4-Polymerase 10 min bei 75 °C inaktiviert. Die DNA wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen NaAc (vgl. 2.2.4 A Isolierung genomischer DNA) gefällt, einmal mit 70 %igen Ethanol gewaschen und das Pellet im Rotationsverdampfer getrocknet.

ii Dephosphorylierung des Vektors

Um die Rückligationshäufigkeit eines Vektors zu minimieren, wurde dieser in der Regel dephosphoryliert. Ohne die 5'-Phosphatgruppen an den Enden der DNA kann der Vektor nicht mit sich selber ligieren (rückligieren). Ein Fragment, das jedoch noch die beiden 5'-Phosphatgruppen besitzt, kann an eine dephosphorylierte DNA ligiert werden. Damit wird ein DNA-Strang kovalent gebunden, wobei beim anderen Strang (mit der fehlenden Phosphatgruppe) ein Einzelstrangbruch („*nick*“) bestehen bleibt.

Zur Dephosphorylierung wurde das DNA-Pellet in 26 µl H₂O gelöst mit 3 µl 10 x Puffer für alkalische Phosphatase gelöst und 1 µl (1 U) Kälberdarmphosphatase zugegeben. Der Ansatz wurde zur Dephosphorylierung von Einzelstrangüberhängen („*sticky ends*“) für 15 min bei 37 °C und zur Dephosphorylierung von glatten Enden („*blunt ends*“) die gleiche Zeit bei 56 °C inkubiert. Danach wurde erneute 1 U Kälberdarmphosphatase zugegeben und der Ansatz wie oben beschrieben bei 37 °C und 56 °C je 15 min inkubiert. Nach der Inaktivierung des Enzyms für eine Stunde bei 65 °C wurde der Ansatz mit Ladepuffer versetzt und die modifizierten DNA-

Fragmente auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und eluiert (vgl. 2.2.6 A Präparation von DNA-Fragmenten).

iii Ligation

Bei der Ligation wird ein 5'-Phosphatende der DNA durch das Enzym Ligase kovalent an ein freies 3'-OH-Ende der DNA gebunden. Diese Reaktion kann entweder intra- oder intermolekular ablaufen (Ibelgaufts, 1990).

<i>10 x Ligationspuffer</i>	<i>660 mM Tris/HCl, pH 7,5</i>
	<i>50 mM MgCl₂</i>
	<i>10 mM Dithiothreitol</i>
	<i>10 mM ATP</i>
	<i>in H₂O</i>

Nach der Konzentrationsbestimmung der DNA Fragmente wurden die Fragmente in einem molaren Verhältnis Insert zu Vektor für „*sticky end*“ Reaktionen von 2:1 und für „*blunt end*“ Reaktionen von 5:1 eingesetzt. Als Reaktionspuffer diente der 10 x Ligationspuffer. Für eine Reaktion wurden ca. 30 bis 50 ng DNA und 1 U T4-Ligase eingesetzt. Die Ligation wurde bei 14 °C für 12 - 16 h durchgeführt. Für jede Ligation wurde ein zweiter Ansatz, der nur den Vektor, aber nicht das Insert enthielt parallel mit angesetzt (Rückligationskontrolle).

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

A Photometrische Bestimmung

Diese Methode beruht auf der Lichtabsorption der Basen der Nukleinsäuren im kurzwelligen UV-Bereich, mit einem Maximum bei 260 nm.

Die zu messende DNA-Präparation wurde 1:40 verdünnt und 80 µl in eine Quarzküvette überführt. In einem Photometer (Genequant, Pharmacia) wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm gemessen. Da die Absorption proportional zur DNA-Konzentration ist, kann ausgehend von der OD die Konzentration berechnet werden.

Zusammenhang zwischen OD und Nukleinsäurekonzentration (Umrechnungsfaktor):

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml DNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml RNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 30 \text{ } \mu\text{g/ml Oligonukleotide}$$

Berechnung der Nukleinsäurekonzentration

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm und beruht vor allem auf dem Gehalt an Tyrosin- und Tryptophan-Resten. Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen optischen Dichten ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) gibt Aufschluß über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient über 1,8. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen und Verunreinigungen mit Phenol. Werte für DNA, die größer als 2,0 sind, können ein Hinweis auf die Anwesenheit von RNA sein oder zeigen an, daß die DNA denaturiert ist.

B Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

Bei geringen zur Verfügung stehenden DNA-Mengen wurde eine Konzentrationsabschätzung im Agarosegel (vgl. 2.2.5 B Analyse von DNA) durchgeführt. Bei jedem Gel wurde routinemäßig eine definierte Menge eines Längenstandards (1 kb-ladder, 500 ng/10 μl) mitgeführt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnten die Fluoreszenzaktivitäten der Proben mit denen des Größenstandards verglichen und so die DNA-Menge der Proben im verwendeten Volumen bestimmt werden.

2.2.8 Doppelstrang-Sequenzierung von Plasmiden

Für die Sequenzierung von DNA gibt es zwei methodisch unterschiedliche Verfahren, die nach ihren Entdeckern als Maxam-Gilbert-Technik (Maxam and Gilbert, 1977) oder Sanger-Verfahren (Sanger et al., 1977) bezeichnet werden. Alle Sequenzierungen wurden nach einer modifizierten Methode des Sanger-Verfahrens durchgeführt.

A Aufreinigung der DNA

Da die Sequenzierreaktion empfindlich gegenüber Verunreinigungen durch Salze und Proteine ist, werden diese vorher durch eine modifizierte Ethanolpräzipitation entfernt.

<i>Ethanol/MgCl₂</i>	<i>70 % Ethanol</i>
	<i>0,5 mM MgCl₂</i>
	<i>in H₂O</i>

Zur Vorbereitung der DNA wurden ca. 2-3 µg in 20 µl mit 80 µl Ethanol/MgCl₂ gut gemischt und in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde 25 min bei 22.000 x g abzentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Um letzte Reste von Ethanol zu entfernen wurde das 0,5 ml Gefäß mit der Öffnung nach unten in ein Gefäß mit 1,5 ml Volumen geklemmt, 2 min bei 440 x g trocken zentrifugiert und das Pellet in 10 µl H₂O aufgenommen.

B Sequenzierreaktion („cycle-sequencing“)

Für die Reaktion wurde der ABI-DNA BigDye SEQ.KIT (Premix und TSR) verwendet. Die Sequenzierreaktion beruht auf einer modifizierten Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei werden in einem Ansatz für jedes Nukleotid eine bestimmte Menge an Didesoxynukleotiden (ddNTPs) eingesetzt, so daß pro polymerisiertem Strang an einer statistisch zufälligen Position ein ddNTP eingebaut wird. Durch das fehlende 3'-Hydroxylende an der Ribose des ddNTPs kommt es hier bei der Polymerisation zum Kettenabbruch (Termination). Um unterscheiden zu können an welchem Nukleotid es zum Abbruch kam, ist jedes der vier ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (A mit dichloroR6G, C mit dichloroROX, G mit dichloroR110 und T mit dichloroTAMRA). Zur Optimierung der Polymerisation wurde eine mutierte taq-DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und hat eine höhere Akzeptanz gegenüber ddNTPs. Im Sequenziergerät werden die unterschiedlich langen synthetisierten Fragmente der Größe nach aufgetrennt und entsprechend dem Farbstoff am terminalen ddNTP einer Base zugeordnet.

Auf Eis wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert: 4 µl Premix (ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl₂, Tris/HCl, pH 9,0), Primer (4 pmol), 0,3 - 0,5 µg DNA-Matrize und H₂O ad 10 µl Gesamtvolumen. Die PCR wurde mit einem Zyklusprofil von 30 s bei 96 °C, 5 s bei 50 °C und 4 min bei 60 °C gefahren. Nach 25 Zyklen wurde die Reaktion bis zur Entnahme aus dem Thermocycler auf 4 °C gekühlt.

C Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Die PCR Reaktion wurde in ein 0,5 ml Sequenziergefäß überführt und mit 80 µl Ethanol/MgCl₂ (vgl. 2.2.8 A Aufreinigung der DNA) gemischt und bei Raumtemperatur 25 min bei 22.000 x g zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde getrocknet, indem das 0,5 ml Gefäß mit der Öffnung nach unten in ein 1,5 ml Gefäß geklemmt wurde und trocken zentrifugiert wurde (vgl. 2.2.7 A Aufreinigung der DNA). Das Pellet wurde in 20 µl TSR (Perkin Elmer) gelöst, die DNA 2 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei 4 °C aufbewahrt.

D Elektrophorese der Sequenzierreaktion

Zur Auftrennung wurde ein Kapillarsequenziergerät (310 Genetic Analyzer, ABI Prism) verwendet. Die negativ geladenen DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, wobei sie an einem, die Fluoreszenzfarbstoffe anregenden Laser vorbeiwandern und durch einen Photomultiplier detektiert werden.

2.2.9 Mikrobiologische Techniken

Typischerweise dienen Bakterien zur Vermehrung neu hergestellter DNA-Fragmente. Damit alle im Nährmedium wachsenden Bakterien die gewünschte DNA, in der Regel in Plasmidform, enthalten, sind auf den Plasmiden Resistenzproteine gegen Antibiotika kodiert. Dadurch können nur Bakterien, die das richtige Plasmid aufgenommen haben (transformierte Bakterien) im Antibiotika-haltigen Selektionsmedium überleben.

A Transformation von DNA in kompetente Zellen

Damit Bakterien in der Lage sind reine DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen (Kompetenz), müssen sie durch eine spezielle Behandlung vorbereitet werden. Dabei ist zu unterscheiden mit welcher Methode die DNA in die Bakterien eingebracht werden soll.

i Rubidium-Chlorid Methode (Hanahan, 1983)

Bivalente Kationen (Ca²⁺, Rb²⁺) bewirken, daß Bakterien in einen Zustand kommen, in dem sie DNA vom umgebenden Medium aufnehmen können (Sambrook et al., 1989).

<i>Transformationspuffer I</i>	<i>100 mM RbCl₂</i> <i>50 mM MgCl₂·4H₂O</i> <i>30 mM Kaliumacetat</i> <i>10 mM CaCl₂</i> <i>15 % Glycerin</i> <i>in H₂O</i>
<i>Transformationspuffer II</i>	<i>10 mM MOPS, pH 6,8</i> <i>10 mM RbCl₂</i> <i>75 mM CaCl₂</i> <i>15 % Glycerin</i> <i>in H₂O</i>
<i>L-Broth</i>	<i>10 g/l NaCl</i> <i>10 g/l Trypton</i> <i>5 g/l Hefeextract</i> <i>NaOH, pH 7,5</i> <i>in H₂O</i>

100 ml L-Broth wurden mit 100 µl einer frischen Übernachtskultur angeimpft, bei 37 °C und 240 Upm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt, auf zwei vorgekühlte 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 5 min bei 0 °C mit 600 x g im SS-34 Rotor abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden vorsichtig in je 16,5 ml eiskaltem Transformationspuffer I resuspendiert und 30 min bis 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurde nochmals unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in je 4 ml Transformationspuffer II aufgenommen. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis gestellt, anschließend aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Jede Präparation wurde anschließend durch eine Transformation mit 1 ng Plasmid DNA getestet.

ii Hitzeschock-Transformation (Cohen et al., 1972)

Bei der Hitzeschock-Transformation wird die Kompetenz der Bakterien, die vorher mit zweiwertigen Ionen behandelt wurden, durch leichtes Erwärmen noch erhöht (Sambrook et al., 1989).

<i>SOC-Medium</i>	<i>2 % Bactotrypton</i>
	<i>0,5 % Hefeextrakt</i>
	<i>10 mM NaCl</i>
	<i>2,5 mM KCl</i>
	<i>10 mM MgSO₄</i>
	<i>20 mM Glukose</i>
	<i>in H₂O</i>

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde 10 min auf Eis aufgetaut, resuspendiert und in ein vorgekühltes Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 15 µl des Ligationsansatzes gegeben, kurz mit der Pipette gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden die Bakterien 45 sec im Wasserbad bei 42 °C „geschockt“ und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Damit die Bakterien die neu erworbene Antibiotikaresistenz zur Expression bringen und in die logarithmische Wachstumsphase gehen konnten, wurden sie mit 1000 µl SOC versetzt und bei 37°C für 1h bei 240 Upm geschüttelt. 50 µl und 500 µl des Ansatzes wurden auf Selektionsplatten (vgl. 2.2.8 A Transformation von DNA in kompetente Zellen) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Als Kontrolle wurde stets der Ligationsansatz, der nur den Vektor ohne Insert enthielt transformiert. Weitere Kontrollen, die bei Bedarf zur Anwendung kamen waren 1 ng Plasmid-DNA zur Überprüfung der Kompetenz sowie ein Ligationsansatz ohne Ligase zum Nachweis von ungeschnittene DNA.

iii Aufreinigung und Elektroporation

Die Elektroporation wurde ursprünglich zum Einschleusen von DNA in eukaryonte Zellen entwickelt (Neumann et al., 1982). Inzwischen ist sie die effizienteste Transformationsmethode für Bakterien. Durch ein elektrisches Feld werden kurzzeitig Läsionen in der Membran der Bakterienzelle erzeugt, durch die die DNA passiv aufgenommen werden kann (Ibelgauf, 1990).

● Butanolpräzipitation

Zur Verbesserung der Transformationseffizienz und um Ionen, die bei der Elektroporation den elektrischen Widerstand der Bakterien-DNA-Suspension erniedrigen würden, zu entfernen, wurde die DNA nach der Ligation (vgl. 2.2.6 C Enzymatische Modifikationen von DNA) mit Hilfe der Butanolpräzipitation von Proteinen und Salzen gereinigt.

Dazu wurde der Ligationsansatz mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt, mit dem zehnfachen Volumen Butanol versetzt und zehn Sekunden gevortext. Anschließend wurde die ausgefallenen DNA 10 min bei 22.000 x g in einer Eppendorfcentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet im Rotationsverdampfer getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst. Davon wurden 15 µl für die

Transformation eingesetzt.

● Elektroporation

Für die Elektroporation wurden ausschließlich Bakterien vom Stamm DH10B („Elektromax“, Gibco) eingesetzt. Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden die Reaktionsküvetten (Biorad) auf Eis vorgekühlt. 15 µl des Ligationsansatzes wurden mit 25 µl Bakterien gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und in einem „Gene Zapper“ mit „Pulse Controller“ (Biorad) elektroporiert (Kapazität 25 µF, Widerstand 200 Ω, 1,8 kV). Die optimale Zeitkonstante lag zwischen 4,4 msec und 4,7 msec. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen schnellstmöglich in SOC (vgl. 2.2.9 A Hitzeschock-Transformation) aufgenommen, 1 h bei 37 °C mit 240 Upm geschüttelt und 100 µl auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (Selektionsplatte) ausgestrichen. Die Kontrollen wurden analog zur Heatschock-Transformation gemacht.

iv Herstellung von Selektionsplatten

In der Regel ist auf dem Plasmid, das Bakterien bei der Transformation aufnehmen ein Resistenzgen für ein Antibiotikum. Mit der Aufnahme des Plasmids und Expression des Resistenzgens wird das Bakterium resistent gegen das Antibiotikum und kann auf Selektionsplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, Kolonien bilden. Im Gegensatz dazu sterben untransformierte Bakterien ab.

Zu L-Broth wurde 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt und autoklaviert. Nachdem das Medium auf 42 °C abgekühlt war, konnte das entsprechende Antibiotikum zugegeben und die Platten gegossen werden. Eine Abkühlung auf 42 °C ist stets nötig, da Antibiotika sehr hitzesensitiv sind. Die Antibiotikakonzentration in den Platten lag bei 50 µg/ml für Ampizillin, 30 µg/ml für Kanamycin. Nach dem Erhärten der Platten wurden diese bei 4 °C lichtgeschützt bis zur Verwendung gelagert.

B Schnellpräparation von Plasmid DNA (Minipräp)

Diese Methode wird verwendet um schnell analytische Mengen (wenige Mikrogramm) einer neu klonierten DNA aus Bakterien isolieren und analysieren zu können. Dabei werden die Bakterien durch Einwirkung von SDS in einem alkalischen Milieu lysiert, wobei die chromosomale DNA mit der Zellmembran verbunden bleibt und sich Plasmid-DNA löst. Die chromosomale DNA und anderen Zellfragmente können durch eine Zentrifugation von der Plasmid-DNA getrennt werden.

<i>Puffer 1</i>	<i>50 mM Tris/HCl pH 8,0</i> <i>10 mM EDTA</i> <i>100 µg/ml RNase A</i> <i>in H₂O</i>
<i>Puffer 2</i>	<i>0,2 M NaOH</i> <i>1 % SDS</i> <i>in H₂O</i>
<i>Puffer 3</i>	<i>3 M Kaliumacetat, pH 5,5</i> <i>in H₂O</i>

3 ml L-Broth wurden mit Bakterien von einer Selektionsplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 240 Upm geschüttelt. 1,5 ml wurden in Eppendorfröhrchen 2 min bei 1.800 x g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet in 0,3 ml Puffer 1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 0,3 ml Puffer 2 zugegeben und vorsichtig durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zum Fällern zellulärer Proteine 0,3 ml Puffer 3 zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 15 min auf Eis gestellt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 22.000 x g wurden Zellfragmente, chromosomale DNA und die gefällten Proteine pelletiert während die episomale DNA im Überstand gelöst blieb. Dieser wurde in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 650 µl Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde bei Raumtemperatur bei 22.000 x g 15 min abzentrifugiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, in der „*speed vac*“ getrocknet und in 50 µl H₂O oder TE-Puffer (vgl. 2.2.5 A Isolierung genomischer DNA) gelöst. Für einen Testverdau wurden 5 µl eingesetzt.

C Großpräparation von Plasmid DNA mit dem Qiagen Kit (Maxipräp)

Diese Methode wird verwendet um größere DNA-Mengen mit minimalen Verunreinigungen zu erhalten. Nach alkalischer Lyse (vgl. 2.2.9 B Schnellpräparation von Plasmid DNA (Minipräp)) wird die DNA auf eine mitgelieferte Säule aufgetragen. Im Ionenmilieu von Puffer QBT bindet die DNA, nicht aber Proteine oder RNA an die Matrix der Säule. Puffer QC entfernt Kontaminationen (RNA) durch Aufbrechen unspezifischer Bindungen, die Zugabe von Ethanol dient zum Lösen unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen. Puffer QF ändert die DNA-Bindungskapazität der Säule, die DNA löst sich und wird ausgewaschen.

<i>Puffer QBT</i>	<i>750 mM NaCl</i> <i>50 mM MOPS pH 7,0</i> <i>15 % Isopropanol</i> <i>0,15 % Triton X-100</i> <i>in H₂O</i>
<i>Puffer QC</i>	<i>1,0 M NaCl</i> <i>50 mM MOPS, pH 7.0</i> <i>15% Isopropanol</i> <i>in H₂O</i>
<i>Puffer QF</i>	<i>1,25 M NaCl</i> <i>50 mM Tris/HCl, pH 8.5</i> <i>15 % Isopropanol</i> <i>in H₂O</i>

200 ml L-broth mit einem geeigneten Antibiotikum (Ampizillin 50 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml) wurden mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 Upm inkubiert. Nach Abnahme von 10 ml der Suspension zum Einfrieren wurden die Bakterien in den restlichen 190 ml bei 6.500 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 (vgl. 2.2.9 B Schnellpräparation von Plasmid DNA) resuspendiert und anschließend die Bakterien unter Zugabe von 10 ml Puffer 2 (vgl. 2.2.9 B Schnellpräparation von Plasmid DNA) unter mehrfachen Invertieren 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lösung wurde mit Puffer 3 (vgl. 2.2.9 B Schnellpräparation von Plasmid DNA) auf Eis für 15 min inkubiert und Zellfragmente bei 4 °C und 30.000 x g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde daraufhin durch eine Gaze auf eine mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Säule zur weiteren Reinigung aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC nachgewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde unter Zugabe von 11 ml Isopropanol 5 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend bei 4 °C für 30 min bei 15.000 x g pelletiert. Nach dem Waschen mit 15 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet im Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend in 200 µl TE (vgl. 2.2.5 A Isolierung genomischer DNA) gelöst. Von der gewonnenen DNA wurde die Konzentration mittels einer OD-Messung (vgl. 2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren) bestimmt und die Qualität durch das Verhältnis von OD₂₆₀- zu OD₂₈₀-Messung sowie mittels einer charakterisierenden Restriktionsanalyse verifiziert. Für eine gut präparierte DNA lag die OD₂₆₀/OD₂₈₀-Ratio zwischen 1,6 und 1,8.

D Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Durch das Einfrieren von Bakterien können sie über Jahre in einem lebensfähigen Zustand erhalten und zu jedem beliebigen Zeitpunkt wieder vermehrt und analysiert werden.

Einfriermedium

*L-broth (vgl. 2.2.9 A Transformation von DNA in kompetente Zellen)
10 % DMSO*

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden 10 ml einer Bakteriensuspension bei 6600 x g für 5 min abzentrifugiert und in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C eingelagert.

Zum Auftauen wurde das Gefäß möglichst schnell in der Hand erwärmt und der flüssige Inhalt zur Verdünnung des DMSO in L-Broth (vgl. 2.2.8 A Transformation von DNA in kompetente Zellen) Nährmedium überführt.

2.2.10 Proteinchemische Analysen

A Western Blot

Der Western Blot dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörper und einer daran anschließenden Farbreaktion. Die verwendete Western Blot-Methode wurde stets zum Nachweis von CYP2B1 durchgeführt.

i Extraktion von Membranproteinen

CYP2B1 ist ein membranständiges Protein. Daher wurde zur Proteinisolierung eine Methode herangezogen, bei der Membranproteine angereichert werden. Durch starke Scherkräfte wurden die Zellen fragmentiert, die Proteine in ihrer Konformation allerdings nicht verändert. Um die Degradation von Proteinen durch intrazelluläre Proteasen zu hemmen, wurde dem Extraktionspuffer der Proteaseinhibitor (PMSF) zugesetzt.

PMSF-Stocklösung

*100 mM PMSF
in Isopropanol*

<i>Extraktionspuffer</i>	<i>10 mM Tris/HCl pH 8,0</i> <i>0,1 mM DTT</i> <i>1 mM PMSF</i> <i>in H₂O</i>
--------------------------	---

Da PMSF in wässriger Lösung instabil ist, wurde der Extraktionspuffer erst unmittelbar vor der Verwendung angesetzt.

<i>2 x Probenpuffer</i>	<i>120 mM Tris/HCl pH 6,8</i> <i>4 % (w/v) SDS</i> <i>20,23 % (w/v) Glycerol</i> <i>0,016 % (w/v) Bromphenolblau</i> <i>1,47 M β-Mercaptoethanol</i> <i>in H₂O</i>
-------------------------	---

1 x 10⁷ Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die gelösten Zellen wurden bei 450 x g pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen in PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in 4,5 ml Extraktionspuffer aufgenommen und durch mehrfaches Aufziehen in der Pipette resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in einen 8,5 ml Glaskolben (*douncer*) überführt und mit einem exakt in den Glaskolben passenden Glasstab 20 x geschert (*gedounct*). Die Zellen wurden daraufhin in ein neues Gefäß überführt. Zellreste im *douncer* wurden mit 2 ml Extraktionspuffer abgespült und mit den restlichen Zellen vereint. Anschließend wurden größere Zellfragmente und Zellkerne bei 3.500 x g für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde in einen SW41-Rotor (Beckman) überführt und Membranproteine 45 min bei 130.000 x g pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, die inneren Wände des Zentrifugationsgefäßes mit einem Papiertuch ausgewischt und das Pellet in 2 x Probenpuffer aufgenommen. Je nach Proteingehalts des Pellets variierte das Volumen des 2 x Probenpuffers zwischen 50 und 200 μ l. Zum Denaturieren wurden die Proben unmittelbar vor dem Auftrag auf das Gel für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgeschreckt.

ii Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der denaturierenden Gelelektrophorese werden Proteine ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Gegensatz dazu nehmen bei der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese auch Gesamtladung und Konformation des Proteins, sowie chemische Modifikationen Einfluß auf das Laufverhalten im Gel. Damit diese Faktoren keine oder nur eine geringe Rolle spielen, werden die Proteine durch Zugabe eines Detergenz (z.B. SDS) denaturiert. Die amphiphilen SDS-Moleküle lagern sich im konstantem Verhältnis zur Größe des Proteins mit ihrem lipophilen Schwanz an hydrophobe Bereiche des Proteins, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des

Proteins aufgehoben werden und das Protein gestreckt wird. Gleichzeitig werden die positiven Ladungen des Proteins durch den Überschuss an negativen Ladungen des SDS aufgehoben. Die Proteine liegen nun als gestreckte Polypeptidkette mit starker negativer Ladung vor. Da die Proteine unterschiedlich groß sind, wandern sie unterschiedlich schnell durch die Poren der Polyacrylamidmatrix im Gel zur Anode; die Auftrennung erfolgt nach der Proteingröße. Die Gelelektrophorese erfolgte nach dem Laemmli-System, bei dem die Proteine in einer Sammelschicht (*stacking gel*) konzentriert werden und von dort aus in das eigentlich Trenngel (*resolving gel*) einwandern.

<i>Sammelgel (stacking gel)</i>	<i>4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)</i> <i>0,125 M Tris/HCl pH 6,8</i> <i>1 % (w/v) SDS</i> <i>0,1 % (v/v) TEMED</i> <i>0,05 % (w/v) (NH₄)₂S₂O₈</i> <i>in H₂O</i>
<i>Trenngel (resolving gel)</i>	<i>12 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)</i> <i>0,375 M Tris/HCl pH 8,8</i> <i>0,5 % (w/v) SDS</i> <i>0,05 % (v/v) TEMED</i> <i>0,05 % (w/v) (NH₄)₂S₂O₈</i> <i>in H₂O</i>
<i>10 x Laemmli-Puffer</i>	<i>0,25 M Tris Base</i> <i>1,92 M Glyzin</i> <i>1 % (w/v) SDS</i> <i>in H₂O</i>

Die Gelkammer (Hofer, S600) wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers in der Giesapparatur fixiert, ca. 30 ml Trenngel bis 3 cm unter den oberen Rand der Glasplatte eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min wurde das Isopropanol abgegossen und der Kamm eingesteckt. Anschließend wurde die Gelkammer mit Sammelgel bis zum Rand aufgefüllt. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde die Gelkammer in die Laufapparatur eingespannt und das untere Pufferreservoir ca. 10 cm hoch mit 1 x Laemmli-Puffer gefüllt. Für einen gleichmäßigen und konstanten Stromfluß wurden die Luftblasen am unteren Ende des Gels entfernt und das obere Pufferreservoir soweit gefüllt, dass die Taschen wenige Millimeter überdeckt waren. Nach dem Laden der Proben wurde das obere Reservoir ganz gefüllt und die Gelelektrophorese gestartet. Diese erfolgte bei 1500 Vh, wobei eine Spannung von 150 V nicht überschritten wurde.

iii Spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper

● Proteintransfer auf eine Hybond-N-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung, müssen die Proteine vor der Immunreaktion immobilisiert werden. Das geschieht durch einen Transfer auf eine hoch affine Membran mittels einer angelegten Spannung, die durch das Gel verläuft. Die negativ geladenen Proteine werden zur Anode gezogen, bleiben aber an der dazwischen liegenden Membran haften.

<i>Anodenpuffer 1</i>	<i>0,3 M Tris/HCl pH 10,7 20 % (v/v) Methanol in H₂O</i>
<i>Anodenpuffer 2</i>	<i>25 mM Tris/HCl pH 10,3 20 % (v/v) Methanol in H₂O</i>
<i>Kathodenpuffer</i>	<i>25 mM Tris-base pH 9,4 40 mM 6-Aminohexanonsäure 20 % (v/v) Methanol in H₂O</i>
<i>10 x TBST</i>	<i>100 mM Tris/HCl pH 8,0 1,5 M NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20 in H₂O</i>

Zum Proteintransfer wurden aus Whatman-Papier 8 Stücke und aus einer Hybond-N-Membran ein Stück mit der Größe des Gels exakt herausgeschnitten. Zwei Stücke Whatmanpapier wurden in Anodenpuffer 1 getränkt und luftblasenfrei auf die Anode gelegt, darauf folgten zwei in Anodenpuffer 2 getränkte Whatmanpapiere (vg. Abbildung 17). Die Hybond-N-Membran wurde vor dem Auflegen 15 sec in Methanol getränkt, kurz in H₂O gewaschen und 10 min in H₂O bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Auflegen des Gels wurden 4 Whatman-Papiere aufgelegt, die zuvor in Kathodenpuffer getränkt worden waren. Nach dem Auflegen der Kathode erfolgte der Transfer über 60 min bei einer Stromstärke von 2.5 mA/cm² und einer maximalen Spannung von 25 V.

- Blocken

Beim Blocken werden freie Bindestellen auf der Hybond-N-Membran abgesättigt, so dass der Antikörper nicht unspezifisch gebunden werden kann.

Blocking-Lösung

1 % (w/v) Vistra Blocking Agent

2 % (w/v) Bovines Serum Albumin

in 1 x TBST

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz in 1 x TBST gespült und anschließend bei Raumtemperatur 1 Stunde in Blocking-Lösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Alternativ wurde zum Blocken PBS mit 5 % Milchpulver verwendet.

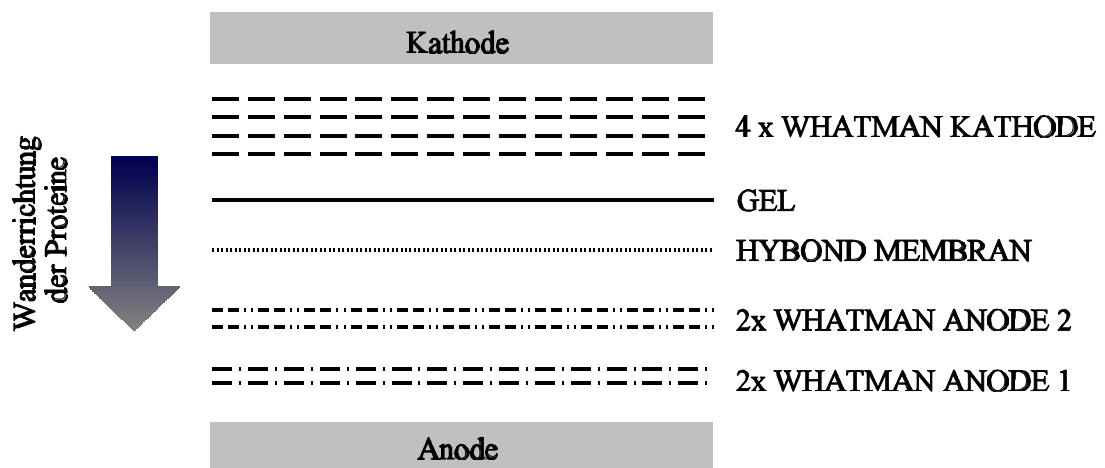


Abbildung 17: Aufbau eines Westernblots

- Immunreaktion

Bei der Immunreaktion wird die Membran mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Um den gebundenen Antikörper sichtbar zu machen, wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der an das konservierte Ende des ersten bindet. Dabei ist der zweite Antikörper mit einem Enzym (alkalischer Phosphatase) gekoppelt, das ein Substrat in einen leicht nachweisbaren Farbstoff umsetzt.

	1. Antikörper (Kaninchen-anti-CYP2B1)	1:500 (Antikörperstock) 1 % (w/v) BSA in 1 x TBST
alternativ	(Ziege-anti-CYP2B1)	1:500 (Antikörperstock) 0,5 % (w/v) Milchpulver in PBS
	2. Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen)	1:500 (Antikörperstock) in 1 x TBST
alternativ	(Kaninchen-anti-Ziege)	1:500 (Antikörperstock) 0,5 % (w/v) Milchpulver in PBS
	Waschlösung I	1 % (w/v) BSA in 1 x TBST
alternativ		0,5 % (w/v) Milchpulver in PBS

Die Blocking-Lösung wurde gegen 30 ml des 1. Antikörper ersetzt und über Nacht in einem Rollinkubator bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der 1. Antikörper entfernt und der Blot in der Röhre fünfmal 5 min mit 50 ml Waschlösung I gewaschen. Anschließend wurden der zweite Antikörper zugegeben und erneut über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

● Detektion mittels *Enhanced Chemifluorescence* (ECF) und *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)

Bei der Farbreaktion wird dem gewaschenen Blot ein Substrat zugesetzt, das durch die alkalische Phosphatase bzw. Peroxidase des zweiten Antikörpers in ein durch Fluoreszenz oder Lumineszenz nachweisbares Produkt umgesetzt wird.

10 x TBST (3 %)	100 mM Tris/HCl pH 8,0 1,5 M NaCl 3 % (v/v) Tween 20 in H ₂ O
-----------------	---

<i>10 x TBS</i>	<i>100 mM Tris/HCl pH 8,0</i> <i>1,5 M NaCl</i> <i>in H₂O</i>
<i>Waschlösung II</i>	<i>0,5 % (v/v) Tween 20</i> <i>in PBS</i>

Der 2. Antikörper wurde entfernt und die Membran in einer Plastikschiene unter leichtem Schwenken fünfmal 5 min mit 1 x TBST (0,3 %) und anschließend zweimal 5 min in 1 x TBS gewaschen. Alternativ wurde der zweite Antikörper mit 4 Waschschrirren (je 10 min in Waschlösung II) entfernt. Durch die erhöhte Tween-Konzentration wurden Reste der alkalischen Phosphatase entfernt.

Zum eigentlichen Nachweis mittels ECF (*enhanced chemifluorescence*) wurde die Membran mit der Unterseite auf eine Overheadfolie gelegt und 1 ml des ECF-Substrats (Amersham) auf die Glasplatte des Meßgeräts (Storm, Molecular Dynamics) gegeben. Daraufhin wurde die Membran mit der Proteinseite auf das ECF-Substrat gelegt und Luftblasen entfernt. Sobald das ECF-Substrat gleichmäßig verteilt war, wurde das Programm (*blue fluorescence*) mit einer Auflösung von 200 µm gestartet.

Beim Nachweis mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) wurden 0,1 ml/cm² Substrat (Solution A + Solution B (1:40), Amersham) gemischt und auf den Blot gegeben. Nach einer 5minütigen Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur wurde das ECL-Substrat entfernt, der Blot in eine Klarsichtfolie eingeschlagen und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

B Unspezifischer Proteinnachweis nach Coomassie

Coomassie Brilliant Blau G250 reagiert mit Proteinen, wahrscheinlich mit Arginin-Resten, und bildet Komplexe, die im Gel als blaue Färbung auftreten. Eine Anfärbung der Gelmatrix kann durch einen anschließenden Entfärbeschritt reduziert werden (Ibelgaufits, 1990). Mit dieser Methode läßt sich der aufgetragene Gesamtproteingehalt und die Effizienz des Proteintransfer auf die Membran abschätzen.

<i>Coomassie-Färbelösung</i>	<i>45,4 % (v/v) Methanol</i> <i>9,1 % (v/v) Eisessig</i> <i>0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue</i> <i>in H₂O</i>
------------------------------	--

<i>Entfärber</i>	45,4 % (v/v) <i>Methanol</i>
	9,1 % (v/v) <i>Eisessig</i>
	<i>in H₂O</i>

Unmittelbar nach dem Blot wurde das SDS-Gel in Coomassie-Färbelösung gelegt und 1 h bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung gegen Entfärber ausgetauscht und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zur Dokumentation wurde das Gel auf ein Whatman-Papier gelegt und bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

C Proteinbestimmung nach Lowry (Biorad)

Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Lowry (Hartree, 1972; Lowry et al., 1951) wird Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Phosphor-Wolfram/Molybdänsäure-Komplex) verwendet. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen, wobei sich durch Reaktion mit Tyrosin-Resten eine blaue Verfärbung ergibt. Die damit verbundene Extinktion kann photometrisch bestimmt und mit der einer Eichproteinlösung verglichen werden. (Ibelgaufits, 1990).

<i>Reagenz A'</i>	98 % (v/v) <i>Reagenz A</i>
	2 % (v/v) <i>Reagenz S</i>

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten wurde in Mikrotiterplatten vorgenommen. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in Extraktionspuffer (vgl. 2.2.10 A Western Blot) in verschiedenen Konzentrationen (0,2 mg/ml (w/v), 0,4 mg/ml (w/v), 0,8 mg/ml (w/v), 1,2 mg/ml (w/v), 1,6 mg/ml (w/v), 2 mg/ml (w/v)) eingesetzt. Daraus wurde bei jedem Versuch eine neue Standardkurve erstellt. 5 µl des Standards und der Proben wurden doppelt in je eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 25 µl Reagenz A' und anschließend 200 µl Reagenz B zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 590 nm gemessen.

D Färbung von β-Galactosidase exprimierenden Zellen (Cepko et al., 1993)

Mit dieser Methode ist es möglich die Expression des β-Galactosidase-Reportergens *in situ* nachzuweisen. Das Genprodukt kann durch die Entstehung eines blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoffs nach der enzymatischen Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid), einem Substratanalogen von Lactose, nachgewiesen werden. Die Methode ist sehr sensitiv und erlaubt es, sogar einzelne Enzymmoleküle in einer Zelle nachzuweisen (Ibelgaufits, 1990).

<i>PFA</i>	<i>2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS</i>
<i>Färbelösung</i>	<i>20 mM $K_3Fe(CN)_6$ 20 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 2 mM $MgCl_2$ 1 mg/ml (w/v) X-Gal in H_2O</i>
<i>X-Gal-Stammlösung</i>	<i>40 mg/ml (w/v) X-Gal in Dimethylformamid</i>

Adhäsionszellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für 20 min in PFA fixiert. Nach Fixierung wurde das Paraformaldehyd abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift das PBS 10 min auf den Zellen gelassen wurde. Das X-Gal wurde von einer Stammlösung zur Färbelösung zugegeben und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Dunklen aufbewahrt. Die fixierten Zellen wurden mit einem Minimum an frisch angesetzter Färbelösung überschichtet und für 24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ auf den Zellen gelassen und daraufhin gegen PBS ausgetauscht.

2.2.11 Nachweis von Zellmembranveränderungen mittels Annexin V/Propidiumiodid

Annexin V erlaubt die Identifikation von Veränderungen der Zelloberfläche, die während der Apoptose auftreten. Während der frühen Phase der Apoptose klappt Phosphatidylserin, welches bei einer vitalen Zelle ausschließlich an der inneren Schicht der Cytoplasmamembran liegt, zur äußeren Schicht. Dieser Vorgang scheint für die Erkennung der Zelle durch Macrophagen und die anschließende Entfernung nach dem Zelltod wichtig zu sein (Martin et al., 1995). Das Binden von Annexin V ist abhängig von Kalzium und reversibel (Kaetzel and Dedman, 1995). Nach Schätzungen bindet ein Annexin V-Molekül ungefähr 50 Phospholipidmonomere (Swairjo et al., 1995). Die Translokation der Phosphatidylserinmoleküle tritt allerdings nicht nur bei apoptotischen, sondern auch bei nekrotischen Zellen auf. Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen beiden Formen eines Zelltodes liegt darin, dass in der frühen Phase der Apoptose die Zellmembran intakt bleibt, aber schon im ersten Moment der Nekrose die Zellmembran ihre Integrität verliert und durchlässig wird. Aus diesem Grund wurden alle Annexin V-Untersuchungen durch zusätzliche Analysen mit Propidiumiodid ergänzt. Nekrotische und spät apoptotische Zellen färben sich sowohl für Annexin V als auch für Propidiumiodid (Vermees et al.,

1995). Durch Kopplung von Annexin V mit dem grün fluoreszierenden Fluorescein-isothiocyanat (FITC) kann es von dem rot fluoreszierenden Propidiumiodid unterschieden werden.

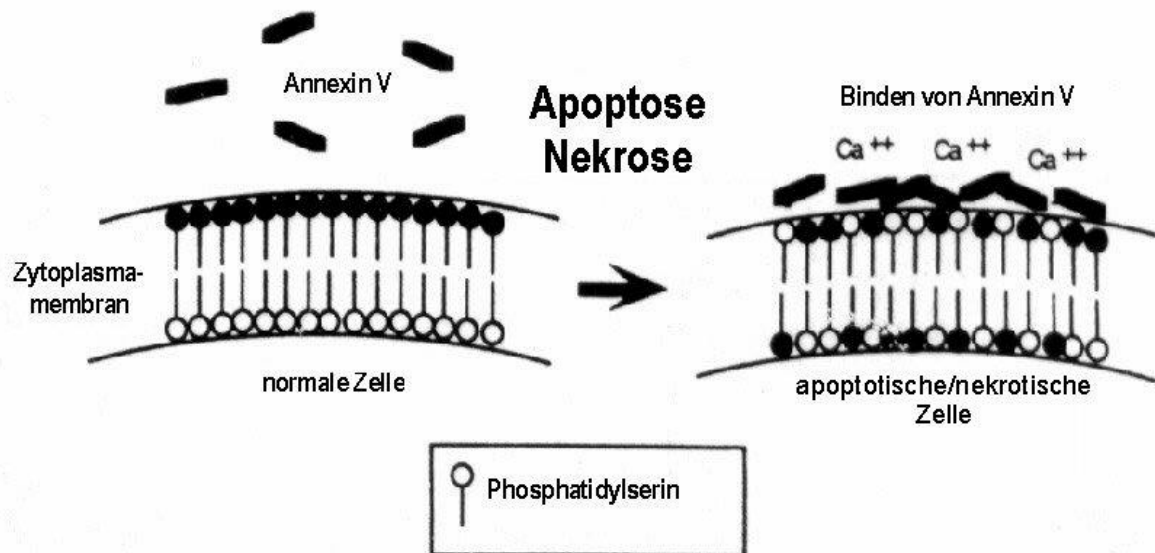


Abbildung 18: Prinzip des Annexin V-Bindens

Während der Apoptose oder Nekrose klappt Phosphatidylserin von der inneren Schicht der Cytoplasmamembran nach außen. In Gegenwart von Kalziumionen kann Annexin V an das exponierte Phosphatidylserin binden (aus dem Trevigen-Katalog, verändert).

Färbelösung
(Trevigen)

1 % (v/v) 100 x Annexin V
10 % (v/v) 10 x Bindepuffer
10 % (v/v) Propidiumiodidlösung
in H_2O

Zur Anfärbung wurde die zu untersuchenden Zellen (1×10^4 /chamber slide bzw. 1×10^5 /3 cm-Schale) ausgesät und am darauffolgenden Tag mit IFO bzw. 4OOH-IFO behandelt. Nach Ablauf einer bestimmten Zeitperiode wurden die Zellen gefärbt. Für eine *in situ*-Analyse in chamber slides (Lab-Tek II, 15434, Nalge Nunc International) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen zweimal mit 0,5 ml 1x Bindepuffer gewaschen und anschließend mit der Färbelösung überschichtet. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurden die Zellen im UV-Mikroskop (Olympus, IX 70) oder im konfokalen Lasermikroskop (TCS-NT, Leica) untersucht. Für eine FACS-Analyse (vgl. 2.2.4 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* = FACS)) wurde der Überstand aus den 3 cm-Schalen in ein Zentrifugationsgefäß überführt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und dieses zum Überstand dazugegeben. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA überschichtet und

unmittelbar nach dem Ablösen vom Boden zum Überstand zugegeben. Bei einer Zentrifugation über 5 min bei 250 x g und Raumtemperatur wurden die trypsinierten Zellen und die Zellen, die nicht mehr am Boden hafteten, zusammen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen des Pellets wurden in 5 ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5 min, 250 x g, Raumtemperatur). Nach dem Aufnehmen der Zellen in 1 ml 1 x Bindepuffer und wurden sie in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden erneut pelletiert (5 min, 250 x g, Raumtemperatur), das Pellet in 70 µl Färbelösung aufgenommen und 15 min im Dunklen inkubiert. Unmittelbar vor der FACS-Analyse wurde 1 ml 1 x Bindepuffer zugegeben und die Zellen durch eine Gaze filtriert.

	normale Zelle	apoptotische Zelle	nekrotische Zelle
Annexin V Färbung	-	+	+
Propidium-iodid Färbung	-	-	+

Abbildung 19: Übersicht zur Annexin V/Propidiumiodid-Anfärbbarkeit von Zellen

Annexin V färbt apoptotische und nekrotische Zellen an. Durch Zugabe von Propidiumiodid können nekrotische Zellen ausgeschlossen werden. Normale Zellen lassen sich weder mit Annexin V noch Propidiumiodid anfärben.

2.2.12 Elektronenmikroskopie

Bei Lichtmikroskopen ist die Auflösung limitiert durch die minimale Wellenlänge des sichtbaren Lichts. Im Gegensatz dazu ist die Wellenlänge von Elektronen noch weit geringer, was eine deutlich höhere Auflösung zulässt. Da Elektronen durch Luft gebremst oder gestreut werden, erfolgt die Elektronenmikroskopie normalerweise unter Hochvakuum. Damit jedoch bei der Darstellung von Präparaten keine Artefakte auftreten, ist es notwendig die Zellen für die Ansicht im Elektronenmikroskop entsprechend vorzubereiten.

A Behandlung der Zellen *in vitro*

Bei Untersuchungen zur Morphologie von Zellen wurden auch stets unbehandelte Zellen, bzw. Zellen, die vorher mit Staurosporin behandelt wurden, mitgeführt. Staurosporin ist ein Inhibitor der Proteinase C und induziert Apoptose (Chiang et al., 1998).

<i>4-Hydroperoxy-Ifosfamid</i>	<i>3 mM 4-Hydroperoxy-Ifosfamid in PBS</i>
<i>Staurosporin-Stammlösung</i>	<i>0,1 mg/ml in DMSO</i>

2×10^6 Zellen wurden in einer 10 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde zu den Zellen aktiviertes Ifosfamid (4-Hydroperoxy-Ifosfamid) mit einer Endkonzentration von 100 μM zugegeben. Zwei Tage später wurde zur Kontrolle zu unbehandelten Zellen Staurosporin mit einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben und am Tag darauf die Zellen fixiert. Bei allen weiteren Wasch-, Fixierungs-, Einbettungs- und Kontrastierungsschritten wurde jeweils das Medium der Zellen gewechselt, wobei sie bei 250 x g pelletiert und anschließend im neuen Medium resuspendiert wurden.

B Chemische Fixierung

i Fixierung von Proteinen

Das Wesentliche der Wirkungsweise von Aldehyden zur Fixierung besteht in der Reaktion mit Aminogruppen von Proteinen und Aminolipiden, wobei die größte Bedeutung die Quervernetzung von Proteinen hat. Im Vergleich zu Formaldehyd führt Glutaraldehyd (als Dialdehyd) zu einer besseren Strukturhaltung. Weiterhin besteht eine Reaktivität von Glutaraldehyd gegenüber zyklischen Aminosäuren und Sulfhydrylgruppen.

<i>Sörensenpuffer pH 7,38</i>	<i>0,02 M KH_2PO_4 0,08 M K_2HPO_4 in H_2O</i>
<i>Glutaraldehyd</i>	<i>2,5 % Glutaraldehyd in Sörensenpuffer pH 7,38</i>

Die Zellen wurden trypsiniert (vgl. 2.2.2 B Passagieren von Zellen), das Zellpellet in PBS

gewaschen und die Zellen erneut pelletiert. Nach dem zweiten PBS-Waschschritt wurden die Zellen in Glutaraldehyd resuspendiert, für 2 bis 4 Stunden bei 4 °C inkubiert und danach das Glutaraldehyd gegen Sörensenpuffer ausgetauscht, in dem sie bis zur Einbettung bei 4 °C gelagert wurden. Unmittelbar vor der Einbettung wurden die Zellen dreimal mit Sörensenpuffer gewaschen.

ii Fixierung von Lipiden

Osmiumtetroxid war das erste für die Elektronenmikroskopie gebrauchte Fixans. Der Hauptmechanismus besteht in der Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren, wobei unter Reduktion von OsO_4 die ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verbindung gesättigt wird. Reduzierte Osmiumatome sind für die schwarze Färbung des Präparates und für den größten Teil des elektromikroskopischen Kontrasts verantwortlich.

Osmiumoxid-Lösung

1 % (w/v) OsO_4

in 0,1 M Sörensenpuffer pH 7,38

Das Zellpellet wurde in Osmiumoxid-Lösung resuspendiert und 1-2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert, bis die Zellen komplett vom Osmium schwarz durchdrungen waren. Daraufhin wurde nicht gebundenes OsO_4 durch dreimaliges Waschen der Zellen mit H_2O entfernt und die Zellen anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

C Dehydration mittels Alkohol

Biologisches Material in hydratisiertem Zustand kann normalerweise nicht im Elektronenmikroskop untersucht werden. Um Schrumpfungs- und Deformationsartefakte zu vermeiden ist eine Entwässerung des Präparates erforderlich. Der Vorteil von Ethanol gegenüber dem ebenfalls verwendeten Aceton liegt in der Beibehaltung des reduzierten Zustands des Osmiums. Wichtig ist außerdem, dass das Dehydrationsmittel mit dem Einbettungsmittel (hier EPON-Harz) mischbar ist.

Zur Dehydration wurden die Zellen jeweils zweimal 10 min in 50 %igen, 70 %igen, 80 %igen, 96 %igen und 100 %igen Alkohol bei leichtem Schütteln inkubiert.

D Einbettung

Für die Transmissionselektronenmikroskopie braucht man sehr dünne Präparate, die in Form ultradünner Schnitte (≤ 100 nm) hergestellt werden können, wenn zuvor das fixierte Objekt in ein

Kunstharz eingebettet wurde. Eines der am häufigsten verwendeten Harze ist das EPON-Harz.

<i>Harz (EPON)</i>	<i>47,8 % (v/v) Glyzidether</i>
	<i>28,7 % (v/v) Methylnadid Anhydrid</i>
	<i>21,5 % (v/v) 2-Dodecenylnsuccinylsäure</i>
	<i>1,96 % (v/v) 2,4,6-Tris(dimethylamino- methyl) phenol</i>

Zum Ansetzen des EPON-Harzes wurden 47,8 % (v/v) Glyzidether, 28,7 % (v/v) Methylnadid Anhydrid und 21,5 % (v/v) 2-Dodecenylnsuccinylsäure in einem vorgewärmten Meßkolben abgemessen und in ein neues Gefäß überführt. Nach mehrfachen Invertieren des Gefäßes wurde anschließend 1,96 % (v/v) 2,4,6-Tris(dimethylamino-methyl)phenol zugegeben und noch einmal durch häufiges Invertieren gemischt. Ungebrauchtes EPON-Harz wurde bis zur nächsten Verwendung bei -20 °C gelagert.

<i>PO/EPON (1:1)</i>	<i>50 % (v/v) 1,2-Propylenoxid</i>
	<i>50 % (v/v) EPON</i>

<i>PO/EPON (1:3)</i>	<i>25 % (v/v) 1,2-Propylenoxid</i>
	<i>75 % (v/v) EPON</i>

Der Alkohol der entwässerten Zellen wurde durch 1,2 Propylenoxid ersetzt und die Zellen zweimal 10 min darin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 1 h in PO/EPON (1:1) inkubiert, mit 1800 x g pelletiert und der letzte Schritt mit PO/EPON (1:3) wiederholt. Danach wurde die Mischung gegen reines EPON ausgetauscht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das EPON-Harz gegen neues ersetzt und bei 60 °C für 48 h gehärtet.

E Semidünnschnitte

Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte aus, in Kunststoff eingebettetem Material, erfolgten unter Verwendung eines Ultramikrotoms. Zum Finden einer geeigneten Stelle für die elektronenmikroskopische Analyse der Zellen wurden zuerst Semidünnschnitte angefertigt und gefärbt.

<i>Toluidin-Stammlösung</i>	<i>6,25 mg/ml (w/v) Na₂CO₃</i>
	<i>1,25 mg/ml Toluidinblau</i>
	<i>in H₂O</i>

12,5 g/l NaCO₃ wurden unter Rühren bei 50 °C in H₂O gelöst. Anschließend wurden 2,5 g/l Touluidinblau zugegeben, für 1 bis 2 Stunden bei 40 °C gerührt und nach dem Abkühlen durch einen Papierfilter filtriert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde die Lösung noch einmal filtriert und 1:1 (v/v) mit H₂O verdünnt.

Der erhärtete Harzblock wurde aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß herausgelöst und mit einer Säge für den Objektträger eckig zurechtgeschnitten. Anschließend wurde er mit einem Objektträger in eine Schneidevorrichtung (Reichert Ultracut S, Leica) eingespannt und mit einem Glasmesser Semidünnschnitte (ca. 0,5 µm Schnittdicke) hergestellt. Zur Färbung wurde der Semidünnschnitt mit einer Pinzette vom Messer entfernt und auf einen H₂O-Tropfen gelegt. Nach einer Minute wurde der Schnitt mit einem am Ende gerundeten Glasstab für 20 sec auf einen Tropfen Touluidinblau-Lösung gelegt. Danach wurde der Schnitt auf einen mit H₂O benetzten Objektträger überführt und dieser auf einer Heizplatte bei 60 °C erwärmt. Sobald das H₂O verdunstet war, wurde der am Objektträger festklebende Schnitt mit ein paar Tropfen Wasser gespült, auf der Heizplatte getrocknet und im Lichtmikroskop analysiert.

F Ultradünnschnitte

Von einem Bereich im Harzblock mit einer hohen Zelldichte wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Dazu wurde das Glasmesser gegen ein Diamantmesser (Diatome) ausgetauscht und das Becken vor dem Messer mit H₂O gefüllt. Anschließend wurden Serienschritte mit einer Stärke von 60 - 70 nm hergestellt, wobei die Schnittdicke anhand der Interferenzfarben beurteilt wurde. Die auf dem Wasser schwimmenden Schnitte wurden durch die Chloroformdämpfe von einem getränkten Papierstreifen gestreckt und anschließend mit einem Glasstab auf ein Trägernetz aus Kupfer (200 Mesh, 3,05 mm, Gristine Gröpl, G2450C) überführt, wo sie über Nacht bei Raumtemperatur trockneten. Die Herstellung der Semidünn- und Ultradünnschnitte erfolgte am Institut für Histologie (Veterinärmedizinische Universität, Wien).

G Kontrastierung

Eine sehr effiziente und häufig verwendete Methode ist die Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat. Mit ihr wird der durch reduzierte Osmiumionen hervorgerufene Kontrast noch weiter verstärkt.

<i>Uranylacetat</i>	<i>2 % (w/v) Uranylacetat in Methanol</i>
---------------------	---

Das Uranylacetat wurde unmittelbar vor dem Gebrauch gefiltert (0,2 µm Porengröße).

<i>Bleizitratlösung (Reynolds)</i>	<i>26,6 g/l (w/v) $Pb(NO_3)_2$ 42,62 g/l (w/v) Natriumzitat • 5 ½ H_2O 0,16 M NaOH in H_2O</i>
------------------------------------	---

Das $Pb(NO_3)_2$ sowie das Natriumzitat wurden in 80 % (v/v) des gewünschten Endvolumens in H_2O gelöst. Das NaOH wurde als eine 1 M Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Salze innerhalb von 30 min durch wiederholtes kräftiges Schütteln gelöst und die Lösung mit H_2O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung war bei 4 °C 2 Wochen haltbar und wurde unmittelbar vor dem Gebrauch filtriert (0,2 µm Porengröße).

Zur Kontrastierung wurde das Kupfernetz mit dem Schnitt 7 min auf einen Tropfen Uranylacetat gelegt. Anschließend wurde das Kupfernetz mit einer Pinzette dreimal 10 sec in H_2O geschwenkt, ca. 10 min luftgetrocknet und anschließend für 5 ½ min mit dem Schnitt nach unten auf einen Tropfen Bleizitratlösung übertragen. Daraufhin wurde das Netz wiederum dreimal in H_2O geschwenkt, auf einem Papierstreifen vorsichtig abgestreift und über Nacht an der Luft getrocknet.

H Transmissionselektronenmikroskopische Analyse

Elektronen, die auf Atome treffen, werden an diesen gestreut, wobei die Größe des Streuwinkels vom Element abhängt. Trifft ein Elektronenstrahl auf einen Bereich, der eine starke Streuung verursacht bedeutet diese, dass der Elektronenstrahl nach dem Objekt nicht direkt auf die Bildebene trifft und somit der entsprechende Bereich auf der Bildebene dunkel erscheint. Ein hoher Kontrast wird daher mit stark streuenden Elementen, wie Osmium, Blei oder Uran erreicht.

Die Schnitte wurden mit einem Elektronenmikroskop (EM900, Zeiss) analysiert. Da die Zellen dicht im Harz gepackt waren, war es möglich mehrere hundert Zellen pro Schnitt zu analysieren.

2.2.13 Kapseln

Kapseln oder *microspheres* sind aus Polymeren bestehende kugelförmige feste Körper, die entweder chemische Verbindungen aufnehmen oder Zellen umschließen können. Neben Protein- und Alginatkapseln gibt es auch Zellulosesulfatkapseln. Diese zeichnen sich durch hohe mechanische Stabilität, variierbare Porengröße und hohes Fassungsolumen aus. Sie ermöglichen im Organismus einen Stoffaustausch der umschlossenen Zellen mit dem umgebenden Gewebe, schützen aber vor einer Eliminierung der Zellen durch das zelluläre Immunsystem (Dautzenberg et al., 1999).

Natriumzellulosesulfat-Kapseln entstehen bei der Polymerisationsreaktion von Natriumzellulosesulfat mit Polydimethyldiallylammoniumchlorid. Werden vor der Polymerisation dem Natriumzellulosesulfat Zellen beigemischt, werden diese bei der Polymerisation in die Kapseln eingeschlossen. Alle verwendeten Kapseln wurden von der Firma Bavarian Nordic bezogen.

2.2.14 EDV technische Methoden

A Klonierungsstrategien

Alle Klonierungsstrategien und Restriktionsmuster wurden mit Unterstützung des Programms Clone Manager (Version 4 und 5, Scientific and Educational Software Incorporation) erstellt.

B Primer-Suche

Geeignete *primer* für Sequenzierung und PCR wurden mit dem Programm Primer Designer (Version 3 und 4, Scientific and Educational Software Incorporation) bestimmt.

C Auswertung von Sequenzen

Alle vergleichenden Sequenzbewertungen wurden mit dem Programm Align Plus (Version 3, Scientific and Educational Software Incorporation) durchgeführt.

D Darstellung von experimentellen Daten

Numerische Daten wurden mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 2.0 und 3.0, Graph Pad Software Incorporation) ausgewertet und graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion CYP2B1-exprimierender Zellen

Die Familie der Cytochrom P450-Enzyme enthält Isoformen, die cytostatisch wirkende Medikamente der konventionellen Krebstherapie aktivieren und damit für ihre Wirksamkeit Grundvoraussetzung sind. Die Isoform CYP2B1 ist einer der Hauptkatalysatoren für die Aktivierung von Oxazaphosphorinen, wie Cyclophosphamid (CPA) oder Ifosfamid (IFO), die bereits seit mehr als 30 bzw. 10 Jahren in der konventionellen Chemotherapie angewandt werden (Kokron, 1974). Allerdings wird CYP2B1 fast ausschließlich in der Leber produziert. Bis die aktivierten Oxazaphosphorine nach dem Durchlauf der Leber auf den Tumor treffen, verteilen sie sich auch in allen anderen Organen. Um eine Aktivierung von Oxazaphosphorinen ähnlich wie in der Leber direkt im Tumor zu erreichen, besteht die Möglichkeit, Zellen gentechnisch so zu verändern, dass sie CYP2B1 produzieren. Werden diese Zellen in den Tumor oder dessen Nähe platziert, ist eine höhere lokal begrenzte Konzentration von aktiven Metaboliten zu erwarten.

3.1.1 Klonierung eines nicht-viralen CYP2B1-Expressionsvektors

Zur Expression von CYP2B1 wurde ein Vektor hergestellt, bei dem die CYP2B1-cDNA unter der Kontrolle des frühen Promotors des Cytomegalie-Virus (CMV) steht und durch das Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormones* (BGH) begrenzt wird (vgl. Abbildung 20). Dazu wurde ein 1,6 kb großes Fragment des XhoI/XbaI geschnittenen Vektors pSW1 (Kedzie et al., 1991), das die komplette cDNA des CYP2B1-Gens enthielt, zwischen CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal des Vektors pcDNA3 inkloniert (vgl. Abbildung 20 und 66). Das neukonstruierte Plasmid pc3/2B1 wurde sowohl durch Restriktionsanalyse sowie durch Sequenzierung der flankierenden Bereiche verifiziert.

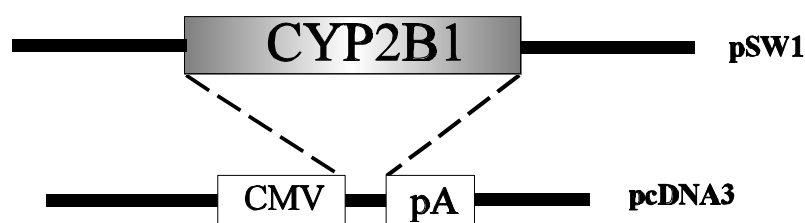


Abbildung 20: Konstruktion des Plasmids pc3/2B1

Die cDNA von CYP2B1 wurde aus dem Vektor pSW1 herausgeschnitten und zwischen CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal des Vektors pcDNA3 (Invitrogen) inkloniert (vgl. auch Abbildung 66).

3.1.2 Herstellung von stabil CYP2B1-exprimierenden Zellklonen

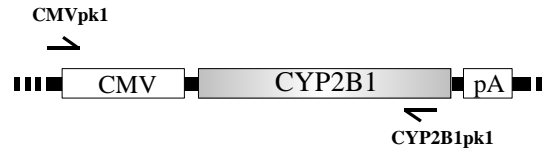
Die hier gezeigten Experimente wurden mit Katzennierenzellen (Crandell *Feline Kidney Cells*, CrFK (Crandell et al., 1973)) begonnen, da sie leicht zu kultivieren und transfizieren sind, sowie eine hohe Expression mit den eingesetzten Konstrukten zeigen. Zum funktionellen Nachweis der CYP2B1-Expressionskassette wurden 10 µg des CYP2B1-Expressionsplasmids pc3/2B1 mittels Kalziumphosphatpräzipitation in CrFK-Zellen transfiziert (vgl. 2.2.2 E Transfektion von Zellen). Da der Vektor zusätzlich ein Gen für eine Neomycinresistenz enthält, war es möglich auf eine Integration des Vektors in das zelluläre Genom zu selektionieren. 7 Klone wurden gepickt und soweit expandiert, dass genügend Zellen zum Einfrieren und für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen.

A Nachweis der Kontinuität der CYP2B1-Expressionskassette mittels PCR

Die Integration des nicht-viralen Vektors pc3/2B1 erfolgt über eine nicht-homologe Rekombination, wobei sich der Vektor theoretisch an jeder Stelle öffnen kann und an einem zufälligen Locus in das zelluläre Genom integriert wird. Dabei ist es möglich, dass beim Öffnen des Plasmids während der Integration die CYP2B1-Expressionskassette unterbrochen wird und die Zellen trotz Neomycin-Resistenz kein funktionelles CYP2B1 produzieren können. Aus diesem Grund wurde das Vorhandensein der CYP2B1-Expressionskassette in den einzelnen Zellklonen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Dazu wurde chromosomale DNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert (vgl. 2.2.5 A Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Guanidiniumisothiocyanat („Guano“)) und 2 µg für eine PCR-Reaktion eingesetzt (vgl. 2.2.5 C Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)). Zum Nachweis der CYP2B1-Kassette in CrFK-Klonen wurden die Primer CMVpk1 und CYP2B1pk1 verwendet. Der *forward* Primer CMVpk1 bindet am 5'-Ende des CMV-Promotors, während der *reverse* Primer CYP2B1pk1 am 3'-Ende der CYP2B1-cDNA bindet (vgl. Abbildung 21 A). Von den beiden getesteten Klonen C8III-1 und C8III-2 zeigten beide eine spezifische Bande der erwarteten Größe von 2,3 kb (vgl. Abbildung 21 B, Spuren 4 und 5). Diese Bande befand sich im Agarosegel auf der gleichen Höhe wie die Bande, die nach der PCR mit dem Plasmid pc3/2B1 auftrat (vgl. Abbildung 21 B, Spur 2). Weder eine Reaktion mit chromosomaler DNA von unveränderten Zellen (CrFKwt, vgl. Abbildung 21 B, Spur 3) noch eine PCR-Reaktion bei der einer der beiden Primer (vgl. Abbildung 21 B Spur 6 und 7) fehlte, ergab ein Signal.

Damit ist die PCR spezifisch für die CMV-CYP2B1-Expressionskassette. In beiden Klonen (C8III-1 und C8III-2) existierte eine intakte CMV-CYP2B1-Expressionskassette.

A



B

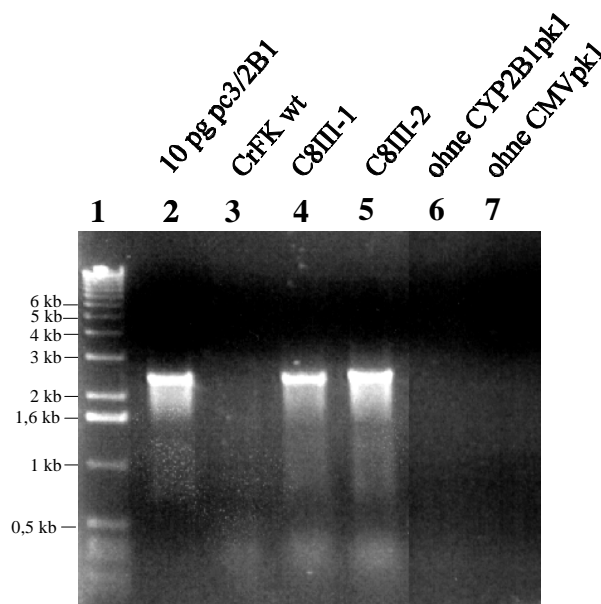


Abbildung 21: Nachweis der Kontinuität der CYP2B1-Expressionskassette in CrFK-Zellklonen

(A) Die Primer CMVpk1 und CYP2B1pk1 binden am 5'-Ende des CMV-Promotors bzw. am 3'-Ende des CYP2B1-Gen, so dass ein PCR-Amplifikat von 2336 bp entsteht. (B) Von den stabil transfizierten Klonen und den parental CrFKwt-Zellen wurde von zwei Klonen chromosomale DNA isoliert und 2 µg für eine PCR eingesetzt. Weiterhin wurden in einem Reaktionsansatz 10 pg des Plasmids pc3/2B1 (10 pg pc3/2B1) eingesetzt und um eine mögliche Kontamination auszuschließen, wurde DNA aus CrFKwt-Zellen untersucht (CrFKwt). Ein falsches *annealing* der Primer wurde durch Ansätze mit nur jeweils einem *primer* untersucht (ohne CYP2B1pk1, ohne CMVpk1).

B Nachweis des CYP2B1-Proteins mittels Western Blot

Um die Fähigkeit des CMV-CYP2B1-Konstrukts zur CYP2B1-Expression zu untersuchen, wurde das Vorhandensein des CYP2B1-Proteins exemplarisch in den beiden CrFK-Klonen C8III-1 und C8III-2 mittels Western Blot (vgl. 2.2.10 A Western Blot) analysiert. Die Cytochrome der

P450-Superfamilie sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Mitochondrien lokalisiert (Dai et al., 1998). Aus diesem Grund wurde zur Isolierung eine Proteinextraktionsmethode gewählt, bei der Membranproteine angereichert werden. Die Proteine wurden durch eine denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einem anti-CYP2B6-Antikörper detektiert. Obwohl dieser Antikörper als anti-CYP2B6-Antikörper deklariert ist, wurde er ursprünglich gegen aufgereinigtes CYP2B1-Antigen erzeugt und bindet daher auch spezifisch an CYP2B1 (vgl. Katalog der Firma GENTEST). Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden Lebermikrosomen (Leberzellfragmente) mit definiertem CYP2B1-Gehalt verwendet (vgl. 2.2.10 Western Blot).

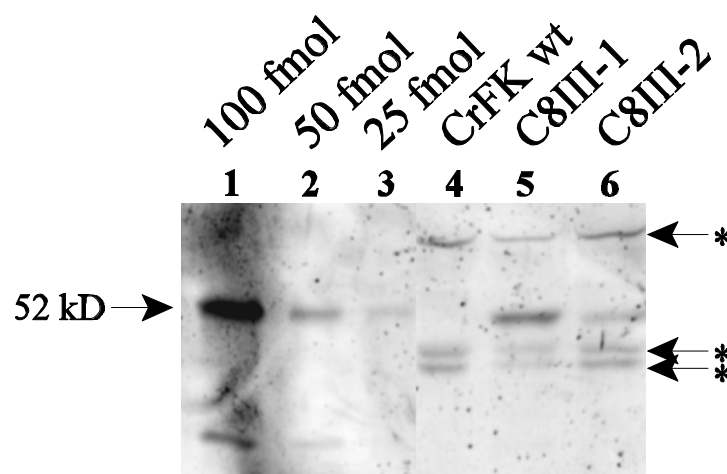


Abbildung 22: CYP2B1-Nachweis in zwei stabil transfizierten CrFK-Klonen.

Von CrFKwt-Zellen sowie von den Klonen C8III-1 und C8III-2 wurden Membranproteine extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurden 25 fmol, 50 fmol bzw. 100 fmol CYP2B1 in Form von Lebermikrosomen mit definiertem CYP2B1-Gehalt aufgetragen. Der spezifische Nachweis erfolgte mit einem anti-CYP2B6-Primärantikörper und mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörper. Neben der spezifischen CYP2B1-Bande traten auch unspezifische Banden (*) bei den Extrakten aus CrFK-Zellen auf.

Der Western Bot zeigte, dass die stabil transfizierten Klone C8III-1 und C8III-2 ein Protein produzieren (vgl. Abbildung 22, Spuren 5 und 6), das auf gleicher Höhe mit microsomalen CYP2B1 (vgl. Abbildung 22, Spuren 1 - 3) läuft und der zu erwartenden CYP2B1-Größe von 52 kD (Agrawal and Shapiro, 1996) entspricht. Diese Bande trat nur bei den transfizierten Klonen C8III-1 und C8III-2 und nicht bei den CrFKwt-Proteinextrakten auf (vgl. Abbildung 22, Spuren 4 - 6). Beim Vergleich der beiden transfizierten Klone C8III-1 und C8III-2 ergab die Bande beim Klon C8III-1 im Vergleich zu den unspezifischen Banden ein stärkeres Signal, was auf mehr CYP2B1-Protein in den Zellen hinweist (vgl. Abbildung 22, Spuren 5 und 6).

Wie gezeigt wird in beiden CrFK-Klonen (C8III-1 und C8III-2) die CYP2B1-Isoform

synthetisiert. Im weiteren soll nun die Funktionalität dieses Enzyms analysiert werden.

C Nachweis der biochemischen Aktivität von exprimierten CYP2B1

Verschiedene Isoformen der Cytochrom-P450 Enzymfamilie katalysieren eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen. Die Isoform CYP2B1 zeigt unter anderem eine Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität, die die Verbindung 7-Pentoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin dealkyliert (Donato et al., 1993). Die Menge an produziertem Resorufin innerhalb eines definierten Zeitintervalls spiegelt die enzymatische Aktivität der CYP2B1-exprimierenden Zellen wieder (vgl. 2.2.3 Resorufin-Test). Diese Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität ist spezifisch für die Isoformen 2B1 und 1A1 (Donato et al., 1993) (vgl. Abbildung 23). Zum Nachweis von funktionellem CYP2B1 wurden 2×10^6 der zu untersuchenden Zellen ausgesät und mit Medium, das 7-Pentoxyresorufin enthält, überschichtet. Die CYP2B1 produzierenden Zellen dealkylieren das in die Zellen eingedrungene 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin, welches wiederum in das Medium gelangt (vgl. 2.2.3 A Resorufin-Test). Das innerhalb einer halbstündigen Inkubationszeit produzierte und in das Medium abgegebene Resorufin spiegelt die katalytische Aktivität des zellulären CYP2B1 wieder.

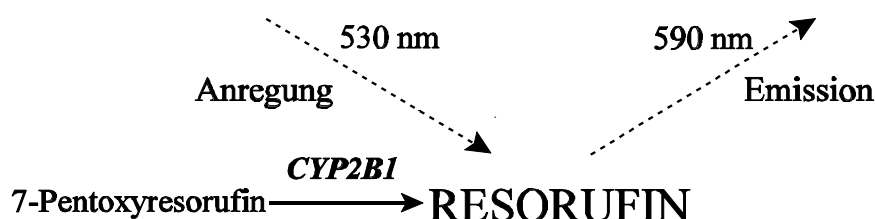


Abbildung 23: Prinzip des Resorufintests

7-Pentoxyresorufin wird durch die Alkoxy-O-Dealkylase-Aktivität von CYP2B1 dealkyliert. Dabei entsteht Resorufin, das sich durch seine Fluoreszenz nachweisen lässt. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zum produzierten Resorufin.

Zur Messung der Fluoreszenz wurde bei einer Dreifachbestimmung der Zellüberstand von den Zellen abgenommen, die Fluoreszenz bestimmt und anhand einer Resorufinstandardkurve die Menge des produzierten Resorufin im Überstand berechnet.

Bei der Untersuchung der beiden Zellklone C8III-1 und C8III-2 zeigten beide eine Produktion von Resorufin, wobei C8III-1 deutlich mehr Resorufin produzierte als der Klon C8III-2 (vgl. Abbildung 24 B). Parallel wurde auch der Proteingehalt von 2×10^6 CrFK- Zellen bestimmt (0,28 mg) (vgl. 2.2.10 C Proteinbestimmung nach Lowry (Biorad)) und mit der 7-Pentoxyresorufin-Dealkylaseaktivität in kultivierten Leberzellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die katalytische

Aktivität von C8III-1-Zellen (535 pmol/mg) der 3fachen Aktivität von kultivierten Hepatozyten (180 pmol/mg) (Donato et al., 1992) entspricht.

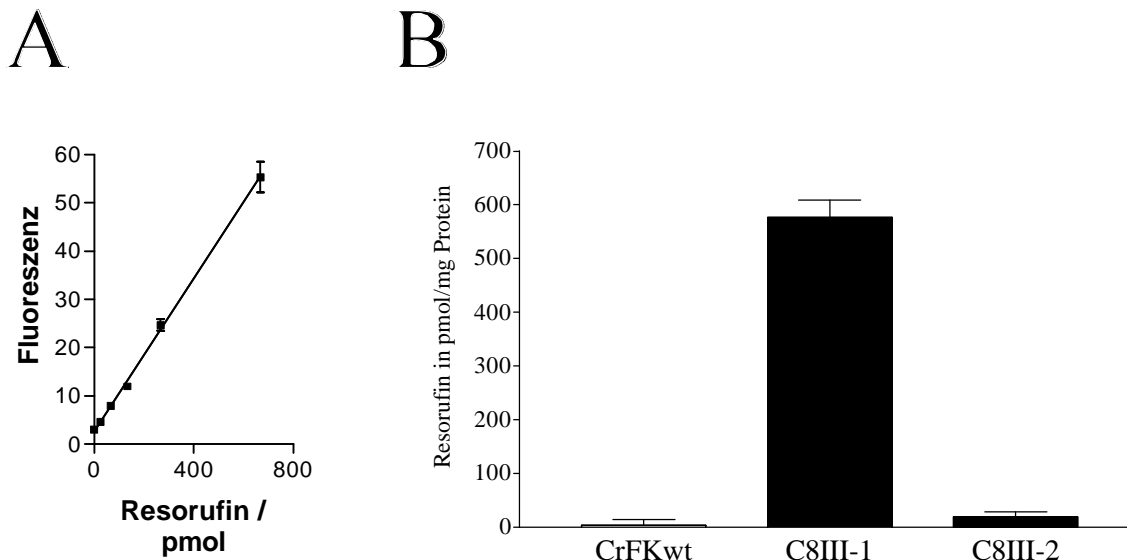


Abbildung 24: Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellklonen

(A) Standardkurve von definierten Resorufinmengen (B) Produziertes Resorufin in den Zellklonen: 2×10^6 Zellen der Klone C8III-1 und C8III-2 wurden in Anwesenheit von 7-Pentoxyresorufin inkubiert. Durch CYP2B1 produziertes Resorufin wurde durch Fluoreszenz (Anregung bei 530 nm, Emission bei 590 nm) nachgewiesen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Zellen des Klons C8III-1 eine stärkere enzymatische CYP2B1-Aktivität zeigen, als die Zellen des Klons C8III-2. Dies kann auf die Menge des gebildeten CYP2B1-Proteins zurückgeführt werden. Bereits beim immunologischen Nachweis zeigte der Klon C8III-1 eine deutlich stärkere CYP2B1-Bande als Klon C8III-2 (vgl. Abbildung 22, Spuren 5 und 6). Die enzymatische Aktivität bezogen auf den Gesamtproteingehalt ist dreimal mal so hoch wie bei kultivierten Hepatozyten (Donato et al., 1993).

3.2 Nachweis der CYP2B1-abhängigen Aktivierung von Oxazaphosphorinen *in vitro*

Neben der Dealkylierung von 7-Pentoxyresorufin kann CYP2B1 Cytostatika wie Ifosfamid (IFO) (vgl. 1.2 E Suizidgene) oder Cyclophosphamid (CPA) aktivieren. CYP2B1 aktiviert beide Verbindungen zu einer metastabilen 4-Hydroxyform, die spontan mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von wenigen Minuten *in vitro* in die aktiven Metaboliten (Iso-)Phosphoramidmustard und Acrolein zerfällt (Niemeyer et al., 1989). Die entstehenden Zerfallsprodukte (Iso-)Phosphoramidmustard und Acrolein alkylieren DNA und Proteine. Besonders das (Iso-)Phosphoramidmustard wirkt cytostatisch/cytotoxisch, wodurch entweder die Teilungsaktivität der Zelle verlangsamt wird oder diese abstirbt (Davidoff and Mendelow, 1993; Powers and Sladek, 1983; Sladek, 1972).

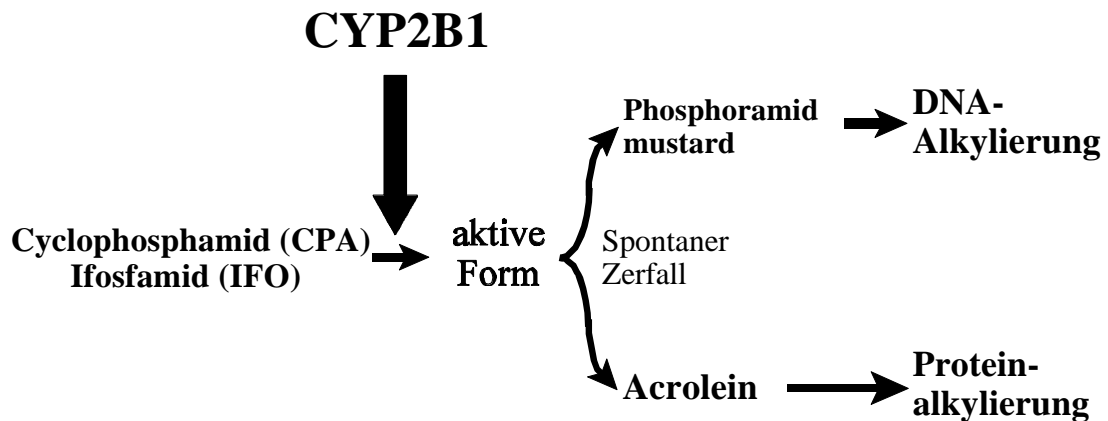


Abbildung 25: Aktivierung von Oxazaphosphorinen durch CYP2B1

CYP2B1 hydroxyliert CPA bzw. IFO, wodurch eine aktive instabile Verbindung entsteht, die spontan in die Metaboliten (Iso-)Phosphoramidmustard und Acrolein zerfällt. Diese aktiven Metaboliten bewirken eine Alkylierung von DNA und Proteinen.

Werden CYP2B1-exprimierende Zellen in Gegenwart von Oxazaphosphorine kultiviert, ist zu erwarten, dass sie die Oxazaphosphorine aktivieren und sich die dabei entstehenden toxischen Metaboliten negativ auf das Zellwachstum auswirken. Dieser Effekt, der für die antitumorigen Wirkung verantwortlich ist, sollte nun im weiteren analysiert werden.

3.2.1 Suizideffekte bei CrFK-Zellen

Um dies zu überprüfen, wurden 4×10^4 Zellen der CrFK-Zellklone C8III-1 und C8III-2 ausgesät und in Gegenwart von 1 mM CPA oder 2 mM IFO 6 Tage kultiviert. Anschließend wurden die adhärent wachsenden Zellen fixiert und mit dem Farbstoff Giemsa der Zellrasen angefärbt (vgl. 2.2.3 B Cytotoxizitätstest). Die Konzentration der beiden Drogen war so hoch gewählt, dass bei einer CYP2B1 abhängigen Umsetzung genügend Metaboliten entstehen um eine hohe Toxizität für die Zellen zu erreichen (Chen et al., 1996).

Ohne Behandlung mit CPA oder IFO wuchsen die Zellklone C8III-1 und C8III-2 zu konfluenten Zellrasen (vgl. Abbildung 26; ohne), die nach Anfärbung mit Giemsa dunkel sichtbar wurden. Im Gegensatz zeigten beide Zellklone in Gegenwart von 1 mM CPA oder 2 mM IFO eine deutliche Hemmung des Wachstums (vgl. Abbildung 26; 1 mM CPA und 2 mM IFO). Dies deutet darauf hin, dass sowohl CPA als auch IFO durch das in den Zellen exprimierte CYP2B1 zu toxischen Metaboliten umgesetzt wird, welche das Wachstum der Zellen hemmen.

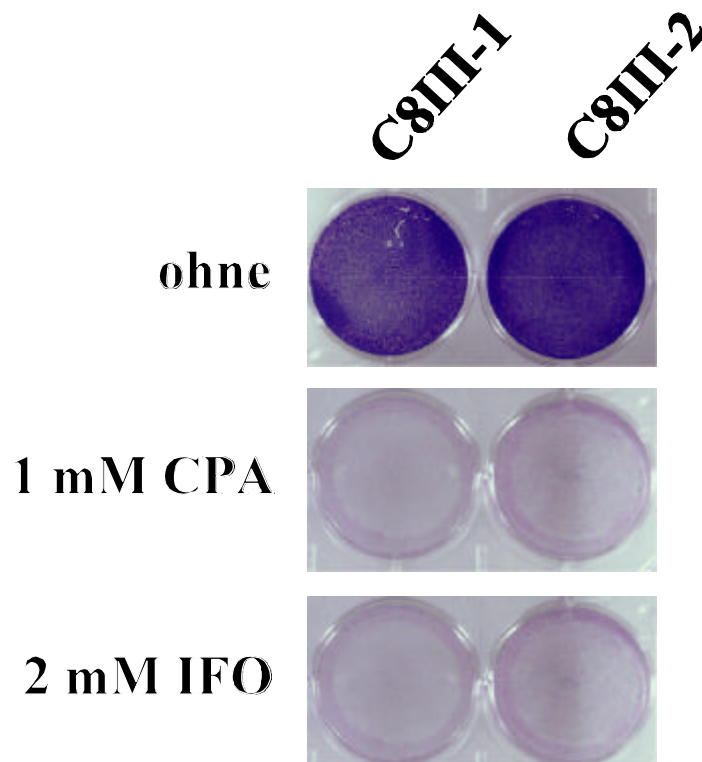


Abbildung 26: Cytotoxizitätseffekte auf pc3/2B1 transfizierte Zellen nach IFO- oder CPA-Behandlung
 4×10^4 Zellen der Klone C8III-1 und C8III-2 wurden ausgesät und entweder ohne Drogen oder mit 1 mM CPA bzw. 2 mM IFO kultiviert. Nach sieben Tagen wurden der Zellrasen fixiert und mit Giemsa angefärbt.

Um Aufschluß über die Wirkung bei unterschiedlichen Konzentrationen zu gewinnen, wurden Zellen des Klons C8III-1 ausgesät und bei verschiedenen IFO-Konzentrationen (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM) inkubiert (vgl. Abbildung 27). Nach der Anfärbung des Zellrasens mit Giemsa zeigte sich, dass ohne IFO sowohl C8III-1-Zellen als auch die parentalen CrFKwt- Zellen zu einem konfluenten Zellrasen wuchsen (vgl. Abbildung 27, 0 mM/IFO). Konzentrationen von 0,25 mM bis 2 mM reduzierten das Wachstum von C8III-1-Zellen auf ein Minimum, wirkten sich aber kaum auf das Wachstum der parentalen Zellen (CrFKwt) aus (vgl. Abbildung 27, 0,25 bis 2 mM/IFO). Bei einer Konzentration von 5 mM war auch das Wachstum der parentalen CrFK-Zellen stark reduziert, was auf einen unspezifischen cytotoxischen Effekt durch Zerfall der nicht aktivierten Droge zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 27, 5 mM/IFO). Das bedeutet, dass CYP2B1-exprimierende Zellen bei physiologisch erreichbaren Konzentrationen (≤ 1 mM) verglichen mit den parentalen CrFK-Zellen deutlich empfindlicher gegenüber IFO sind.

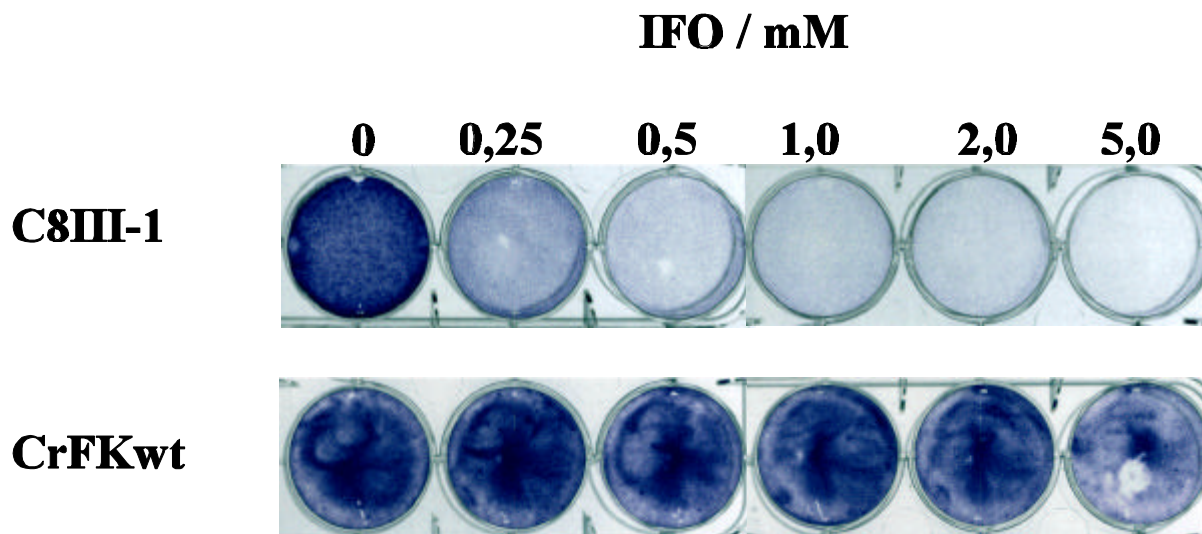


Abbildung 27: Cytotoxische Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende (C8III-1) und parentale Katzennierenzellen (CrFKwt)

Die Zellen wurden in der Gegenwart von verschiedenen IFO-Konzentrationen im Medium kultiviert und nach 7 Tagen mit Giemsa angefärbt.

Zur Quantifizierung des durch IFO verursachten cytotoxischen Effekts, wurden in einem nachfolgenden Experiment die Zellen am letzten Versuchstag trypsinisiert, tote Zellen mit Trypanblau (vgl. 2.2.2 I Färbemethoden) ausgeschlossen und die lebenden Zellen gezählt. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der C8III-1-Zellen schon bei 0,25 mM nur noch 13,5 % bzw. bei 0,5 mM lediglich 7 % der Zellzahl in den unbehandelten Schalen betrug (vgl. Abbildung 28 A, C8III-1). Im Gegensatz dazu sank die Überlebensrate (Quotient zwischen unbehandelten und behandelten Zellen) bei den CrFKwt-Zellen auf lediglich 84 % (0,25 mM IFO) bzw. 70 % (0,5 mM IFO) (vgl. Abbildung 28 A, CrFKwt). Bei Dosen von 1 bis 2 mM verringerte sich die Überlebensrate der C8III-1-Zellen kaum noch (5 % bzw. 4 %), wobei bei den CrFKwt-Zellen die Überlebensrate mit 47 % bzw. 42 % weiter zurückging. (vgl. Abbildung 28 A). Dies bedeutet, dass das intrazelluläre Vorhandensein von CYP2B1 CrFKwt-Zellen gegenüber IFO meßbar empfindlicher macht. Trotz eines unspezifischen Effekts, vor allem bei hohen Dosen IFO in CrFKwt-Zellen bringt die Expression des heterologen CYP2B1 einen höheren Cytotoxizitätseffekt bereits ab 0,5 mM, wo der unspezifische Effekt in den CrFKwt-Zellen noch sehr gering ist (70 %).

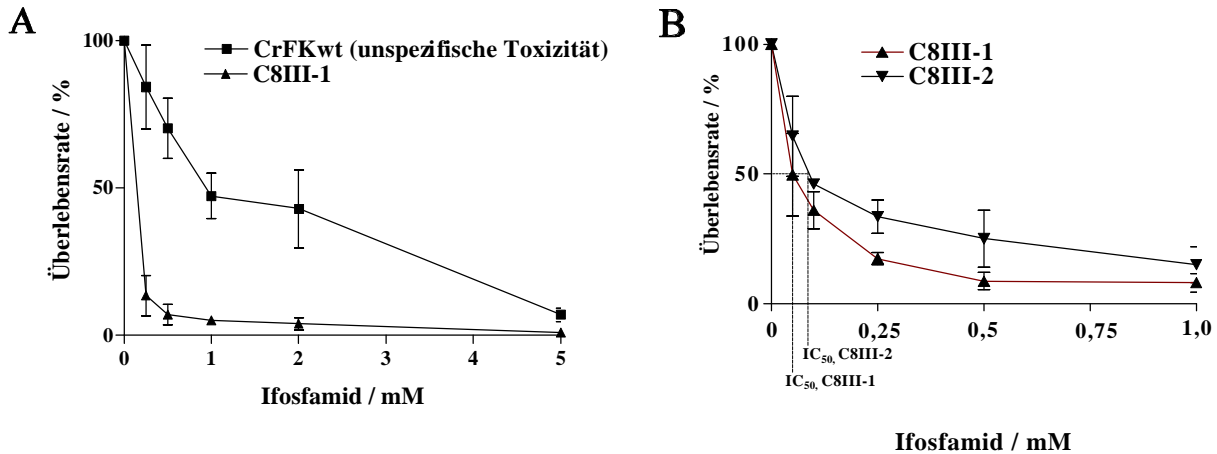


Abbildung 28: Cytotoxische Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende (C8III-1) und parentale Katzennierenzellen (CrFKwt)

Die Zellen wurden in der Gegenwart von verschiedenen IFO- Konzentrationen im Medium kultiviert und nach 7 Tagen trypsiniert, tote Zellen mit Trypanblau ausgeschlossen und die lebenden gezählt. **(A)** Überlebensrate (Quotient zwischen unbehandelten und behandelten Zellen) von C8III-1- und CrFKwt-Zellen. **(B)** Bestimmung der IC_{50} von Klon C8III-1 und C8III-2. Alle Meßpunkte repräsentieren drei unabhängige Experimente mit zugehöriger Standardabweichung.

Um die 50%ige Wachstums-inhibierende Konzentration IC_{50} (*50 % growth inhibitory concentration*) zu bestimmen, wurden die C8III-1- und die C8III-2-Zellen in Gegenwart niedriger IFO-Konzentrationen (0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM) 6 Tage lang kultiviert und am Ende des Experiments die Zellzahl bestimmt (vgl.2.2.2 J Zählen von Zellen). Beim Klon C8III-1 lag die IC_{50} bei 0,05 mM IFO und beim Klon C8III-2, der bereits in vorherigen Experimenten (vgl. Abbildung 22 und 24) eine niedrigere CYP2B1-Aktivität besaß, bei 0,1 mM. Im Vergleich dazu betrug die IC_{50} -Konzentration der CrFKwt-Zellen 1 mM (vgl. Abbildung 28 B).

	CrFKwt	C8III-1	C8III-2
IC_{50} /mM	1	0,05	0,1

Tabelle 3: IC_{50} der getesteten CrFK-Klone

3.2.2 Wirkung auf benachbarte nicht CYP2B1-exprimierende Zellen („*bystander effect*“)

IFO und CPA werden in der konventionellen Chemotherapie durch Cytochrome, die fast ausschließlich in der Leber exprimiert werden, aktiviert. Um Tumore in anderen Organen zu erreichen, müssen diese Medikamente nach ihrer Aktivierung in der Leberzelle diese wieder verlassen können. Im Falle der hier verwendeten CYP2B1 produzierenden Zellen bedeutet dies, dass die aktive Form von CPA und IFO (4-OH-IFO bzw. 4-OH-CPA) aus Zellen wieder freigesetzt wird, um auf unveränderte, nicht CYP2B1- exprimierende Zellen zu wirken. Dieses Phänomen wird als *bystander effect* bezeichnet.

A Wirkung auf Zellen gleichen Ursprungs

Um die Wirkung von IFO, das vorher durch CYP2B1 aktiviert wurde, auf benachbarte, nicht CYP2B1 produzierende Zellen zu untersuchen, wurden C8III-1-Zellen bzw. CrFKwt-Zellen mit Reporterzellen (CK1x2) des gleichen Zelltyps kokultiviert. Die CK1x2-Zellen sind eine stabile Population von CrFK-Zellen, die mit dem β -Galaktosidase transduzierenden retroviralen MLV-Vektor pLXlacZ (vgl. Abbildung 69) infiziert wurden und nun konstitutiv β -Galaktosidase produzieren (Andrea Fleuchaus, persönliche Mitteilung). Wird die Mischpopulation mit X-Gal gefärbt, nehmen ausschließlich die Reporterzellen (CK1x2) eine blaue Farbe an. Auf diese Weise läßt sich ein toxischer Effekt auf die Reporterzellen nachweisen. Die C8III-1- bzw. die CrFKwt-Zellen können nicht angefärbt werden und erscheinen daher weiß. Zur Untersuchung des *bystander effect* wurden 2×10^4 CK1x2-Zellen mit 2×10^4 C8III-1- bzw. CrFKwt-Zellen gemeinsam in eine 3 cm-Schale ausgesät, am nächsten Tag mit verschiedenen Endkonzentrationen IFO (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM) behandelt und nach weiteren 6 Tagen die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit X-Gal gefärbt (vgl. 2.2.3 C Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen).

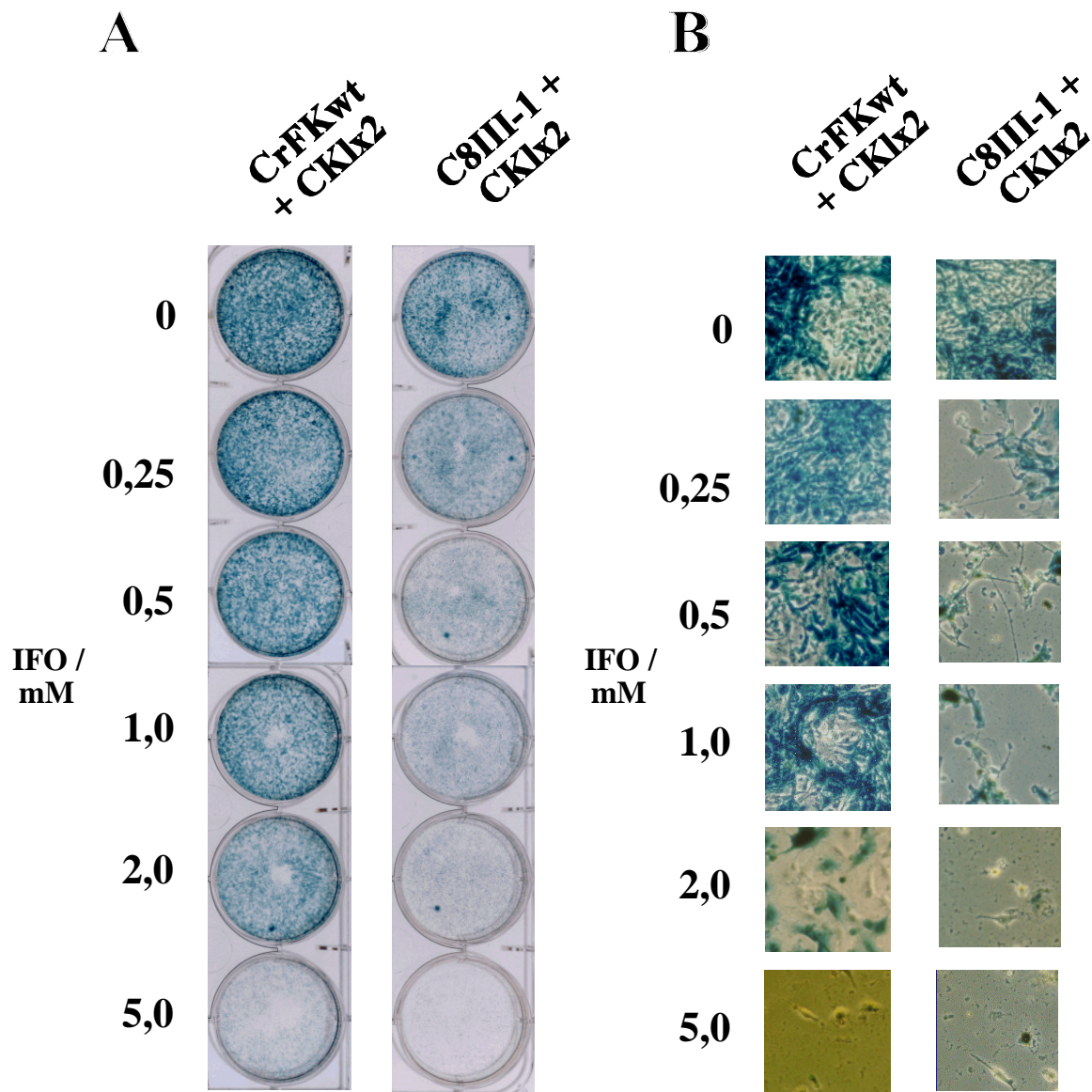


Abbildung 29: Bystander Effect auf β -Galaktosidase exprimierende CrFK-Reporterzellen (CK1x2)
 C8III-1- bzw. CrFKwt-Zellen wurden mit der gleichen Anzahl von stabil β -Galaktosidase exprimierenden CrFK-Zellen (CK1x2) ausgesät und in der Gegenwart von verschiedenen IFO-Konzentrationen kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit X-Gal angefärbt: (A) Makroskopische Aufnahme bzw. (B) Mikroskopische Aufnahme (200x) der Zellen.

Ohne zugesetztes IFO wuchsen CK1x2-Zellen mit C8III-1- bzw. CrFKwt-Zellen zu gleichen Teilen gemischt und ausgesät, innerhalb des Untersuchungszeitraums zu einer konfluenten Mischpopulation (vgl. Abbildung 29 A, CrFKwt + CK1x2 und C8III-1 + CK1x2, 0 mM/IFO). Nach Zugabe von X-Gal färbte sich etwa die Hälfte der Zellen blau, was darauf schließen lässt,

dass beide Zelltypen ähnlich schnell proliferierten. Bei Kokultivierung mit C8III-1-Zellen in Gegenwart von unterschiedlichen IFO-Konzentrationen (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM) waren deutlich weniger CK1x2-Zellen angefärbt (vgl. Abbildung 29 A C8III-1 + CK1x2, 0,25 bis 2 mM/IFO). Im Vergleich war die Zahl der CK1x2-Zellen, die mit CrFKwt-Zellen zusammen kultiviert wurden, bis zu einer Konzentration von 2 mM IFO nicht wesentlich reduziert (vgl. Abbildung 29 A, CrFKwt + CK1x2 0,25 bis 2,0 mM/IFO). Bei 5 mM war die toxische Wirkung von IFO auch ohne Aktivierung so stark, dass sich der Zellrasen kaum anfärbte (siehe Abbildung 29 A, 5 mM/IFO). Um auszuschließen, dass die alkylierende Wirkung der aktiven Metaboliten von IFO nur die β -Galaktosidase-Expression reduziert, wurde die Zellpopulation zusätzlich mikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, dass die Anzahl der blau angefärbten Zellen mit der Farbintensität der Gesamtpopulation korrelierte (vgl. Abbildung 29 B). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass von den CYP2B1-exprimierenden Zellen mit der Zugabe von IFO ein toxischer Effekt auf benachbarte Zellen auftritt.

B Bystander Effect auf endokrine pankreatische Tumorzelllinien

Um auszuschließen, dass der *bystander effect* ein zelltyp-spezifisches Phänomen ist, wurden pankreatische Tumorzelllinien (Rin5), die zuvor mit dem β -Galaktosidase transduzierenden Vektor pLXlacZ stabil infiziert worden waren (RIN1x2-Zellen) (Andrea Fleuchaus, persönliche Mitteilung) als Reporterzellen verwendet. In einem Kokultivierungsexperiment wurden 2×10^4 RIN1x2-Zellen mit der gleichen Anzahl C8III-1- bzw. CrFKwt-Zellen in eine 3 cm-Schale zusammen ausgesät (vgl. Abbildung 30) und im weiteren wie oben beschrieben behandelt.

Bei diesem Experiment zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Kokultivierung mit CK1x2-Zellen: die Population von RIN1x2-Zellen wurde durch IFO stärker reduziert, wenn sich CYP2B1 produzierende Zellen mit im Zellkulturgefäß befanden (vgl. Abbildung 30 A). Eine deutliche Hemmung auf RIN1x2-Zellen trat jedoch erst ab 1 mM IFO auf. Bei niedrigeren Konzentrationen war weder makroskopisch (vgl. Abbildung 30 A) noch mikroskopisch (vgl. Abbildung 30 B) eine Reduktion der RIN1x2-Population zu beobachten.

Insgesamt scheinen CYP2B1-exprimierende Zellen auch auf RIN5-Zellen in der Gegenwart von IFO einen *bystander effect* ausüben zu können. Im Vergleich zu dem Kokultivierungsexperiment mit CK1x2-Zellen, bei dem bereits bei 0,25 mM IFO eine deutliche Hemmung des Zellwachstums in der Gegenwart von CYP2B1-exprimierenden Zellen auftrat, war der *bystander effect* auf RIN1x2-Zellen, der erst ab 1 mM sichtbar wird, jedoch schwächer ausgeprägt.

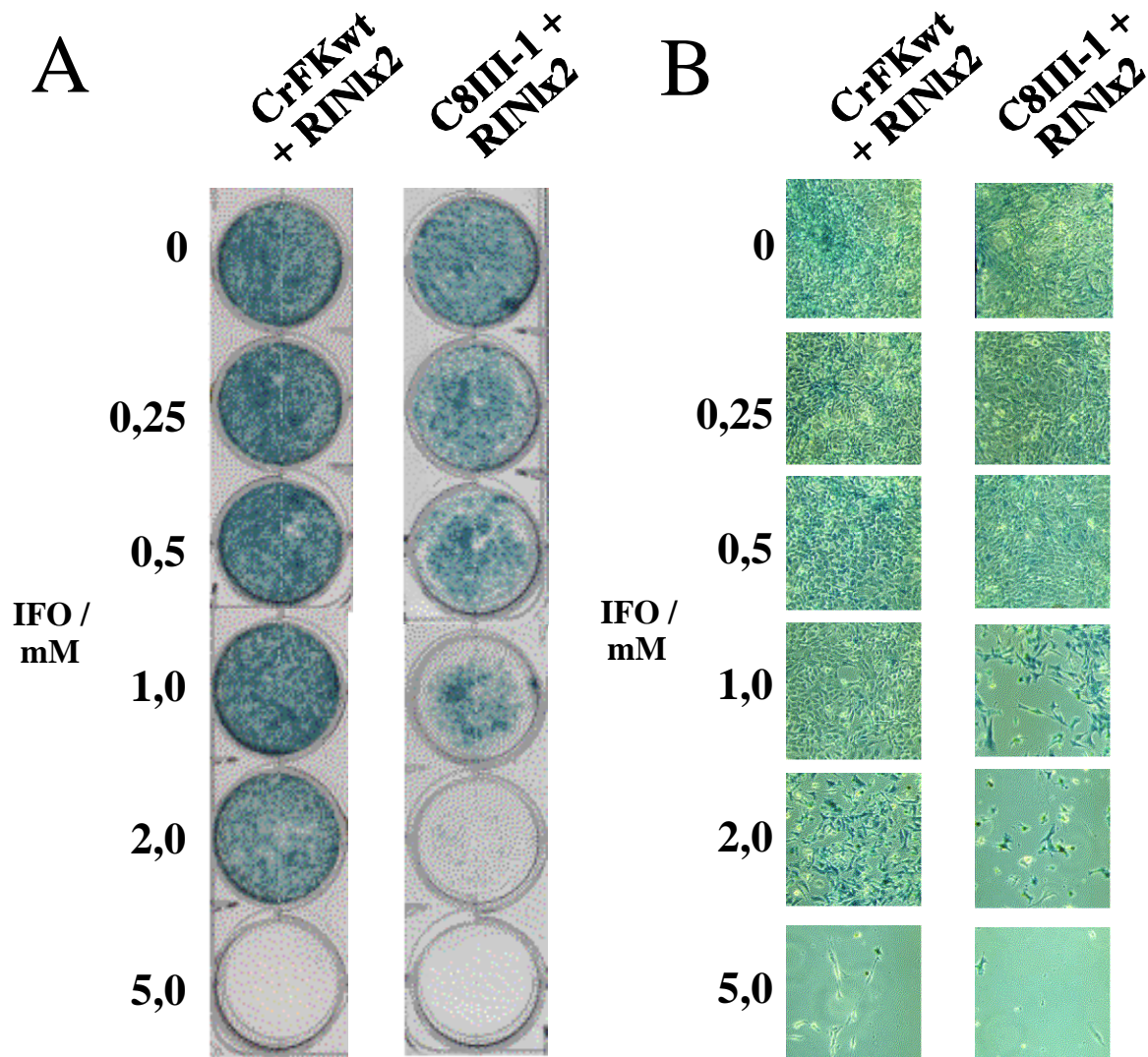


Abbildung 30: Bystander Effect auf β -Galaktosidase exprimierende RIN5-Reporterzellen

2×10^4 C8III-1- bzw CrFKwt-Zellen wurde mit der gleichen Anzahl von stabil β -Galaktosidase exprimierenden RIN5-Zellen (RINx2) ausgesät und in der Gegenwart von verschiedenen IFO-Konzentrationen (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM) kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit X-Gal angefärbt. (A) Makroskopische Aufnahme bzw. (B) mikroskopische Aufnahme (200x) der Zellen.

i Quantifizierung des *bystander effect* auf exocrine Pankreaskarzinomzellen

Bei den bisher beschriebenen Experimenten zur Untersuchung des *bystander effects* wurden die Zellen, die CYP2B1-exprimieren, und die Reporterzellen zu gleichen Teilen gemischt und anschließend die Mischpopulation mit unterschiedlichen IFO-Konzentrationen behandelt. Um Aufschluß über die Stärke des *bystander effect* bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zwischen Reporter- und CYP2B1-exprimierenden Zellen zu bekommen, wurde ein CrFK-Zellgemisch mit unterschiedlichen Anteilen von C8III-1- und CrFKwt-Zellen mit der gleichen Anzahl von PANC1-Zellen ausgesät (vgl. Tabelle 2 und 4). Zur Unterscheidung der CrFK- und der PANC1-Zellen wurden die PANC1-Zellen zuvor stabil mit dem Plasmid pCMVegfp transfiziert. Das Plasmid pCMVegfp trägt das egfp (*enhanced green fluorescent protein*)-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des Cytomegalie-Virus (CMV) und wird begrenzt durch das *bovine growth hormone* (BGH)-Polyadenylierungssignal (vgl. Abbildung 71). Weiterhin trägt das Plasmid eine Neomycinresistenzkassette (neoR), die eine Selektion auf Zellen mit dem integrierten Plasmid ermöglicht. Die egfp-exprimierenden Zellen lassen sich leicht durch ihr grünes Leuchten unter UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop (vgl. Abbildung 31 A und B) oder im FACS (vgl. Abbildung 31 C) sichtbar machen.

#	Gruppe	PANCgfp1	C8III-1	CrFKwt
1	PANCgfp1	100 %		
2	C8III-1		100 %	
3	CrFKwt			100 %
4	50 %	50 %	50 %	
5	45 %	50 %	45 %	5 %
6	25 %	50 %	25 %	25 %
7	5 %	50 %	5 %	45 %
8	0 %	50 %		50 %

Tabelle 4: Zusammensetzung der gemischten Population von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen und egfp-positiven PANC1-Zellen (PANCgfp1)

1×10^5 pankreatische Zellen wurden mit der gleichen Anzahl an Zellen einer gemischten CrFK-Population aus C8III-1- und CrFKwt-Zellen in eine 6 cm Schale ausgesät. Die ausgesäte Gesamtpopulationen enthielt unterschiedliche Mengen an CYP2B1-exprimierenden C8III-1-Zellen (0 %, 5 %, 25 %, 45 % und 50 %) (vgl. Tabelle 4, #4 bis #8). Als Kontrollen wurden

jeweils 1×10^5 Zellen der Einzelpopulationen PANCgfp1, C8III-1 und CrFKwt ausgesät (vgl. Tabelle 4, #1 bis #3).

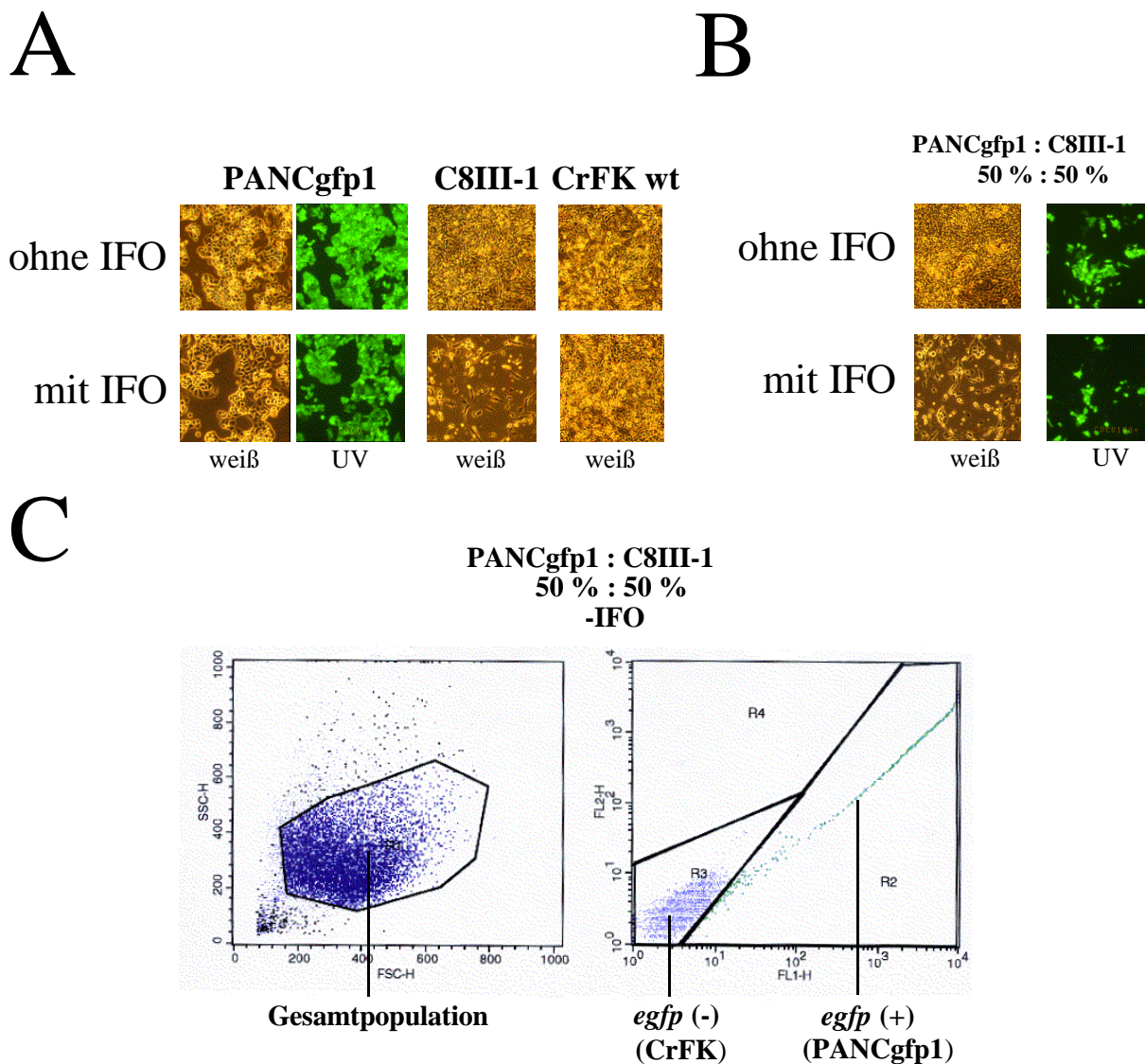


Abbildung 31: Kokultivierung von pankreatischen Tumorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen

(A) Mikroskopische Bilder der Einzelpopulationen mit 0,5 mM und ohne IFO, bei PANCgfp1-Zellen in Weiß- und unter UV-Licht. (B) Mikroskopische Bilder einer Mischpopulation (50 % C8III-1, 50 % PANCgfp1) mit und ohne IFO in Weiß- und unter UV-Licht. (C) Exemplarische FACS-Analyse der gleichen Mischpopulation ohne IFO: links: Darstellung der Gesamtpopulation mit *forward scatter* (FSC-H) und *sideward scatter* (SSC-H); rechts: mit Grün- (FL1-H) und Rot- (FL2-H) Fluoreszenz. Egfp-positive Zellen befinden sich in Region 2 (R2), egfp-negative Zellen befinden sich in Region 3 (R3).

In den vorangegangenen Suizid- und Kokultivierungsexperimenten wurde ersichtlich, dass eine IFO-Konzentration, die zwischen 0,5 und 1 mM liegt, auf der einen Seite eine CYP2B1-exprimierende Population stark schädigt, jedoch die parentalen Zellen im Wachstum nur wenig beeinflusst (vgl. Abbildung 28 A). Weiterhin entsprechen 0,5 und 1 mM auch Konzentrationen, die bei einer konventionellen Chemotherapie im Patientenserum erreicht werden können (Yu and Waxman, 1996). Daher wurden die Zellen in den definierten Mischungsverhältnissen (vgl. Tabelle 4) ausgesät und am folgenden Tag mit 0,5 mM IFO behandelt. Nach 6 Tagen wurden die Zellen in jeder Zellkulturschale gezählt und der Anteil der egfp-exprimierenden Zellen mittels einer FACS-Analyse bestimmt (vgl. Abbildung 31 C). Daraus ließ sich der cytotoxische Effekt auf die CrFK- und die PANCgfp1-Zellen berechnen.

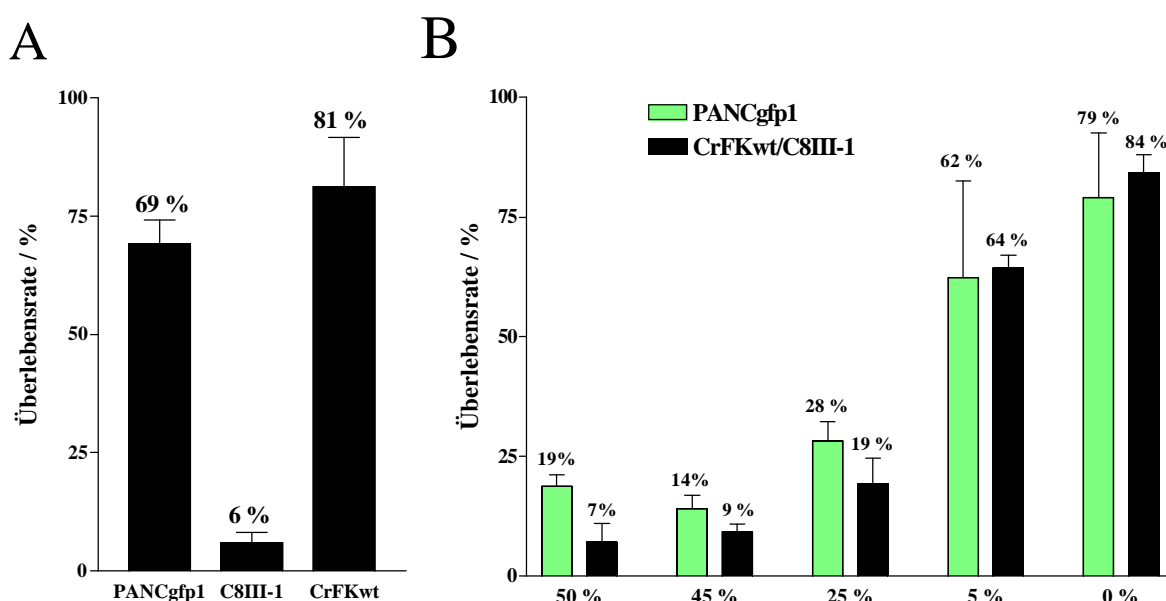


Abbildung 32: Toxische Wirkung von IFO auf Einzelpopulationen oder eine Mischkultur bestehend aus CrFKwt, C8III-1 und PANCgfp1-Zellen.

(A) Überlebensrate von PANCgfp1-, CrFKwt- und C8III-1-Reinkulturen nach Behandlung mit 0,5 mM IFO. (B) Überlebensrate von egfp-positiven PANCgfp1-Zellen und egfp-negativen CrFKwt/C8III-1-Zellen bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (vgl. Tabelle 4) nach Behandlung mit IFO.

Die Daten repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit zugehöriger Standardabweichung.

Die unveränderten CrFK-Zellen (CrFKwt) wurden in diesem Experiment verwendet um zu gewährleisten, dass in jeder Gruppe (vgl. Tabelle 4, #4 bis #8) unabhängig vom Anteil der CYP2B1-exprimierenden Zellen (C8III-1) die gleiche Zellzahl von 2×10^5 Zellen ausgesät wurde. Damit sollten Probleme durch variierende Zellzahlen beim Aussäen und deren Einfluss auf die Gesamtwachstumsrate vermieden werden.

Wurden die Einzelpopulationen in Gegenwart von 0,5 mM IFO kultiviert, reduzierte sich die Überlebensrate (Quotient aus der Zellzahl des IFO-behandelten Ansatzes und der Zellzahl des unbehandelten Ansatzes) der CrFKwt-Zellen auf 81 %, der PANCgfp1-Zellen auf 69 % und der C8III-1-Zellen auf 6 % (vgl. Abbildung 32 A). Die Erniedrigung der Überlebensrate der nicht CYP2B1-exprimierenden Zellen (PANCgfp1 und CrFKwt) läßt sich auf eine unspezifische Toxizität von IFO zurückführen (vgl. 4.1.2 A Suizideffekte).

In einer Mischkultur hing die Überlebensrate sowohl der CrFKwt/C8III-1-Population als auch der PANCgfp1-Population vom Anteil der CYP2B1-exprimierenden Zellen ab (vgl. Abbildung 32 B). Ohne C8III-1-Zellen lag die Überlebensrate der CrFKwt/C8III-1-Population bei 84 % und der PANCgfp1-Zellen bei 79 % (vgl. Abbildung 32 B, 0 %). Dies spiegelt unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität das Ergebnis mit den Einzelpopulationen (vgl. Abbildung 32 A) wieder.

Exprimierten 50 % der ausgesäten Zellen CYP2B1 lag die Überlebensrate für die PANCgfp1-Zellen bei 19 % und die der CrFKwt/C8III-1-Population bei 7 % (vgl. Abbildung 32 B, 50 %). Waren 45 % der ausgesäten Zellen CYP2B1 positiv, ergab sich ein ähnliches Bild (9 % für CrFKwt/C8III-1-, 14 % für PANCgfp1-Zellen) (vgl. Abbildung 32 B, 45 %). Bei 25 % CYP2B1 positiver Zellen in der Population lag die Überlebensrate bei 19 % der gemischten CrFK-Population bzw. 28 % der PANCgfp1-Population und bei 5 % Anteil CYP2B1 positiver Zellen bei 64 % (CrFKwt/C8III-1-Zellen) bzw. 62 % (PANCgfp1-Zellen) (vgl. Abbildung 32 B, 25 % und 5 %).

Somit war das Wachstum der pankreatischen Tumorzellen, selbst wenn nur 25 % der ausgesäten Zellen CYP2B1-exprimierten, auf ein Viertel reduziert. Auch höhere Anteile an CYP2B1-exprimierenden Zellen (45 % und 50 %) konnten den Wachstums-hemmenden Effekt kaum verbessern. Dies kann daran liegen, dass die restlichen 20-25 % der Tumorzellen während der Entstehung des aktiven 4OH-IFOs durch verminderte Zellteilungsaktivität oder andere Gründe (vgl. 4.1.2 *Bystander Effect*) nicht sehr empfänglich für den *bystander effect* der C8III-1-Zellen waren.

ii *Bystander Effect* auf A20-Suspensionszellen

Durch CYP2B1 aktiviertes IFO hemmt das Wachstum von allen bisher untersuchten Zellarten sowohl bei Aktivierung innerhalb der Zelle, als auch durch den *bystander effect*. Um den Zeitverlauf der Hemmung durch den *bystander effect* zu verfolgen, wurden A20-Zellen (vgl. 2.1.8 Zelllinien) mit CrFKwt oder C8III-1-Zellen zusammen ausgesät. Da A20-Zellen in Suspension wachsen, verbleiben sie im Überstand der Zellkulturschale und bauen keine feste Verbindung (z.B. *gap junctions*) mit den adhärennten CrFK-Zellen auf. 2×10^4 Zellen von beiden Zelltypen wurden zusammen in einer 3 cm-Schale mit 3 ml Normalmedium ausgesät und am nächsten Tag IFO mit unterschiedlichen Endkonzentrationen (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM) zugegeben. Alle zwei Tage wurde ein Aliquot der Zellen im Überstand entnommen

und die lebenden Zellen nach Ausschluß der toten mittels Trypanblaufärbung, gezählt.

Wurden A20-Zellen mit C8III-1-Zellen ohne IFO kokultiviert, erreichten sie bis zum sechsten Tag eine Zelldichte von $5,3 \times 10^6$ Zellen pro 3 ml Medium (vgl. Abbildung 33 A, 0 mM). Bei einer Konzentration von $0,25$ mM IFO schien die Proliferation etwas verzögert ($0,25$ mM). Bei Konzentrationen über $0,25$ mM nahm die Zellzahl nur sehr langsam zu, so dass am sechsten Tag maximal $8,1 \times 10^5$ Zellen pro 3 ml Medium im Überstand vorhanden waren (vgl. Abbildung 33 A, $0,5$ mM bis 2 mM). Die Zellen, die mit CrFKwt-Zellen kultiviert wurden, zeigten keine Unterschiede im Wachstum bei IFO-Konzentrationen bis $0,5$ mM (vgl. Abbildung 22 B, 0 bis $0,5$ mM). Lediglich bei den beiden höchsten Konzentrationen 1 und 2 mM IFO reduzierte eine CYP2B1-unabhängige Wirkung der Prodroge die Zellzahl am 6. Tag um die Hälfte auf ca. 2×10^6 Zellen (vgl. Abbildung 33 B, 1 mM und 2 mM).

Die Wachstumskurven zeigen, dass unmittelbar (bis Tag 3) nach der Zugabe von IFO die Zellen im Wachstum gehemmt werden und die Hemmung über den ganzen Untersuchungszeitraum weitgehend erhalten bleibt (cytostatische Wirkung). Diese Wirkung von IFO-Zugabe hing zum einen von der Anwesenheit CYP2B1-exprimierender Zellen ab und nahm zum zweiten mit steigender Konzentration zugegebenen IFOs zu.

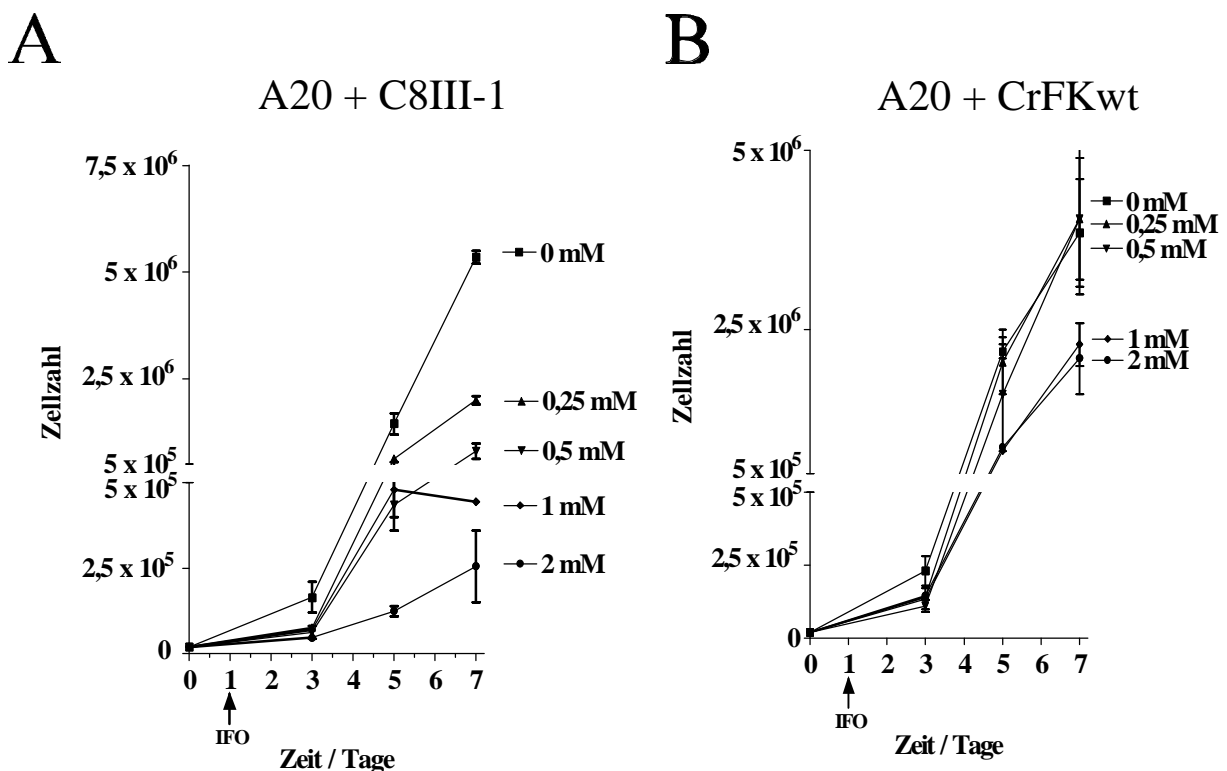


Abbildung 33: Bystander Effekt auf A20-Suspensionszellen bei unterschiedlichen IFO-Konzentrationen
A20-Suspensionszellen wurden in der Gegenwart von verschiedenen IFO-Konzentrationen entweder mit (A) C8III-1- oder (B) CrFKwt-Zellen kokultiviert. Alle zwei Tage wurde ein Aliquot der im Überstand schwimmenden A20-Zellen entnommen, tote Zellen mit einer Trypanblaufärbung ausgeschlossen und die Zellzahl bestimmt. Die Daten geben ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten wieder.

iii Nachweis von frei diffundierbaren aktiven Metaboliten („*Transwell System*“)

Wie bereits erwähnt ist der *bystander effect* ein wichtiges Kriterium für eine effiziente Antitumorthherapie durch das CYP2B1/IFO-System. Die Kokultivierung von Suspensionszellen mit adhären Zellen deutet dabei auf einen Mechanismus hin, für den kein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist. Allerdings lagen bei den bisherigen Kokultivierungsexperimenten A20-Zellen direkt auf den CYP2B1-exprimierenden Zellen, so dass hier unter Umständen ein *bystander effect* über ausgebildete Zell-Zell-Verbindungen hätte auftreten können. Durch die Verwendung eines *transwell system* ist es dagegen möglich zwei verschiedene Zelltypen im gleichen Medium zu kultivieren, aber jeden direkten Kontakt auszuschließen. Ein möglicher Effekt, den die beiden Zellpopulationen aufeinander zeigen, muß daher von Stoffen herrühren, die durch die permeable Membran mit 0,45 µm Porengröße diffundieren können.

Zum Nachweis von diffundierbaren Metaboliten wurden 4×10^4 PANC1-Zellen, eine humane pankreatische Adenokarzinomzelllinie (vgl. 2.1.8 Zelllinien), als Reporterzellen in 2 ml Medium in eine Zellkulturschale und die gleiche Anzahl C8III-1- bzw. CrFKwt-Zellen in jeweils 2 ml Medium in das darüberliegende *transwell* gesät (vgl. Abbildung 34 A). Am nächsten Tag wurde IFO mit Endkonzentrationen zwischen 0 bis 5 mM zugegeben und die Reporterzellen am 7. Tag des Experimentes trypsinisiert und gezählt (vgl. 2.2.3 C Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen). Dabei wurde keine Trypanblaufärbung durchgeführt, da vorangegangene Experimente zeigten, dass bei adhären Zellen mindestens 95 % der am Boden haftenden Zellen vital sind und die toten Zellen bereits beim Waschen vor dem Trypsinieren entfernt werden.

Die PANC1-Reporterzellen, die mit CYP2B1-exprimierenden Zellen (C8III-1) zusammen kultiviert wurden, aber durch eine Membran räumlich getrennt waren, zeigten bereits bei 0,25 mM IFO eine Reduktion der Überlebensrate (Quotient zwischen der Anzahl behandelter zu unbehandelter Zellen in Prozent) auf 59 %, bei 0,5 mM auf 40 % und bei 1 mM auf 36 % (vgl. Abbildung 34 B,). Im Gegensatz dazu zeigten die PANC1-Zellen, die mit CrFKwt-Zellen kokultiviert wurden, bei 0,25 mM (97 % Überlebensrate), bei 0,5 mM (84 % Überlebensrate) bzw. bei 1 mM (100 % Überlebensrate) einen geringen toxischen Effekt (vgl. Abbildung 34 B,). Bei IFO-Konzentrationen über 1 mM traten auch bei den PANC1-Zellen, die mit CrFKwt-Zellen kokultiviert wurden, toxische Effekte auf. Bei 2 mM war die Überlebensrate durch diesen unspezifischen Effekt bereits auf 64 % reduziert und bei 5 mM lag sie bei 6 %. Die Überlebensrate der mit C8III-1-Zellen gemeinsam kultivierten PANC1-Zellen lag bei 2 mM IFO bei 18 % und sank weiter auf 5 % Überlebensrate bei 5 mM IFO.

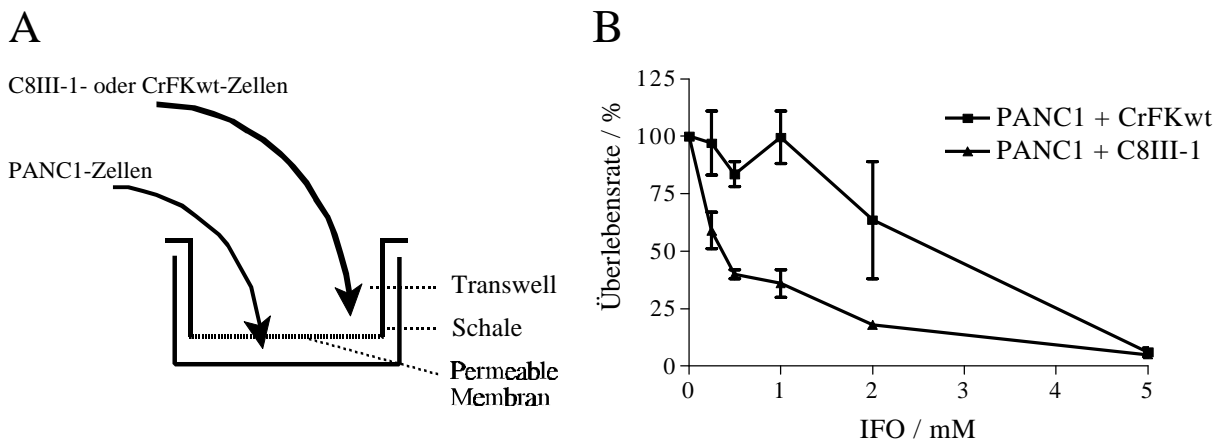


Abbildung 34: Nachweis von frei diffundierbaren Metaboliten mittels eines Transwell System

(A) Prinzip des *transwell system*: 4×10^4 PANC1-Zellen wurden in 2 ml Medium in eine 3 cm Schale ausgesät, ein Transwell eingesetzt und in das *transwell* die gleiche Anzahl von CrFKwt- () bzw. C8III-1-Zellen () gegeben. Die pankreatischen und nicht-pankreatischen Zellen teilen das gleiche Medium, jedoch ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt durch eine Membran mit $0,45 \mu\text{m}$ Porengröße ausgeschlossen. Am nächsten Tag wurde IFO mit einer Endkonzentration von 0 mM bis 5 mM zugegeben und am siebten Tag die PANC1-Zellen abtrypsiniert und gezählt. (B) Effekt von diffundierenden Metaboliten auf Reporterzellen (PANC1). Die Werte repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit zugehöriger Standardabweichung.

Insgesamt zeigten die PANC1-Zellen bei Konzentrationen bis 2 mM eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber IFO, wenn sie zusammen mit CYP2B1-exprimierenden Zellen kultiviert wurden. Dabei korrelierte die toxische Wirkung des durch CYP2B1 aktivierten IFO mit der eingesetzten Konzentration der Prodroge, die zugegeben wurde.

3.2.3 Nachweis des Wirkmechanismus von aktiviertem Ifosfamid

Zellen, die durch IFO oder andere toxische Metaboliten ausreichend geschädigt werden, können entweder im Zellzyklus arretiert werden oder durch zwei unterschiedliche Mechanismen sterben. Apoptose stellt einen Mechanismus dar, bei der die Zelle durch gezielte Expression bestimmter Gene einem genetisch vorprogrammierten Verlauf zum Zelltod folgt (Cohen, 1993). Im Gegensatz dazu wird die Nekrose durch eine Schädigung der Zelle ausgelöst, der kein gezieltes Programm zur Selbsterstörung folgt (Kolenko et al., 1999). Beide Mechanismen lassen sich durch genetische, biochemische und morphologische Kennzeichen voneinander abgrenzen (Cohen, 1993; Matteucci et al., 1999, Wyllie, 1980).

A Nachweis von Veränderungen der Zellmembran und der zellulären Beschaffenheit

Eine sterbende Zelle, die einem apoptotischen oder nekrotischen Mechanismus folgt, zeigt Veränderungen der Zellmembran auf. Charakteristisch für eine vitale oder früh apoptotische Zelle ist eine intakte Membran, die das Eindringen bestimmter Farbstoffe (z.B. Propidiumiodid) in die Zelle verhindert. Nekrotische Zellen haben keine geschlossene Cytoplasmamembran mehr, so dass Farbstoffe in die Zelle gelangen können und sie anfärben. Sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen haben jedoch gemeinsam, dass sich die Verteilung von Phosphatidylserin, das normalerweise nur an der Innenseite der Cytoplasmamembran vorkommt, ändert. In sterbenden Zellen (apoptotisch oder nekrotisch) liegt Phosphatidylserin auch an der Außenseite vor und kann daher mit Proteinen wie Annexin V wechselwirken. Dabei kann mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppeltes Annexin V durch seine grüne Fluoreszenz auf den gebundenen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35 A und B) (Vermees et al., 1995).

Zum Nachweis zellulärer Veränderungen wurden ursprünglich adhärent wachsende Vero bzw. CrFK-Zellen auf Objektträgern (*chamber slides*) kultiviert und mit 4OOH-IFO, einer schon aktivierten Form von IFO behandelt. Am Ende des Experiments wurden die noch lebenden Zellen *in situ* mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. UV-lichtmikroskopische Aufnahmen wurden jedoch durch die nur schwache Fluoreszenz von FITC-Annexin V bei den meisten markierten Zellen und der geringen Lichtempfindlichkeit eines Dualpass-Filters für die FITC- als auch die Propidiumiodid-Fluoreszenz erschwert. Eine höhere Sensitivität konnte mittels konfokaler Lasermikroskopie erreicht werden, jedoch waren hier nur Aufnahmen einzelner Zellen möglich und kein repräsentatives Gesamtbild zu gewinnen (vgl. Abbildung 35 A und B). Die dritte Möglichkeit bestand darin, die Annexin markierten Zellen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) zu erfassen und gleichzeitig zu quantifizieren. Da Vero-Zellen sich nach ersten Vorversuchen für diese Methode nicht eigneten, wurde die FACS-Analyse ausschließlich mit CrFKwt bzw. C8III-1-Zellen durchgeführt. 1×10^5 CrFKwt-Zellen wurden in einer 3 cm Schale ausgesät, am nächsten Tag mit $100 \mu\text{M}$ 4OOH-IFO behandelt, an jedem der 6 folgenden Tagen mit Annexin V/Propidiumiodid gefärbt (vgl. 2.2.11 Nachweis von Zellmembranveränderungen mittels Annexin V/Propidiumiodid) und anschließend mittels FACS (vgl. 2.2.4 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* = FACS) analysiert.

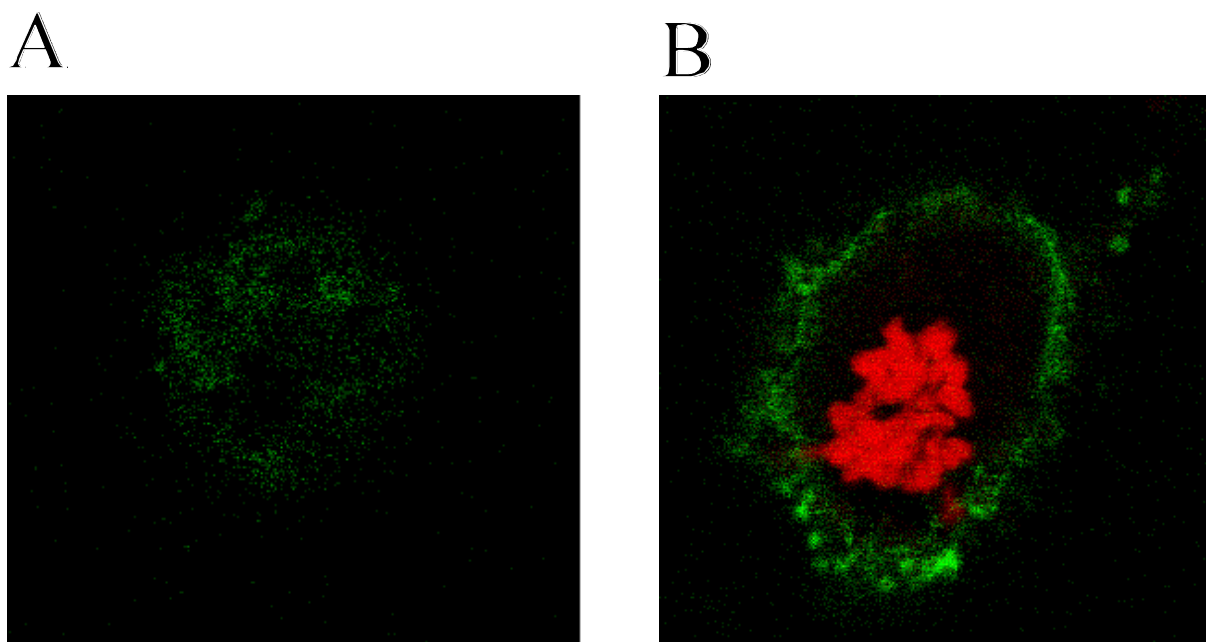


Abbildung 35: Konfokale Lasermikroskopie Staurosporin behandelter und Annexin V/Propidiumiodid gefärbter Vero-Zellen

Staurosporin behandelte Vero-Zellen wurden mit Annexin V/Propidiumiodid gefärbt. (A) Apoptotische Zellen färben sich ausschließlich grün während sich (B) nekrotische (spät apoptotische) zusätzlich mit Propidiumiodid anfärben lassen.

Bei den mit 100 μM 4OOH-IFO behandelten CrFK-Zellen (vgl. Abbildung 36 C rechts) nahm der Anteil der mit Propidiumiodid anfärbaren Zellen (nekrotisch/spät apoptotisch) im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (vgl. Abbildung 36 A rechts) zu. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner Vergrößerung der Subpopulation, die sich ausschließlich mit Annexin V anfärben lässt (apoptotische Population) (vgl. Abbildung 36 C rechts). Wurde eine niedrigere Konzentration von 4OOH-IFO (10 μM) eingesetzt, traten zwar deutlich weniger geschädigte Zellen auf, jedoch zeigten sie alle eine Doppelfärbung mit Annexin und Propidiumiodid bei der FACS-Analyse (Daten nicht gezeigt). Das gleiche Ergebnis wurde auch sichtbar, wenn CYP2B1-exprimierende C8III-1-Zellen mit 0,5 mM IFO behandelt wurden (vgl. Abbildung 36 D rechts). Die Doppelfärbung von 4OOH-IFO bzw. IFO behandelten Zellen deutet daraufhin, dass der dadurch verursachte Zelltod einem nicht apoptotischen Mechanismus folgt. Um dies weiter zu untersuchen wurden die gleichen Zellen mit 1 μM Staurosporin, einem Proteinkinase C-Inhibitor und Apoptose-Induktor behandelt und analysiert (vgl. Abbildung 36 B rechts). Bei diesen Zellen trat neben der mit Propidiumiodid anfärbaren Population (nekrotisch/spät apoptotisch) noch eine nur mit Annexin V anfärbare Population (apoptotisch) auf, die deutlich auf einen apoptotischen Mechanismus hinweist (vgl. Abbildung 36 B rechts).

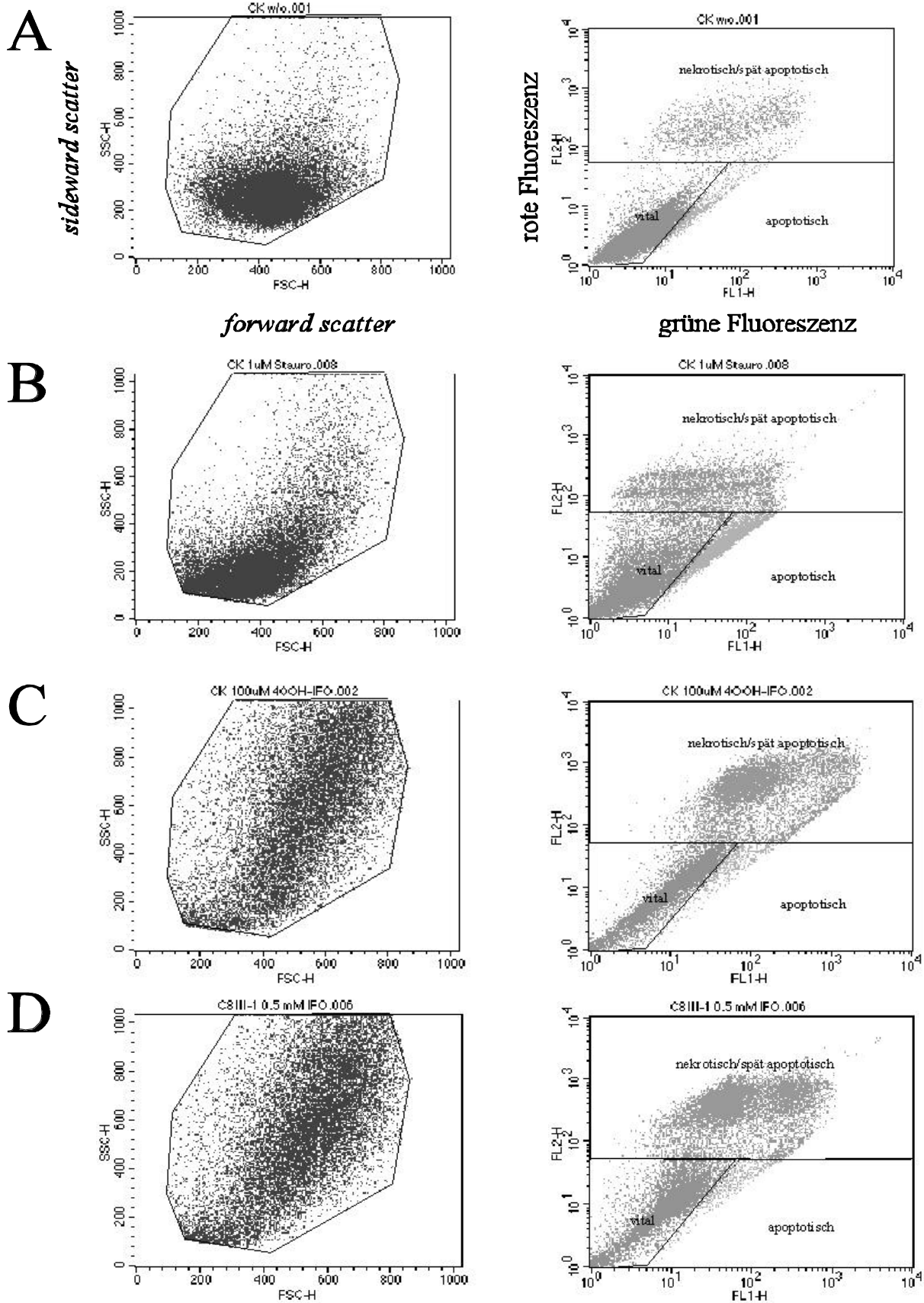


Abbildung 36: FACS-Analyse Annexin V/Propidiumiodid gefärbter CrFK-Zellen

Unbehandelte (A), Staurosporin- (B) und 4OOH-IFO-behandelte (C) CrFK-Zellen bzw. IFO behandelte C8III-1-Zellen (D) wurden mittels FACS untersucht. Dabei wurden folgende Daten gemessen: *forward scatter*, *sideward scatter*, grüne und rote Fluoreszenz (vgl. Bild A).

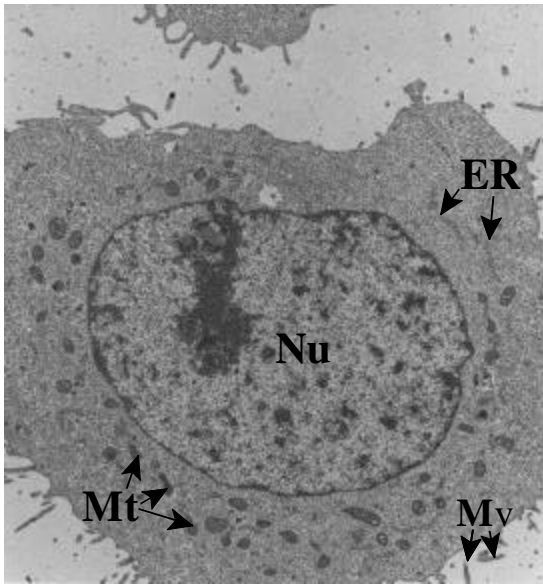
Gleichzeitig mit der Analyse von Grün- und Rotfluoreszenz wurde während der FACS-Analyse der *forward scatter* und der *sideward scatter* der Zellen bestimmt. Der *forward scatter* reflektiert die Zellgröße, während der *sideward scatter* die Ausprägung intrazellulärer Kompartimente (Granulosität) angibt. Die unbehandelten CrFK-Zellen zeigten eine homogene Population innerhalb einer gewissen Abweichung (vgl. Abbildung 36 A links). Wurden CrFKwt- bzw. C8III-1-Zellen mit 4OOH-IFO bzw. IFO behandelt, so nahm die Abweichung für *forward scatter* und *sideward scatter* deutlich zu (vgl. Abbildung 36 B links und C links). Zusätzlich nahm auch der Mittelwert für den *forward* und *sideward scatter* zu. Dies bedeutet, dass die Zellen sich durch die Behandlung vergrößert hatten und eine höhere Granulosität besaßen. Jedoch zeigte mit Staurosporin behandelte Kontrollgruppe zeigte auch nach der Behandlung eine gut umgrenzte Population, bei der sowohl der mittlere *forward* als auch der *sideward scatter* abgenommen hatten (vgl. Abbildung 36 B links). Sie unterscheidet sich damit deutlich von der 4OOH-IFO bzw. IFO behandelten Zellpopulationen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen nach Behandlung mit 4OOH-IFO durch Nekrose sterben. CYP2B1-exprimierende Zellen, die mit 0,5 mM IFO behandelt wurden, weisen das gleiche Bild auf. Da die FACS-Analysen ab dem ersten Tag nach der Drogenbehandlung durchgeführt wurden und auch hier kein verstärktes Auftreten einer apoptotischen Population nachgewiesen werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen primär apoptotisch sind und erst später nekrotisch wurden. Die Zunahme des mittleren *forward scatter*, als Maß für die Zellgröße, erhöhte sich sowohl bei Behandlung mit 4OOH-IFO, als auch bei Behandlung von CYP2B1-exprimierenden Zellen mit 0,5 mM IFO. Auch diese Zunahme des Zellvolumens spricht für einen nekrotischen Mechanismus.

B Morphologische Veränderungen von IFO behandelten Zellen

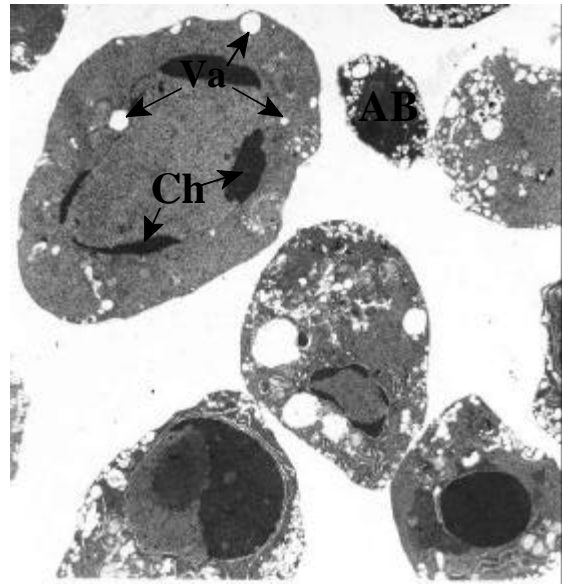
Neben dem Nachweis der Apoptose mittels biochemischer Methoden besitzt die Untersuchung sterbender Zellen mittels Elektronenmikroskopie die höchste Aussagekraft. Besonders bei nicht eindeutig klassifizierbaren Mechanismen von Apoptose und Nekrose ist die elektronenmikroskopische Untersuchung vielen anderen Nachweissystemen, die meist nur einzelne Parameter der Zelle untersuchen, überlegen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden CrFKwt-Zellen und Vero-Zellen mit 4OOH-IFO bzw. C8III-1-Zellen mit 0,5 mM IFO behandelt. Anschließend wurde die Morphologie der Zellen elektronenmikroskopisch untersucht (vgl. 2.2.12 Elektronenmikroskopie). Als Kontrollen wurden unbehandelte bzw. mit Staurosporin behandelte Zellen analysiert.

A



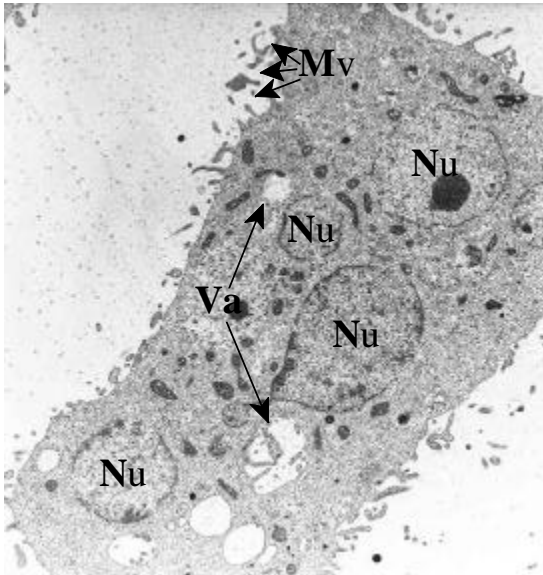
5950 x

B



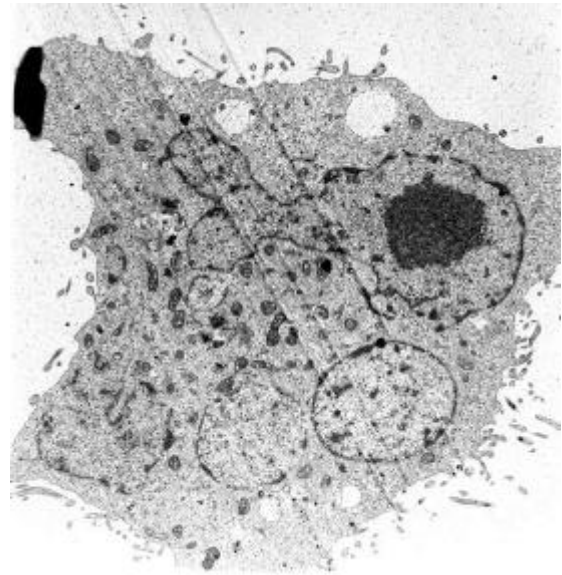
7000 x

C



3000 x

D



3300 x

Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CrFK-Zellen

CrFK-Zellen wurden mit 4OOH-IFO behandelt, fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert (C, D). Als Kontrollen wurden unbehandelte (A) bzw. Staurosporin behandelte Zellen (B) untersucht. Verwendete Abkürzungen: AB, *apoptotic body*; ER, Endoplasmatisches Retikulum; Mt, Mitochondrien; Mv, Microvilli; Nu, Nukleus; Va, Vakuolen.

Unbehandelte Zellen zeigten typische intrazelluläre Strukturen wie Nukleus mit amorphen Chromatin, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien und Microvilli (vgl. Abbildung 37 A und Abbildung 38 A).

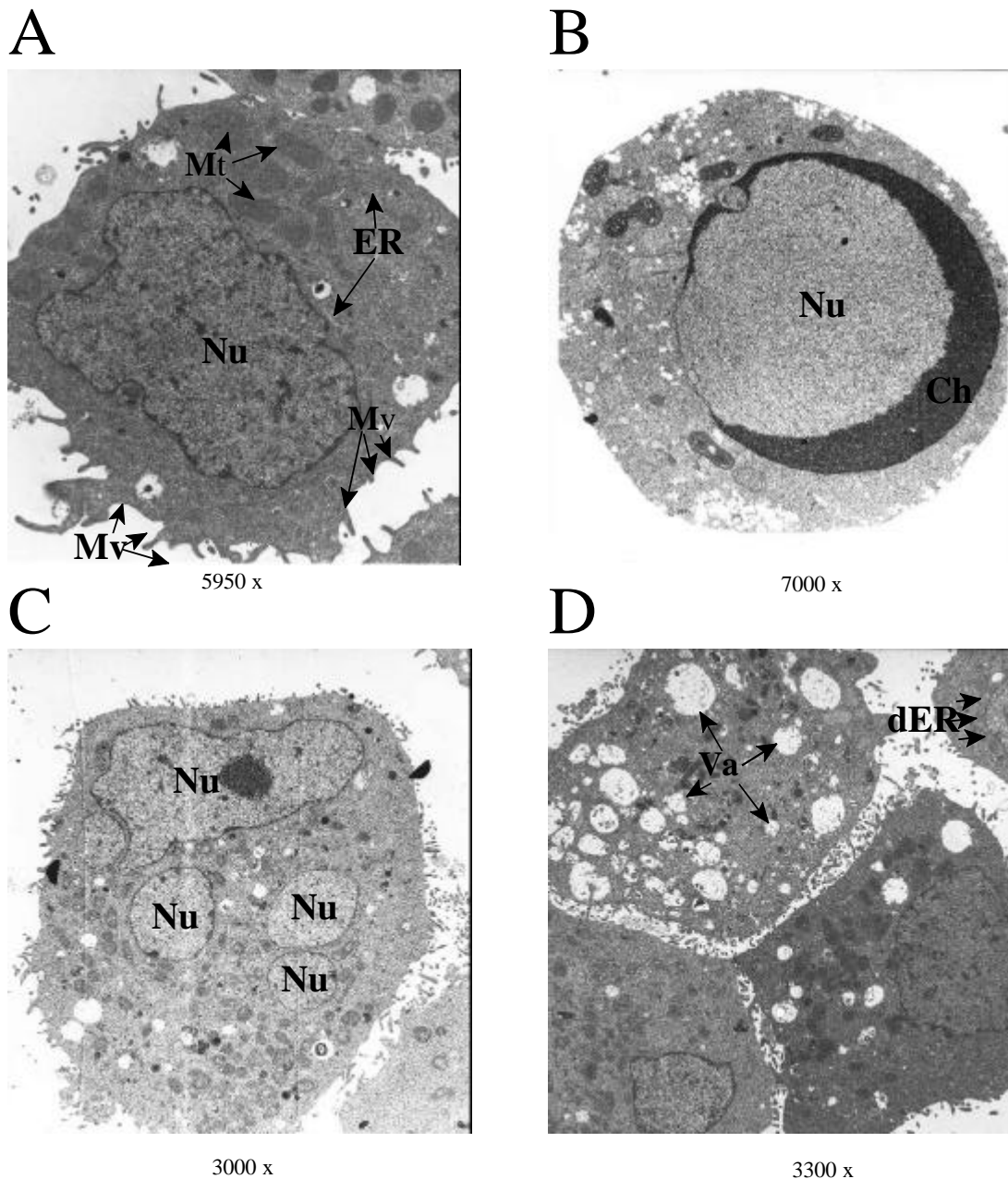
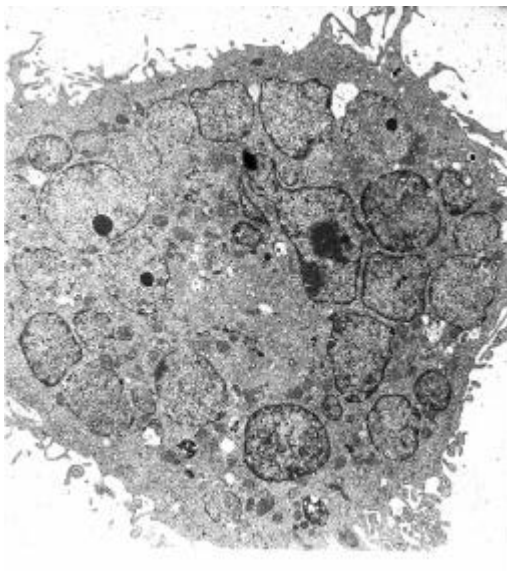


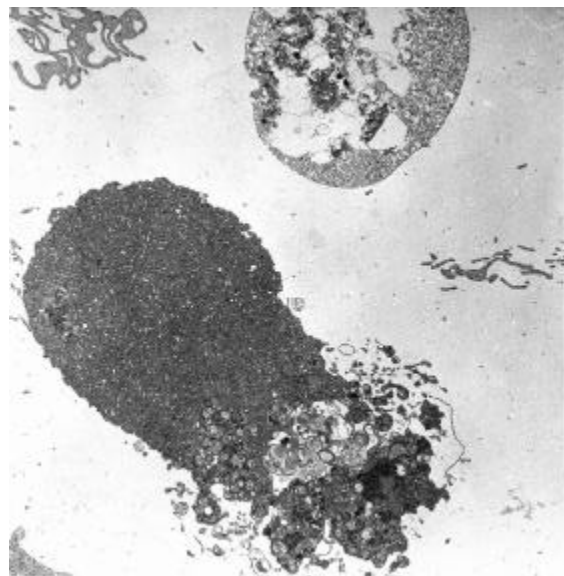
Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden mit 4OOH-IFO behandelt, fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert (C, D). Als Kontrollen wurden unbehandelte (A) bzw. Staurosporin behandelte Zellen (B) untersucht. Verwendete Abkürzungen: AB, *apoptotic body*; Ch, Chromatin; dER dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum; ER, Endoplasmatisches Retikulum; Mt, Mitochondrien; Mv, Microvilli; Nu, Nukleus; Va, Vakuolen.

Staurosporin behandelte Zellen wiesen eine deutlich unterschiedliche Morphologie auf. Am auffälligsten war, dass bei einem Großteil der Zellen das Chromatin stark kondensiert an der Innenseite der Nukleusmembran sichtbar wurde. Weiterhin besaßen diese Zellen keine Microvilli mehr und formten kleine subzelluläre Abschnürungen, die als *apoptotic bodies* bezeichnet werden (vgl. Abbildung 37 B und Abbildung 38 B). Die meisten mit 4OOH-IFO oder IFO/CYP2B1 behandelten Zellen zeigten keine wesentlichen Veränderungen ihrer Morphologie (nicht gezeigt). Sie sahen wie normale unbehandelte Zellen aus. Nur ein Teil der Zellen wies Veränderungen auf, wobei eine starke bis sehr starke intrazelluläre Vakuolisierung und damit verbundene Schwellung der Zelle auftrat, die als weiße Bereiche im Cytoplasma sichtbar wurden. Manche der betroffenen Zellen besaßen ein dilatiertes ER, einen gelappten Nukleus oder nukleäre Abschnürungen die als nukleäre Vesikel (*micronucleisation*) sichtbar wurden (vgl. Abbildung 37 C,D, Abbildung 38 C,D und Abbildung 39 A). Teilweise hatte sich der Nukleus, besonders in stark vakuolisierten Zellen komplett aufgelöst (vgl. Abbildung 38 D und Abbildung 39 B). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um ein zelltypspezifisches Phänomen handelt wurden parallel auch 4-OOH-IFO behandelte Vero-Zellen analysiert. Diese wiesen jedoch die gleichen Charakteristika wie CrFK-Zellen auf. Wurde IFO als inaktive Prodroge zu CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen gegeben traten die gleichen Merkmale (nukleäre Vesikel bzw. aufgelöster Nukleus) auf, wie bei den Zellen, die mit der schon aktiven Droge (4OOH-IFO) behandelt wurden.

A

3000 x

B

3000 x

Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von C8III-1-Zellen nach endogener IFO-Aktivierung
C8III-1-Zellen wurden mit 0,5 mM IFO behandelt, fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert.

Insgesamt zeigten die meisten der behandelten Zellen keine auffälligen Veränderungen, jedoch deuten die Veränderungen, die sichtbar wurden, auf einen nekrotischen Mechanismus hin. Keine der untersuchten Zellen wies typische Anzeichen einer Apoptose auf. Der nekrotische Zelltod war dabei unabhängig vom verwendeten Zelltyp und dem Ort der IFO-Aktivierung. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten, die aus der Annexin V/Propidiumiodid-Anfärbung und anschließenden FACS-Analyse gewonnen wurden.

3.2.4 Zellvermittelte Therapie von Pankreastumoren *in vivo*

Da der *bystander effect* von CYP2B1-exprimierenden Zellen stark genug ist, um *in vitro* pankreatische Tumorzellen (PANC1) in ihrem Wachstum zu hemmen (vgl. Abbildung 32 und 34), stellte sich die Frage, ob eine intratumorale Aktivierung von Ifosfamid auch durch implantierte Zellen *in vivo* einen therapeutischen Nutzen hat.

A Enkapsulierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen

Wenn einzelne Zellen oder eine Zellsuspension für eine *in vivo*-Anwendung gebraucht werden, besteht die Gefahr, dass sie sich von ihrem Zielort weg in andere Organe verteilen. Dadurch wäre in diesem Fall nicht mehr mit einer lokal beschränkten, sondern mit einer systemischen IFO-Aktivierung zu rechnen. Weiterhin besteht das Risiko, dass die Zellen, wenn sie nicht autologen Ursprungs sind, eine ungewollte Immunantwort im Organismus hervorrufen. Diese kann zum einen mit unerwünschten Nebenwirkungen und/oder mit einem schnellem Abtöten der injizierten Zellen verbunden sein.

Um dem vorzubeugen, wurden die C8III-1-Zellen (vgl. 3.1.2 Herstellung von stabil CYP2B1-exprimierenden Zellklonen) von der Firma Bavarian Nordic (Martinsried) in Kapseln aus Zellulosesulfat verpackt (vgl. 2.2.13 Kapseln). Die Kapseln besitzen einen Durchmesser von ca. 0,5 mm und haben eine poröse Membran, die zwar den Austausch mit dem umgebenden Medium gewährleistet, aber ein Eindringen oder Austreten von Zellen verhindert. Damit bietet die Kapsel Schutz vor mechanischen Einflüssen und einer zellulären Immunantwort, wobei ein Austausch von Molekülen unter 200 kD erhalten bleibt (vgl. Abbildung 40 A). Die Kapseln entstehen bei der Polymerisation von Natriumzellulosesulfat mit Polydimethyldiallylammoniumchlorid (vgl. Abbildung 40 B). Dabei werden die vorher in Natriumzellulosesulfat resuspendierten Zellen von einer inerten Membran umschlossen (vgl. Abbildung 40 C). Durch diesen Prozeß wird eine

lange Haltbarkeit gewährleistet, wobei die enkapsulierten Zellen bei Lagerung im Normalmedium (vgl. 2.2.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen) eine mehrwöchige Halbwertszeit besitzen (Dautzenberg et al., 1999). Eine Kapsel umschließt ca. $1 - 3 \times 10^4$ Zellen (Müller et al., 1999).

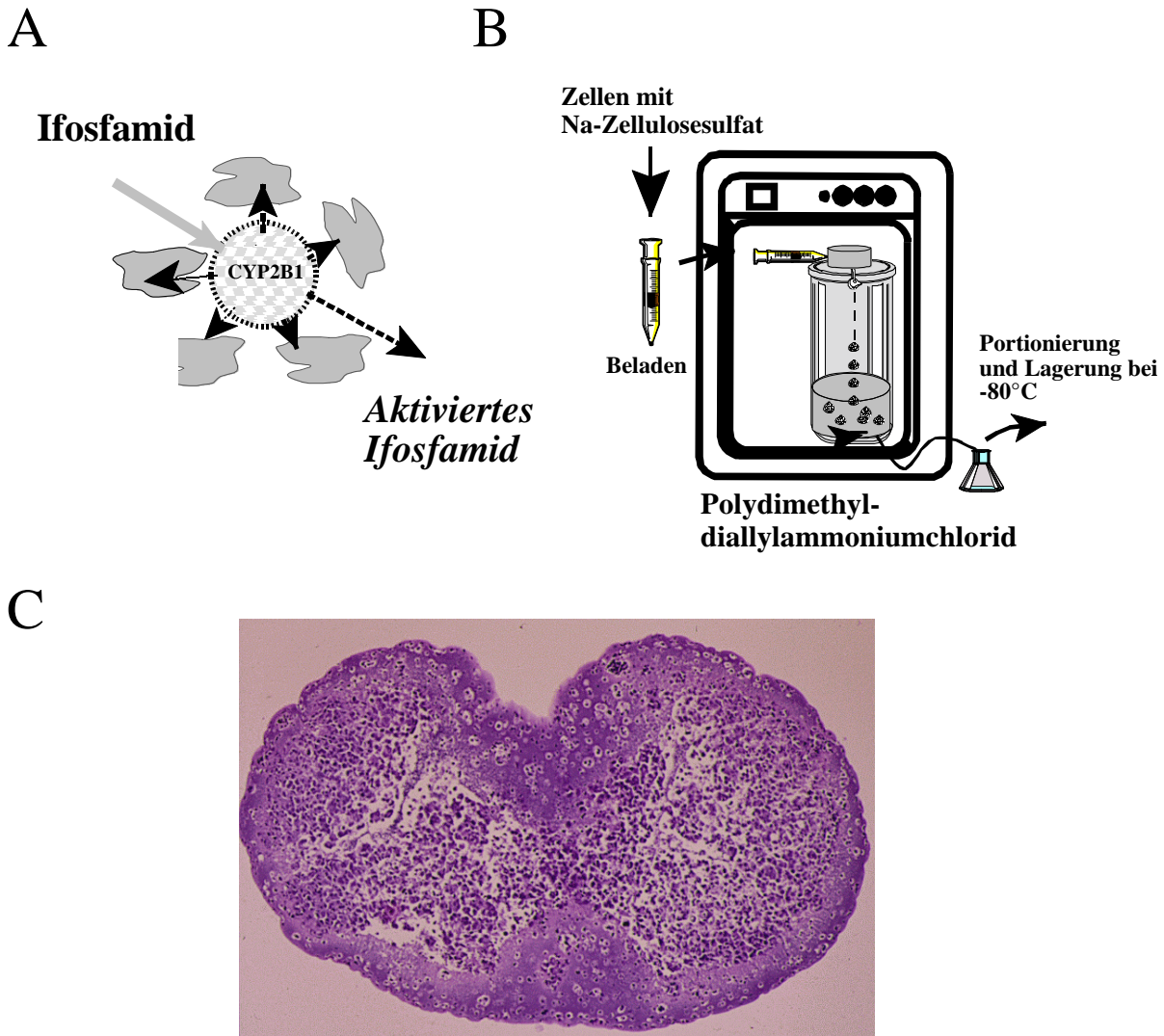


Abbildung 40: Verkapselung von Zellen

(A) Prinzip der zellvermittelten intratumoralen Aktivierung von Ifosfamid: Kapseln mit CYP2B1 produzierenden Zellen werden in das Tumorgewebe implantiert und aktivieren dort IFO zu toxischen Metaboliten. (B) Schematische Darstellung des Verkapselungsprozesses: Die zu verkapselnden Zellen werden trypsinisiert, die Zellsuspension mit Natriumzellulosesulfat gemischt und über eine Düse in eine Lösung mit Polydimethyldiallylammoniumchlorid gespritzt. Beim Zusammentreffen der beiden Flüssigkeiten kommt es zur Polymerisation und Bildung von Kapseln. (C) Histologischer Schnitt durch eine Kapsel (Vergrößerung 100 x, angefertigt am Institut für Histologie, VMU Wien). Obwohl die Kapselform sphäroid ist, erscheint die abgebildete Kapsel durch den Schneideprozeß etwas eingedrückt.

B Behandlung von xenotransplantierten pankreatische Tumoren in Nacktmäusen

Der therapeutische Nutzen des CYP2B1/IFO-Systems konnte bereits in zahlreichen *in vitro*-Experimenten nachgewiesen werden. Um die Wirkung *in vivo* zu untersuchen, wurde in enger Kollaboration mit der Universitätsklinik in Rostock der therapeutische Nutzen an einem Tiermodell für pankreatische Adenokarzinome untersucht (Löhr et al., 1998). Für dieses Experiment wurden die getesteten C8III-1-Zellen zur Verfügung gestellt. Vor der Verwendung wurden sie von der Firma Bavarian Nordic enkapsuliert (Dautzenberg et al., 1999).

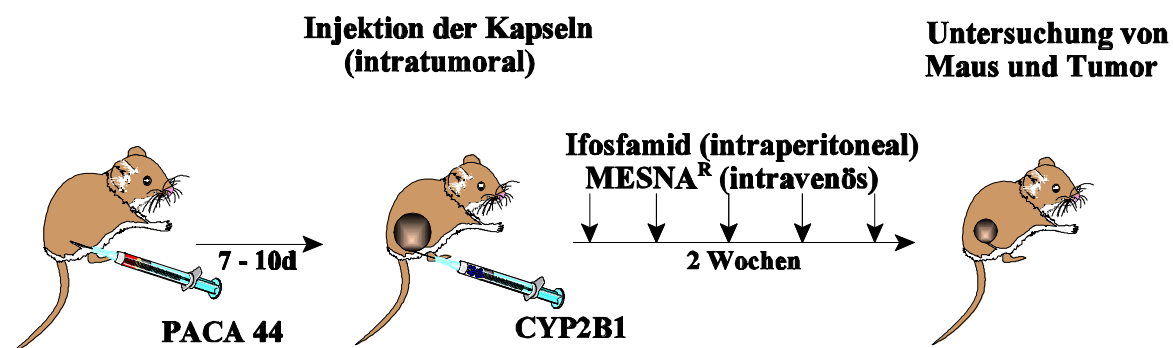


Abbildung 41: Behandlung von Nacktmäusen mit enkapsulierten Zellen

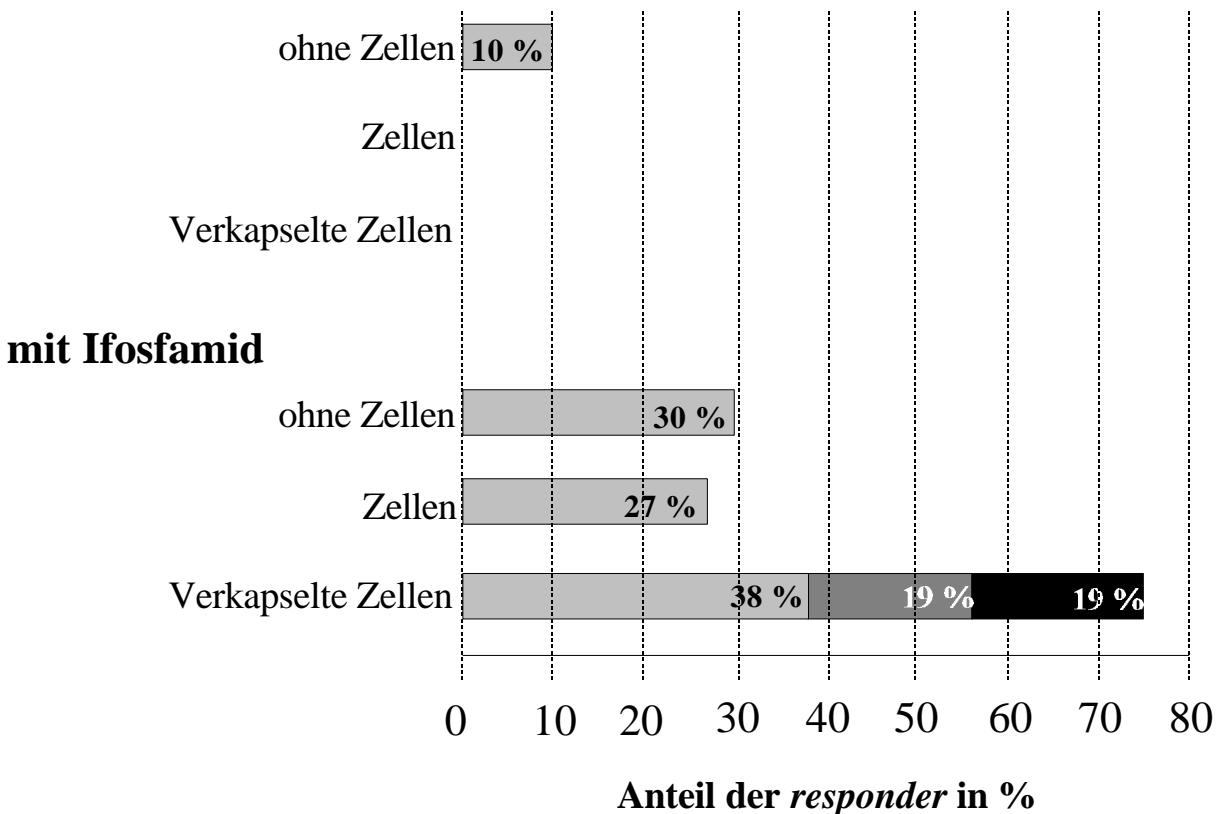
Pankreatische Tumorzellen (PACA44) wurden subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert, aus denen sich innerhalb von 7 bis 10 Tagen ein Tumor mit 1 cm Durchmesser entwickelte. In jeden Tumor wurden 40 Kapseln mit CYP2B1-exprimierenden Zellen injiziert und die Mäuse in den folgenden Wochen mit IFO und MESNA behandelt. Anschließend wurden die Mäuse getötet und analysiert.

Humane exokrine pankreatische Tumorzellen (PACA44-Zellen) wurden subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert (vgl. Abbildung 41). An dieser Stelle bildeten sich Tumoren, die nach 7 bis 10 Tagen einen Durchmesser von 1 cm besaßen. In den Tumor wurden 40 Kapseln mit je $1-3 \times 10^4$ C8III-1-Zellen injiziert und in den zwei darauffolgenden Wochen die Mäuse alle drei Tage mit 100 mg/kg IFO behandelt. Nach Ablauf der zwei Wochen wurden die Mäuse getötet und der Tumor analysiert (Löhr et al., 1998).

Bei der Bewertung des therapeutischen Effekts der zellvermittelten Aktivierung von IFO wurde die Größe des Tumors und das Allgemeinbefinden der Mäuse beurteilt. Ein Schrumpfen der Tumormasse, wurde als therapeutischer Effekt gewertet. Es zeigte sich, dass bei allen Gruppen von Mäusen, die IFO erhielten, etwa 30 % der Tiere einen

Tumorrückgang aufwiesen (vgl. Abbildung 42). Wurde die IFO-Behandlung mit verkapselten CYP2B1-exprimierenden Zellen kombiniert, konnte der Anteil der Mäuse mit einem Tumorrückgang auf 38 % gesteigert werden. Zusätzlich zeigten 19 % der Mäuse ein komplettes Verschwinden des Tumors, so dass nach der Behandlung nur noch Narbengewebe übrig blieb (siehe Abbildung 43 B). Weitere 19 % der mit IFO und verkapselten Zellen behandelten Mäuse zeigten ausgedehnte nekrotische Regionen im Tumor, was auf ein Absterben der Tumorzellen hindeutet (vgl. Abbildung 42). Wurden die Mäuse überhaupt nicht behandelt, so wuchs der Tumor weiter (vgl. Abbildung 43 A).

ohne Ifosfamid



- Mäuse mit **Tumorrückgang**
- Mäuse mit **Tumorverlust**
- Mäuse mit **>30 % nekrotischem Tumorgewebe**

Abbildung 42: Übersicht über die verwendeten Gruppen

Die Nacktmäuse wurden mit verkapselten und unverkapselten CYP2B1-exprimierenden Zellen behandelt. Eine dritte Gruppe erhielt keine Zellen. In jeder der drei Gruppen wurde einem Teil der Mäuse systemisch 100 mg/kg IFO verabreicht (Löhr et al., 1998).

Das Experiment zeigt, dass eine konventionelle IFO-Behandlung in etwa 30 % der Fälle zu einem therapeutischen Effekt mit einem partiellen Rückgang des Tumors führt. Dieser therapeutische Effekt kann jedoch durch Injektion von verkapselten CYP2B1-exprimierenden Zellen deutlich gesteigert werden. Alle mit Kapseln und IFO therapierten Mäuse zeigten eine Tumorreduktion und bei 19 % der Versuchstiere verschwand der Tumor komplett.

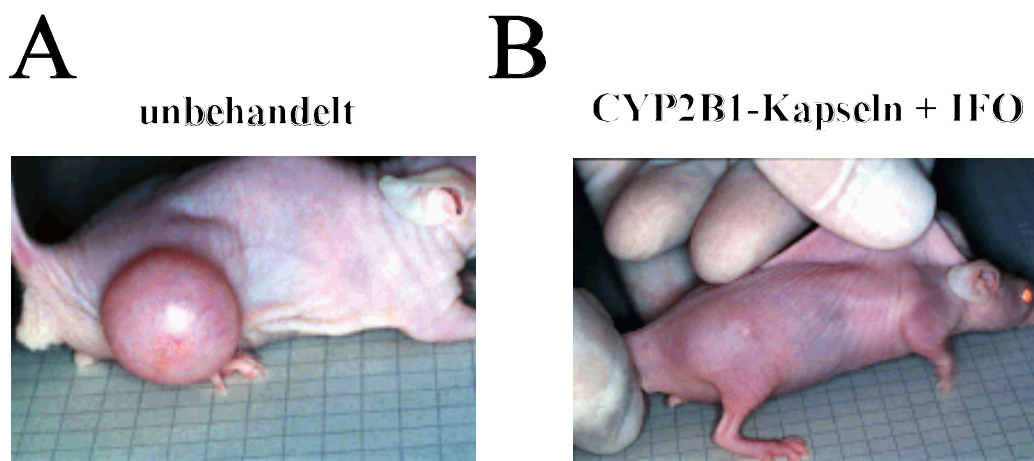


Abbildung 43: Behandlung von pankreatischen Tumoren mit CYP2B1-Kapseln

(A) Nacktmaus aus einer Kontrollgruppe ohne Behandlung. Der ursprüngliche Tumor mit 1 cm Durchmesser vergrößerte sich weiter. (B) Maus, die sowohl CYP2B1-Kapseln als auch eine systemische IFO-Behandlung erhielt. Der ursprüngliche Tumor verschwand komplett, so dass nur noch Narbengewebe übrig blieb.

3.3 Zellvermittelte intratumorale IFO-Aktivierung beim Menschen

Da es möglich war, erfolgreich pankreatische Tumoren in Mäusen durch eine zellvermittelte Aktivierung zu bekämpfen, sollte diese Methode auf Patienten mit Pankreaskarzinomen übertragen werden.

3.3.1 Herstellung humaner IFO-aktivierender Zellen

Für die vorgesehene klinische Anwendung war es notwendig, dass die verwendeten Zellen wichtige Kriterien erfüllen. Dazu gehörte das Fehlen von pathogenen Krankheitserregern und einer möglichst geringen Tumorigenität in immundefizienten Mäusen (z.B. Scid/bg). Weiterhin sollten sie humanen Ursprungs sein, damit sie durch das menschliche Komplementsystem nicht angegriffen werden. Gegenüber nicht-

humanen Zellen (z.B. CrFK-Zellen) haben humane Zellen weiterhin den großen Vorteil, dass sie keine potentiell pathogenen animalen Retroviren (z.B. RD114) produzieren (Baumann et al., 1998). Unter diesen Voraussetzungen schienen die von Q-One (Glasgow) zertifizierten humanen embryonischen Nieren (293)-Zellen am ehesten geeignet. Ähnlich wie CrFK-Zellen lassen sie sich leicht transfizieren, kultivieren und weisen eine hohe Expressionsrate auf. 293-Zellen wurden unter GLP (*good laboratory practice*)-Bedingungen transfiziert und expandiert. Das Testen der veränderten Zellen erfolgte jedoch unter normalen Laborbedingungen.

Die 293-Zellen wurden mit dem CYP2B1-Expressionsplasmid pc3/2B1 transfiziert und anschließend auf Neomycin selektiert. Einzelne Neomycin-resistente Klone wurden isoliert und für die Charakterisierung expandiert. Obwohl ein Großteil der Zellklone charakterisiert wurde, soll im weiteren nur jeweils eine kleine repräsentative Gruppe an Zellklonen dargestellt werden.

3.3.2 Identifizierung von Klonen mit intakter CYP2B1-Expressionskassette

Um die Kontinuität der CMV-CYP2B1-Kassette in 293-Zellen nach Transfektion mit dem Plasmid pc3/2B1 nachzuweisen wurde aus 80 gepickten Zellklonen die DNA isoliert und eine ähnliche PCR wie bei den CrFK-Klonen durchgeführt. Hierbei wurden die Primer CMV22 und 2Bcons-c verwendet, die ein Produkt von 1982 bp definieren (vgl. Abbildung 44 A). Parallel wurde eine PCR mit beiden Primern und 10 pg pc3/2B1-Plasmid-DNA durchgeführt. Zum Ausschluss einer DNA-Amplifizierung, die durch falsches *annealing* einer der beiden Primer zustande kommt, wurden zwei Reaktionsansätze mit 10 pg Plasmid-DNA durchgeführt, wobei allerdings jeweils einer der beiden Primer fehlte. Das Vorhandensein von kontaminierender Plasmid-DNA wurde in einem PCR-Ansatz mit 293wt-DNA untersucht. Um Inhibitoren in den einzelnen Reaktionsansätzen auszuschließen, wurden alle Ansätze mit chromosomaler DNA zusätzlich in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA durchgeführt.

Die DNA-Präparationen aller Klone (vgl. Abbildung 44 B, Spuren 2 - 8), außer Klon 80 (vgl. Abbildung 44 B, Spur 9) und 293wt-Zellen zeigten ein spezifisches Signal der erwarteten Größe von 1982 bp. Die PCR mit 293wt-DNA ergab keine spezifische Bande (vgl. Abbildung 44 B, Spur 10). Das Vorhandensein von Inhibitoren im PCR-Ansatz mit chromosomaler DNA von Klon 80 bzw. 293wt-Zellen konnte durch das Auftreten einer spezifischen Bande nach Zugabe von 10 pg Plasmid-DNA ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 44 B, Spuren 17 - 26).

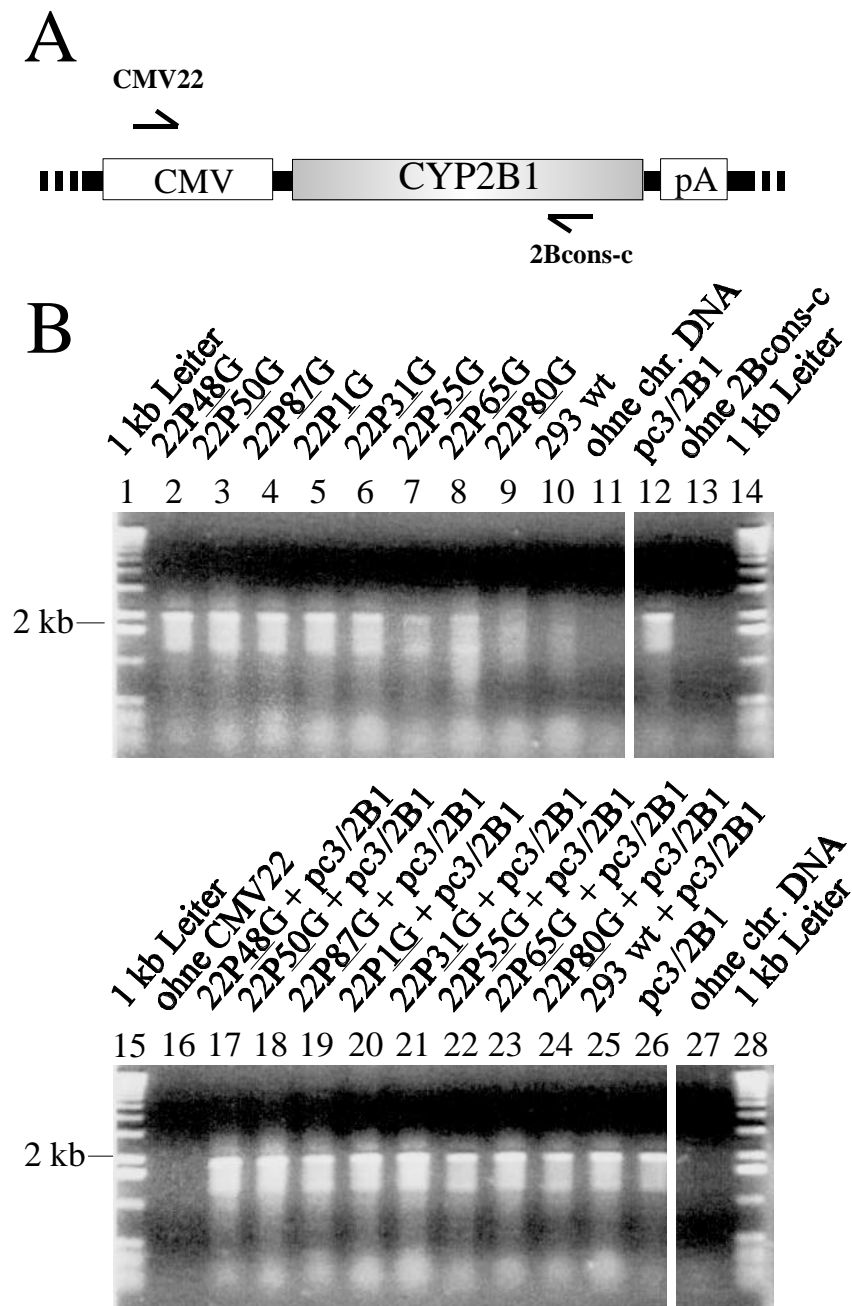


Abbildung 44: Nachweis der CYP2B1-Kassette in 293-Zellklonen mittels PCR

(A) Die Primer CMV22 und 2Bcons-c binden im CMV-Promotor bzw. im CYP2B1-Gen, so dass ein Amplifikat von 1982 bp entsteht. (B) Von den stabil transfizierten Klonen und den parentalen 293wt-Zellen wurde von 8 Klonen chromosomale DNA isoliert (vgl. 2.2.5 A Isolierung genomischer DNA) und 2 µg für eine PCR eingesetzt (vgl. 2.2.5 C Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) eingesetzt. Weiterhin wurden 10 pg des Plasmids pc3/2B1 (Spuren 12 und 26, pc3/2B1) und DNA von 293wt-Zellen (Spur 10, 293wt) untersucht. Ein falsches *annealing* der Primer wurde durch Ansätze mit 10 pg pc3/2B1, aber nur jeweils einem *primer* untersucht (Spur 13, ohne 2Bcons-c und Spur 16, ohne CMV22). Um etwaige Inhibitoren im Reaktionsansatz auszuschließen, wurde eine PCR mit DNA der einzelnen Klone und von 293wt-Zellen in Anwesenheit von 10 pg pc3/2B1 (Spuren 17 - 25, Klon 22P1Gx + pc3/2B1, 293wt + pc3/2B1) durchgeführt.

Alle Reaktionsansätze ohne DNA oder mit nur einem Primer fielen negativ aus (vgl. Abbildung 44 B, Spuren 11, 13, 16 und 27). Dadurch kann ein falsch-positives Ergebnis durch kontaminierende DNA bzw. ein falsches *annealing* von einem der Primer ausgeschlossen werden.

Damit ist diese PCR in 293-Zellen spezifisch für die CMV-CYP2B1-Expressionskassette ist. Alle Klone außer Klon 80 enthalten eine intakte CMV-CYP2B1-Expressionskassette.

3.3.3 Messung der CYP2B1-Aktivität in isolierten 293-Zellklonen

Bei der Bestimmung der enzymatischen CYP2B1-Aktivität wurden, wie bei den CrFK-Klonen 2×10^6 Zellen ausgesät und mit Medium, das 7-Pentoxyresorufin enthält, überschichtet. Nach einer halben Stunde wurde das Medium abgenommen und die Menge an produziertem Resorufin im Überstand in einem Fluorometer gemessen (vgl. 2.2.3 A Resorufin-Test).

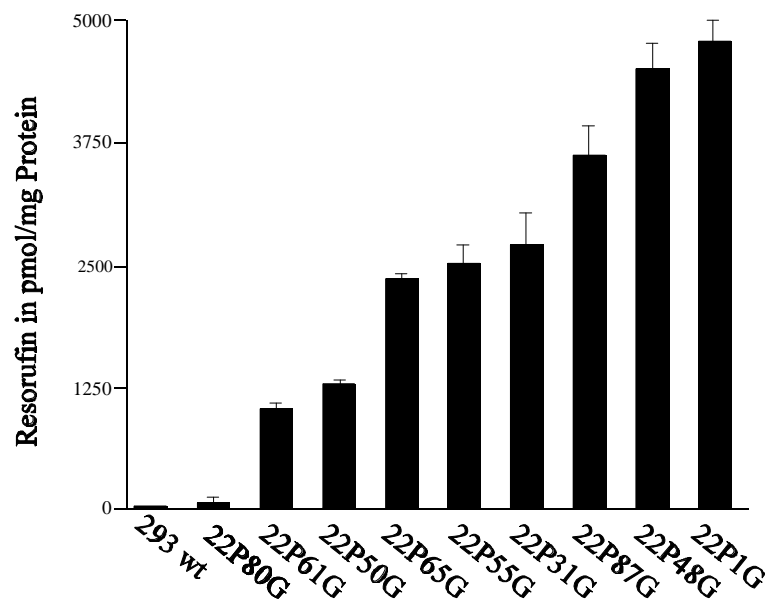


Abbildung 45: Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität von CYP2B1-exprimierenden 293-Zellklonen

Produziertes Resorufin der 293-Zellklone: 2×10^6 Zellen der Klone 22P1G bis 22P87G wurden in der Anwesenheit von 7-Pentoxyresorufin inkubiert. Produziertes Resorufin wurde durch seine Fluoreszenz (Anregung bei 530 nm, Emission bei 590 nm) nachgewiesen und mit dem Gesamtproteingehalt korreliert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von drei Messungen.

Die Zellen des 22P1G-Klons hatten mit 4750 pmol/mg Protein die höchste Resorufinproduktion (vgl. Abbildung 45). Zellen des Klons 22P48G produzierten 4530 pmol/mg Protein und damit fast genauso viel wie die Zellen des 22P1G-Klones. Alle anderen Klone besaßen eine deutlich geringere Aktivität. Zellen des Klons 22P80G und parentale 293wt-Zeigen konnten kein 7-Pentoxyresorufin umsetzen (vgl. Abbildung 45). Dies ist in Übereinstimmung mit den PCR-Daten, da bei Klon 22P80G auch keine CMV-CYP2B1-Expressionskassette nachweisbar war (vgl. Abbildung 44, Spur 9). Die spezifische Resorufinproduktion von 22P1G-Zellen (4750 pmol/mg Protein bei 0,32 mg Protein/2 x 10⁶ Zellen) entspricht damit der 26fachen spezifischen Aktivität von kultivierten Hepatozyten (180 pmol/mg (Donato et al., 1992)).

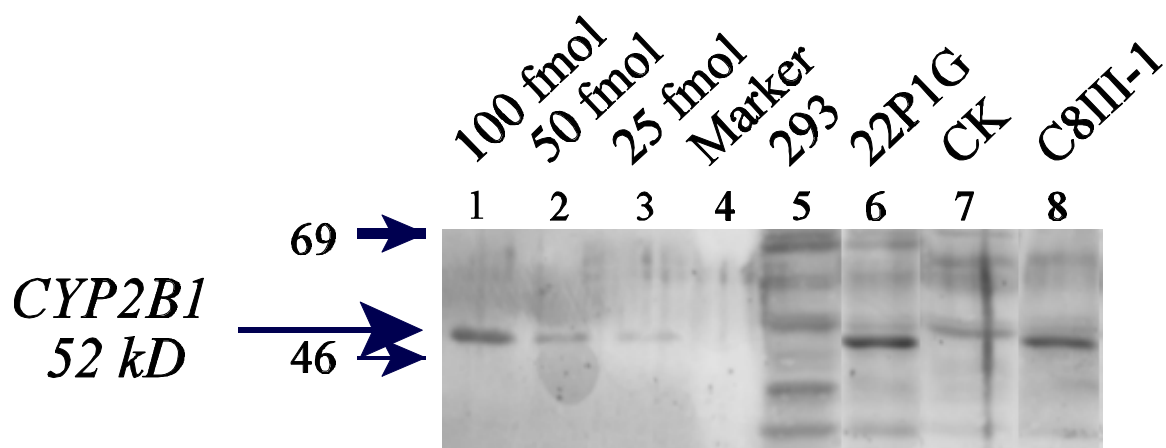


Abbildung 46: Western Blot Analyse von 22P1G und C8III-1-Zellen

Es wurden Membranproteinextrakte der beiden mit dem Plasmid pc3/2B1 transfizierten Klone C8III-1 (Spur 8, Parentalzellen CrFKwt) und 22P1G (Spur 6, Parentalzellen 293) hergestellt und der parentalen Zellen (Spuren 5 und 7) hergestellt. Gleiche Mengen der einzelnen Zellextrakte wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nylonmembran wurde die Membran mit einem polyklonalen anti-CYP2B6-Antikörper und einem polyklonalen alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels *enhanced chemifluorescence* (ECF).

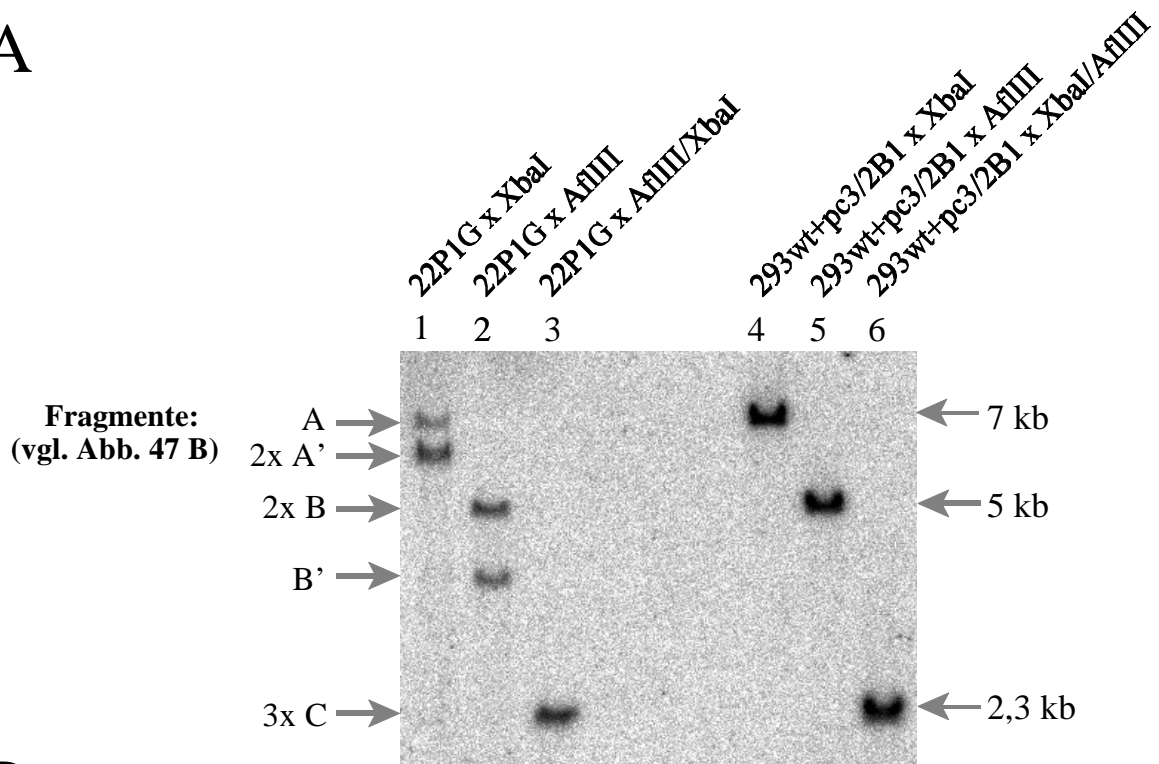
Insgesamt scheinen die getesteten 293-Klone eine höhere enzymatische Aktivität pro Zelle als die getesteten CrFK-Klone zu haben (vgl. 22P1G: 4750 pmol/mg, C8III-1 535 pmol/mg), was möglicherweise auf die sehr hohe CMV-Promotoraktivität in 293-Zellen zurückzuführen ist (Wilkinson and Akrigg, 1992). Zum Vergleich wurde von den beiden Zellklonen (22P1G und C8III-1) ein Membranproteinextrakt hergestellt und mittels Immunoblot das CYP2B1-Protein nachgewiesen (vgl. Abbildung 46). Dabei schien die CYP2B1-Bande der 22P1G-Zellen etwas stärker als die Bande der C8III-1-Zellen zu sein (vgl. Abbildung 46, Spuren 6 und 8). Jedoch kann ausgeschlossen werden, dass die Menge an CYP2B1-Protein des 22P1G-Klons auf dem Immunoblot der 9fachen Menge an CYP2B1-Protein des C8III-1-Klons entspricht. Ein 9faches Verhältnis trat jedoch bei

der Menge an produziertem Resorufin zwischen 22P1G- und C8III-1-Zellen auf (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 45). Man kann daher annehmen, dass die enzymatische CYP2B1-Aktivität nur zum Teil von der Menge an intrazellulär vorhandenen CYP2B1 abhängt.

3.3.4 Nachweis der Integration von pc3/2B1 in 22P1G-Zellen

Der 293-Zellklon 22P1G zeigte im Resorufintest die stärkste enzymatische CYP2B1-Aktivität. Um zu untersuchen ob dies ausschließlich auf die Promotoraktivität oder eventuell auch auf eine mehrfache Integration von pc3/2B1 nach der Transfektion zurückzuführen ist, wurde chromosomale DNA von 22P1G-Zellen isoliert. Die DNA wurde entweder mit XbaI, AflIII oder mit XbaI/AflIII geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Weiterhin wurde 293wt-DNA mit 60 pg pc3/2B1 gemischt, mit XbaI, AflIII oder XbaI/AflIII geschnitten und mit der 22P1G-DNA aufgetragen (vgl. Abbildung 47 A). Nach der Immobilisierung der DNA wurde mit einer gegen CYP2B1 (AflIII/XbaI-Fragment von pc3/2B1, vgl. Abbildung 47 B) gerichteten Sonde hybridisiert. Diese Analyse wurde von der Firma Bavarian Nordic durchgeführt.

A



B

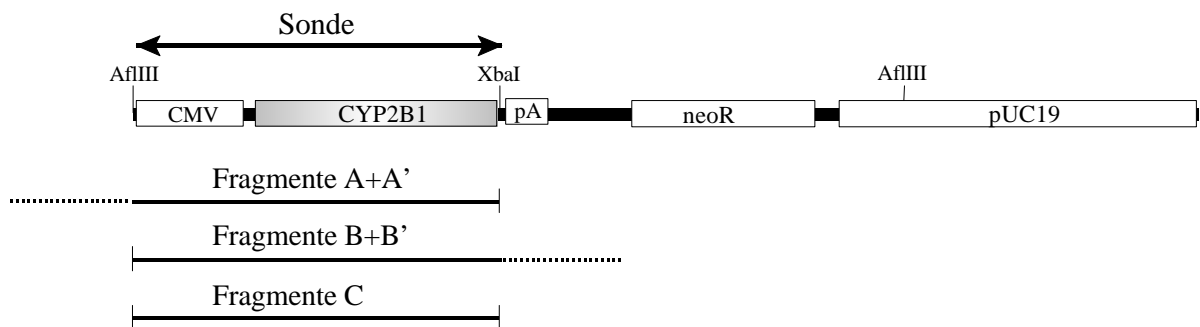


Abbildung 47: Bestimmung der Anzahl integrierter pc3/2B1-Kopien mittels Southern Blot Analyse

(A) Von den 22P1G-Zellen wurde chromosomale DNA isoliert, mit XbaI oder mit AflIII bzw. mit XbaI und AflIII geschnitten. 20 µg der DNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Blotting mit einer gegen CYP2B1 gerichteten Sonde hybridisiert. Weiterhin wurde geschnittene DNA von 293wt-Zellen, die vorher mit 60 pg pc3/2B1 gemischt wurde, aufgetragen (B) Genkarte von pc3/2B1 mit eingezeichneter Sonde sowie den Schnittstellen für die Enzyme AflIII bzw. XbaI. Im unteren Teil sind die Fragmente nach einem XbaI- (A+A'), AflIII- (B+B') bzw. kombinierten XbaI/AflIII-Verdau (C) eingezeichnet. Eine komplette CMV-CYP2B1-Expressionskassette einschließlich Polyadenylierungssignal umfaßt 2,6 kb. (mit freundlicher Genehmigung von Frank Heinemann, Bavarian Nordic).

Bei einem XbaI-Verdau wird pc3/2B1 unmittelbar stromabwärts des CYP2B1-Gens

geschnitten, so dass bei einer Hybridisierung von genomischer DNA gegen CMV-CYP2B1, je nach der Öffnungsstelle und Integration des Plasmids, bei intakter CMV-CYP2B1-Kassette eine Bande mit mindestens 2,3 kb auftreten muß. (vgl. Abbildung 47 A, A und A' sowie Abbildung 47 Fragmente A+A') auftreten. In Spur 1 (vgl. Abbildung 47 A) sieht man zwei Banden, die diese Voraussetzungen erfüllen, wobei die kleinere Bande eine stärkere Signalintensität besitzt. Dies deutet darauf hin, dass diese Bande höchstwahrscheinlich zwei Integrationsereignisse repräsentiert, so dass insgesamt drei Kopien des Plasmids pc3/2B1 im Genom von 22P1G-Zellen vorliegen. Bestätigt wird dies beim AflIII-Verdau, bei dem die obere Bande stärker hervortritt (vgl. Abbildung 47 A, Spur 2). Bei einem kombinierten AflIII/XbaI-Verdau wird die CMV-CYP2B1-Kassette (ohne Polyadenylierungssignal) mit 2,3 kb exakt herausgeschnitten (vgl. Abbildung 47 B). Da bei diesem Verdau keinerlei kleinere oder größere Banden auftraten (vgl. Abbildung 47 A, Spur 3), ist anzunehmen, dass bei keinem der Integrationsereignisse des Plasmids pc3/2B1 in der CMV-CYP2B1-Kassette Deletionen oder Insertionen auftraten und wahrscheinlich drei intakte Kopien vorliegen.

Somit scheint beim 293-Zellklon 22P1G nach der Transfektion des Plasmids pc3/2B1, die CYP2B1-cDNA mit dem CMV-Promoter dreimal in das Genom integriert zu haben.

3.3.5 Cytostatische und cytotoxische Wirkung von IFO auf 22P1G-Zellen

CYP2B1 kann verschiedene Substrate wie Oxazaphosphorine, 7-Pentoxyresorufin oder Hormone enzymatisch umsetzen. Diese Vielseitigkeit scheint auf unterschiedlichen aktiven Zentren oder voneinander abgrenzbaren Bereichen des CYP2B1-Proteins zu beruhen (He et al., 1995). Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die CYP2B1-Zellen trotz einer sehr guten 7-Pentoxyresorufin-Dealkylase-Aktivität ineffizient IFO umzusetzen. Um die Aktivierung von IFO zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten von 22P1G-Zellen in Gegenwart von IFO untersucht. In einem ersten Experiment wurden 1×10^5 22P1G-Zellen in eine 3 cm Schale ausgesät, am nächsten Tag mit unterschiedlichen IFO-Konzentrationen (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1mM, 2 mM und 5 mM) behandelt und am siebten Tag gezählt (vgl. Abbildung 48 A). Bei 0,25 mM traten dabei deutliche toxische Effekt (1,4 % Überlebensrate) auf, die sich bei 0,5 mM weiter steigerten (0,5 % Überlebensrate) und bei Konzentrationen über 0,5 mM dazu führten, dass keine 22P1G-Zelle mehr am Leben war. Im Vergleich dazu waren die parentalen 293wt-Zellen deutlich unempfindlicher (73 % Überlebensrate bei 0,25 mM bzw. 58 % bei 0,5 mM). Auch bei höheren Konzentrationen als 0,5 mM war noch ein Teil der 293wt-Zellen am Leben (43 % Überlebensrate bei 1 mM, 32 % bei 2 mM

und 7 % bei 5 mM). Damit ist anzunehmen, dass die IC_{50} von 22P1G-Zellen weit unter der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,25 mM lag, wohingegen die IC_{50} von 293wt-Zellen sich zwischen 0,5 und 1 mM IFO befand (vgl. Abbildung 48 A).

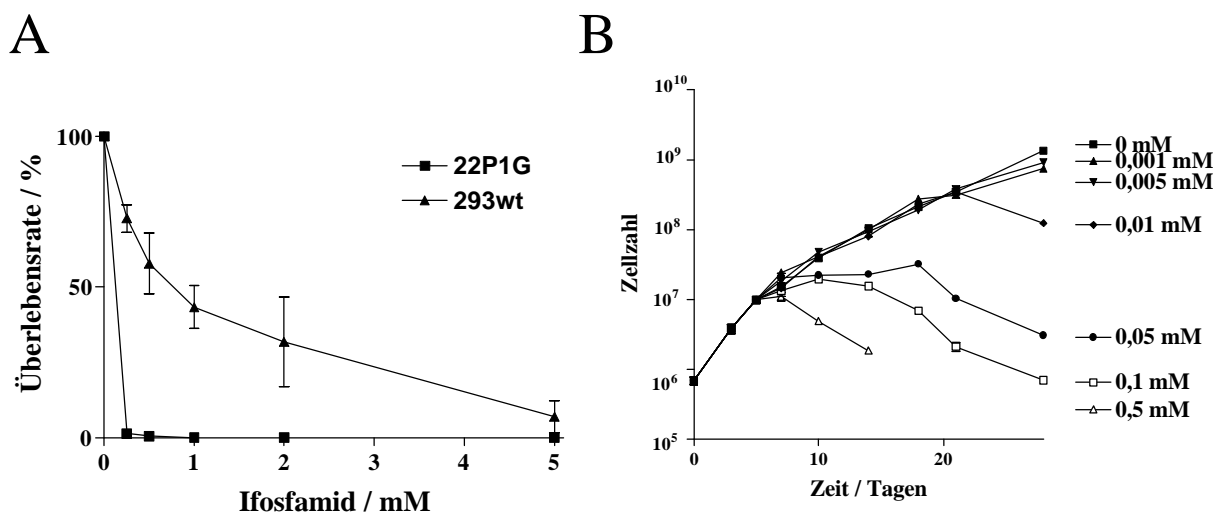


Abbildung 48: Wachstumsverlauf von 22P1G-Zellen bei verschiedenen IFO-Konzentrationen

(A) 4×10^4 22P1G- bzw. 293wt-Zellen wurden in einer 3-cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde IFO mit einer Endkonzentrationen zwischen 0 und 5 mM (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM) zugegeben. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Zellen trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und die Überlebensrate (Quotient zwischen unbehandelten und behandelten Zellen) von 22P1G- und 293wt-Zellen berechnet. (B) 4×10^4 22P1G-Zellen wurden in einer 3 cm-Schale ausgesät. Am 7. Tag wurde IFO mit Endkonzentrationen von 0 mM, 0,001 mM, 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,5 mM zugegeben. Zwei Tage nach Zugabe von IFO und danach alle vier Tage wurden die Zellen gezählt und passagiert. Tote Zellen wurden mittels Trypanblaufärbung ausgeschlossen und unter Einberechnung der Verdünnungen während der Passagen die absolute Zellzahl an jedem Zeitpunkt berechnet.

Da IFO-Konzentrationen über 0,5 mM absolut letal für 22P1G-Zellen sind, sollte im weiteren Verlauf geklärt werden, wie sich das Wachstum von 22P1G-Zellen bei niedrigeren Konzentrationen verhält.

Dazu wurden 4×10^5 Zellen in eine 3 cm-Schale ausgesät und 4. Tage kultiviert. Am 5. Tag wurde IFO mit Endkonzentrationen von 0 bis 0,5 mM (0 mM, 0,001 mM, 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM und 0,5 mM) zugegeben. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen gezählt und konfluent gewachsene Zellschichten trypsiniert und passagiert. Tote Zellen wurden beim Zählen mittels Trypanblaufärbung ausgeschlossen. Unter Einberechnung der einzelnen Verdünnungsschritte während der Passagen wurde die Gesamtzellzahl an jedem Untersuchungstag bestimmt.

Unbehandelte 22P1G-Zellen wuchsen bei diesem Experiment exponentiell (vgl.

Abbildung 48 B), so dass am Ende des Experiments eine theoretische Zellzahl von 10^9 erreicht wurde. Bei sehr niedrigen Konzentrationen von 0,001 mM () und 0,005 mM () IFO traten keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle auf, obwohl bei einer Konzentration von 0,01 mM () bereits ab Tag 21 toxische Effekte auftraten. Konzentrationen ab 0,05 mM (●) inhibierten das Zellwachstum nahezu komplett, so dass die Zellzahl vorläufig stagnierte und nach einigen Tagen (2 d bei 0,5 mM, 5 d bei 0,1 mM und 13 d bei 0,05 mM) die Zellzahl deutlich abnahm.

Insgesamt scheint die IC_{50} von 22P1G-Zellen deutlich unter 0,25 mM IFO zu liegen, obwohl sich die IC_{50} bei 293wt-Zellen zwischen 0,5 und 1 mM befindet. Die Behandlung mit IFO löst zunächst einen Zellarrest aus, wodurch die Zellzahl über mehrere Tage konstant bleibt (cytostatische Wirkung). Danach nimmt die Zellzahl rapide ab, was auf eine cytotoxische Wirkung von IFO hinweist. Die Arretierung der Zellen sowie der Beginn des Zellsterbens hängt dabei von der IFO-Konzentration im Medium ab.

A Nachweis der CYP2B1-Aktivität in Kapseln

Noch wichtiger als die suizide Wirkung von IFO ist ein potenter *bystander effect* für eine zellvermittelte IFO-Aktivierung. Für die spätere Anwendung in der klinischen Studie war es weiterhin wichtig, nicht nur einen *bystander effect* von adhärenen 22P1G-Zellen zu demonstrieren, sondern auch eine Freisetzung der kurzlebigen, aktivierten Metaboliten aus Kapseln, die die 22P1G-Zellen umschließen, zu haben.

Unter Benutzung eines *transwell system* (vgl. Abbildung 15) kann die toxische Wirkung freigesetzter Metaboliten auf Reporterzellen nachgewiesen werden. Dazu wurden in einem *transwell system* die verkapselten Zellen in das *transwell* gegeben und in der dazugehörigen Zellkulturschale CrFK-Zellen als Reporterzellen ausgesät. Weiterhin wurden die CrFK-Zellen statt mit Kapseln, entweder zusammen mit unverkapselten 22P1G-Zellen oder ohne Zellen kultiviert. Die Überlebensrate wurde als Quotient von IFO -behandelten und -unbehandelten Reporterzellen errechnet.

Die CrFK-Reporterzellen zeigten eine Reduktion der Überlebensrate auf 50 %, wenn sie in Anwesenheit von verkapselten CYP2B1 produzierenden Zellen kultiviert wurden (vgl. Abbildung 30). Zusammen mit unverkapselten Zellen betrug die Überlebensrate 64 % und ohne CYP2B1-exprimierende Zellen 95 %.

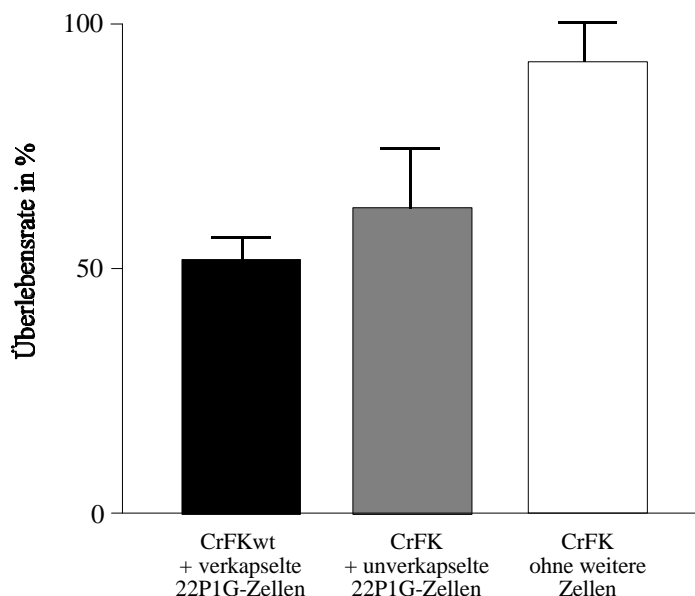


Abbildung 49: Nachweis von toxischen Metaboliten nach Aktivierung durch verkapselte CYP2B1-exprimierende Zellen

CrFK-Zellen wurden als Reporterzellen zusammen mit verkapselten und unverkapselten 22P1G-Zellen oder ohne weitere Zellen mit oder ohne 0,5 mM IFO kultiviert. Am Ende des Experimentes wurden die Reporterzellen gezählt und der Quotient von IFO-behandelten zu unbehandelten Reporterzellen (Überlebensrate) berechnet.

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass eine IFO-Aktivierung auch durch verkapselte Zellen stattfinden kann und der *bystander effect* auch nach einer Verkapselung der Zellen mit Zellosulfat erhalten bleibt.

B Injektion von enkapsulierten Zellen in das porcine Pankreas

Zum Einsatz beim Menschen stellte sich die Frage, wie die Kapseln am besten in den Pankreastumor implantiert werden können. Bei humanen Patienten ist der Pankreastumor nur sehr schwer zu erreichen. Eine Möglichkeit um verkapselte Zellen in das Pankreas zu applizieren, war die Instillation über einen intra-arteriellen Katheter. Diese Technik wurde in enger Zusammenarbeit der Universitätsklinik in Rostock und der Abteilung für Biomedizinische Forschung im Allgemeinen Krankenhaus in Wien (AKH) am Schweinmodell etabliert. Unter Darstellung der Gefäße mittels Kontrastmittel (angiographischer Kontrolle) wurde der Katheter in die punktierte Arterie des Oberschenkels (*Arteria femoralis*) eingeführt und über die Aorta bis in die Hauptarterie des Pankreas vorgeschoben (vgl. Abbildung 50 A und B). Dort wurden die Kapseln supraselektiv ausschließlich in pankreatische Gefäße entlassen. Während der

Implantation der Kapseln konnten keine schweren Nebenwirkungen, wie z.B. Schock festgestellt werden.

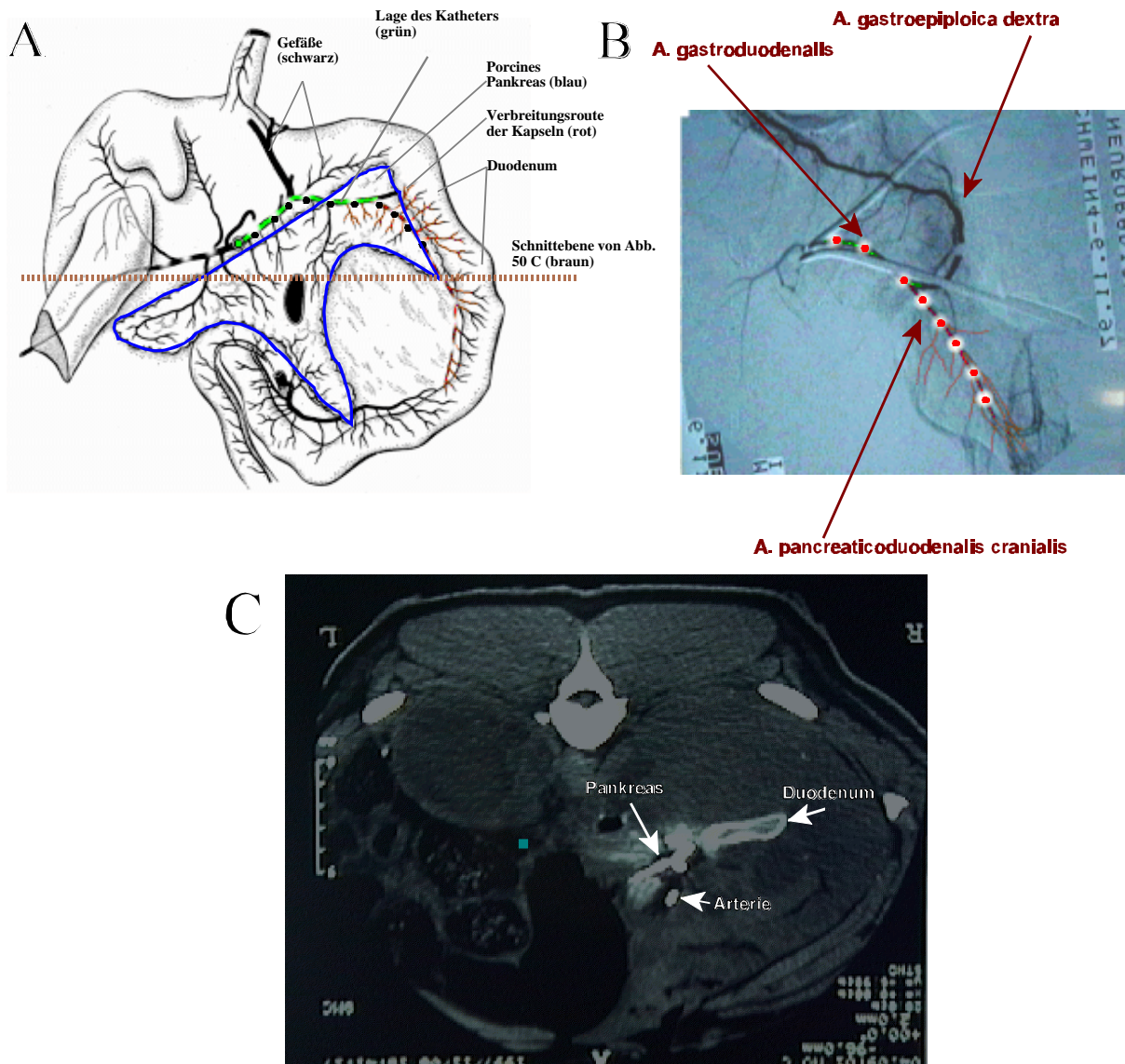


Abbildung 50: Instillation von Kapseln in das porcine Pankreas

(A) Schematische Darstellung des dreischenkligigen porcinen Pankreas (blau) mit benachbartem Duodenum (Zwölffingerdarm) und schwarz hervorgehobenen Gefäßen. Die Lage des Katheters (grün) und die angenommene Route der entlassenen Kapseln (rot) sowie die Schnittebene einer computertomografischen Analyse (vgl. (C)) (braun) ist hervorgehoben. (B) Angiographie während einer Instillation von Kapseln in das porcine Pankreas. Die Route der applizierten (stark vergrößerten) Kapseln ist durch dunkle Kreise angedeutet. (C) Computertomografische Aufnahme nach Instillation von Eisen gefüllten Kapseln in das porcine Pankreas (vgl. Schnittebene in (A)). Helle Bereiche bei Pankreas, Duodenum und Arterie zeigen eine Akkumulation von Eisenhaltigen Kapseln

Ein Teil der implantierten Kapseln enthielt entweder Eisen oder fluoreszierende Farbstoffe. Auf Grund dieser Markierung konnten die Kapseln zum Teil im explantierten Pankreas in Kollaboration mit dem Institut für Röntgenologie mittels Computertomographie (vgl. Abbildung 50 C) oder histologisch am Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien nachgewiesen werden. Die Kapseln verbreiteten sich ausgehend von dem Ort der Freisetzung mit dem Blutstrom in die kleineren Gefäße des Pankreas und des Duodenums (vgl. Abbildung 50 C). Damit folgten die Kapseln exakt der durch die porcine Gefäßstruktur vorgegebenen Route (vgl. Abbildung 50 A). Im Gegensatz zum Schwein versorgt das pankreatische Hauptgefäß beim Menschen ausschließlich das Pankreas, aber nicht das Duodenum. Durch diesen anatomischen Vorteil ist eine Instillation der Kapseln ausschließlich in das Pankreas möglich. Dies läßt auch erwarten, dass eine anschließende IFO-Aktivierung durch verkapselte CYP2B1-exprimierende Zellen sich ausschließlich auf das Pankreas beschränkt.

Unmittelbar nach der Kapselimplantierung im Schwein traten histologisch kleine Entzündungsherde neben den Gefäßen (Perivaskuläre Granulomatose) oder kurzzeitige Gefäßverschlüsse (Thrombus) auf. Insgesamt gab es jedoch bei allen Tieren während der anschließenden Beobachtungszeit keine auffälligen klinischen Symptome, wie Ischämie (mangelnde Blutversorgung) oder Entzündung (Pankreatitis) des Pankreas.

Damit scheint die intraarterielle Instillation von Kapseln eine sehr selektive und sichere Methode zu sein um die verkapselten Zellen in das Pankreas zu implantieren. Die ermutigenden präklinischen Daten und die Möglichkeit einer selektiven, mikroinvasiven und sicheren Methode der Kapselimplantation führte zum Start einer klinischen Studie der Phase I/II zur möglichen Therapie von pankreatischen Adenokarzinomen bei Patienten (Löhr et al., 1999) (vgl. 4.1.6 Klinische Studie).

3.4 Retrovirus vermittelte IFO-Aktivierung

3.4.1 Eigenschaften einer Retrovirus vermittelten Aktivierung *in vitro*

Nach den bisherigen Ergebnissen und den inzwischen von der klinischen Studie gewonnenen Daten (vgl. 4.1.6 Klinische Studie) scheint die zellvermittelte Aktivierung von IFO eine Verbesserung der herkömmlichen Chemotherapie von soliden Tumoren mittels IFO darzustellen. Jedoch ist der Bereich, in dem die zelluläre CYP2B1-vermittelte Aktivierung von IFO einen Effekt ausüben kann, relativ eng auf den Ort der Implantation begrenzt. Hinzu kommt, dass die toxische Wirkung ausschließlich auf dem *bystander effect* beruht.

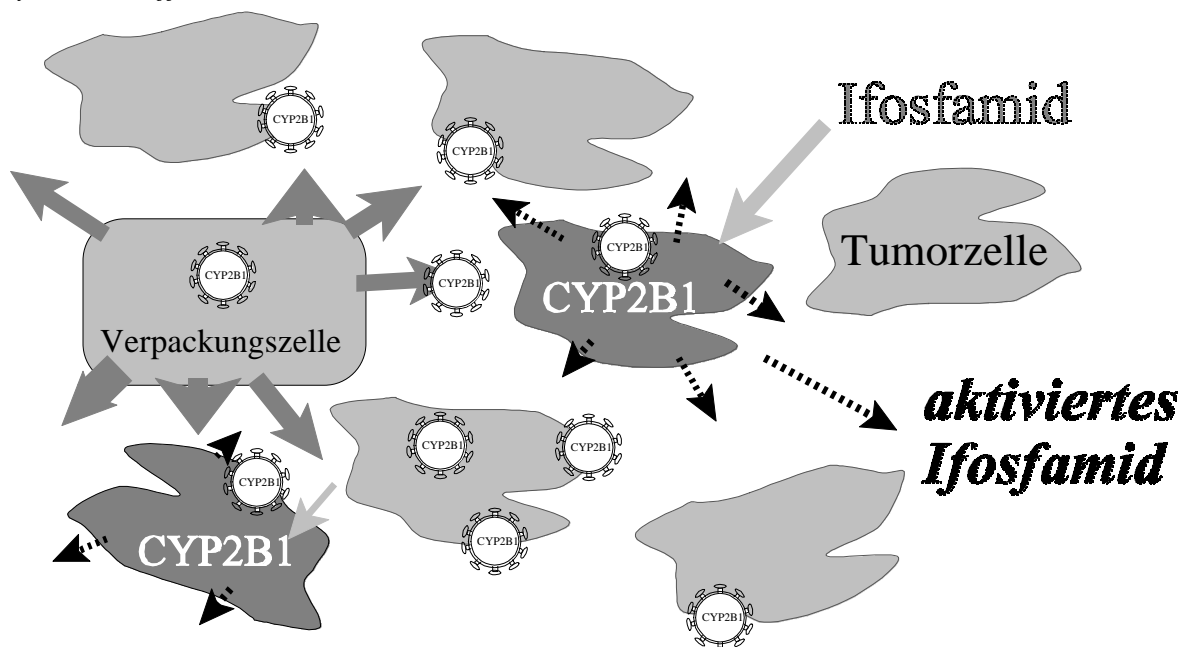


Abbildung 51: Virus vermittelte CYP2B1-Aktivierung nach Implantation einer Verpackungszelle

Verpackungszellen, die in den Tumor eingebracht werden, setzen retrovirale Vektoren frei. Diese infizieren umgebende Tumorzellen und bauen die CYP2B1-Expressionskassette in das Genom der Tumorzelle ein. Das in den Tumorzellen exprimierte CYP2B1 aktiviert IFO zu toxischen Metaboliten. Dadurch wird die exprimierende Tumorzelle und durch den *bystander effect* das umliegende nicht infizierte Tumorgewebe geschädigt.

Eine durch Gentherapie vermittelte Aktivierung von Ifosfamid bedeutet, dass eine CYP2B1-Expressionskassette durch einen Vektor, in diesem Fall ein Retrovirus, in die Tumorzelle geschleust und dort exprimiert wird. Dadurch entstehen die toxischen

Metaboliten direkt in der Tumorzelle. Diese Strategie hat auch den Vorteil, dass mit Retroviren infizierte Tumorzellen, die metastasieren, das CYP2B1-Gen an alle Tochterzellen weitergeben und damit auch Metastasen durch eine systemische IFO-Behandlung sehr spezifisch eliminiert werden können.

A Bestimmung der Infizierbarkeit von pankreatischen Tumorzellen

Grundvoraussetzung für einen durch Retroviren vermittelten Gentransfer ist die Infizierbarkeit der Zielzelle. Um die Infizierbarkeit von pankreatischen Tumorzellen *in vitro* zu testen, wurden sie mit dem Virusüberstand einer Verpackungszelllinie überschichtet. Die Verpackungszelllinie beruht auf PA317-Zellen, die stabil das Plasmid pLXSNegfp (vgl. Abbildung 68) integriert hatten und permanent egfp-transduzierende Murine Leukämie Virus (MLV)-Vektoren (LXSNegfp, (Klein et al., 1997)) produzieren und in das Medium abgeben. Der retrovirale Vektor LXSNegfp enthält die essentiellen *cis*-aktiven Elemente für die Verpackung, reverse Transkription und Integration von MLV. Dabei bilden die Langen Terminalen Repetitionen (*long terminal repeats*, LTRs) die Begrenzung für die zu transduzierenden Gene. Zu diesen gehören das egfp-Gen und eine eukaryote Kassetten für die Expression des Neomycin-Phosphotransferasegens (neoR), das eine Resistenz gegenüber Neomycin und seinen Analoga vermittelt.

Zur Überprüfung der Infizierbarkeit wurden 4×10^4 der Zielzellen in 2 ml Normalmedium in eine 3 cm Schale ausgelegt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 0,5 ml Virusüberstand von 5×10^5 LXSNegfp produzierenden Zellen, die am Tag zuvor ausgelegt wurden, überschichtet und 48 h später mittels FACS-Analyse der Anteil der mit LXSNegfp transduzierten Zellen bestimmt (vgl. 2.2.4 Durchflusszytometrie). Als Zielzellen wurden verschiedene pankreatische Tumorzelllinien (human: MiaPaca2, PANC1, PACA44, Ratte: RIN5, murin: PAN02) sowie leicht infizierbare Mausfibroblasten (NIH3T3) verwendet (vgl. 2.1.8 Zelllinien). Es zeigte sich, dass alle pankreatischen Tumorzellen infizierbar waren (vgl. Abbildung 52). Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis, da PA317-Zellen amphotrope MLV-Vektoren produzieren (Miller and Buttimore, 1986). Allerdings war der Anteil der infizierten Zellen im Vergleich zu NIH3T3-Zellen geringer. Der höchste Titer von allen pankreatischen Zelllinien wurde bei PACA44-Zellen mit 39 % egfp-positiven Zellen erreicht. Darauf folgten RIN5 (17 %), PAN02 (8 %), MiaPaca (6 %) und PANC1-Zellen (3 %). Im Vergleich dazu waren 90 % der NIH3T3-Zellen nach der Infektion transduziert. Insgesamt war jedoch keine Tendenz für eine effiziente Infizierbarkeit entweder muriner oder humaner Zellen zu erkennen.

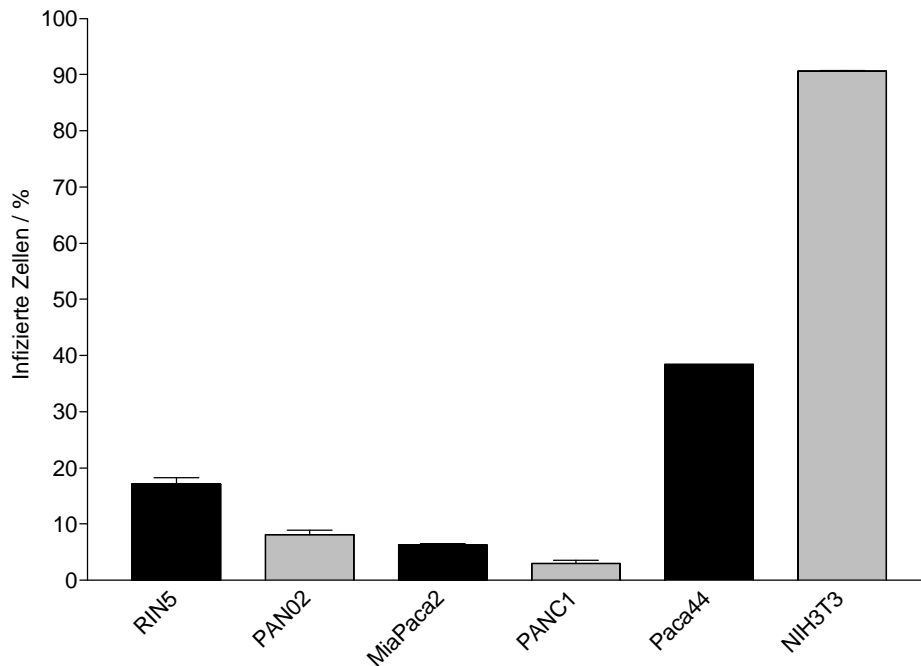


Abbildung 52: Infizierbarkeit von pankreatische Tumorzellen

Pankreatische Zelllinien und Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden mit dem Überstand einer LXSNegfp produzierenden Verpackungszelllinie (PALSG) infiziert und der Anteil der egfp-positiven Zellen nach der Infektion mittels FACS-Analyse ermittelt. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus zwei Experimente.

Dieses Experiment zeigt, dass alle getesteten Zielzellen mit MLV-Vektoren, die von PA317-Zellen produziert wurden, infiziert werden können, jedoch ist die Infizierbarkeit im Vergleich zu den leicht infizierbaren Mausfibroblasten (NIH3T3) deutlich geringer.

B Konstruktion eines CYP2B1 transduzierenden Vektors

Ausgangspunkt für die Klonierung eines CYP2B1 transduzierenden MLV-Vektors (LCSN) war das Plasmid pLXSNegfp (vgl. Abbildung 70). Zur Herstellung des Vektors pLCSN (vgl. Abbildung 53) wurde das egfp-Gen des Plasmids pLXSNegfp entfernt und der verbleibende Vektor mit dem CYP2B1-Gen des Plasmids pc3/2B1 ligiert (vgl. 10.1.2 Konstruktion von pLCSN). Der resultierende Vector LCSN enthält das CYP2B1-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven MLV-Promotors im 5'-LTR und das neoR-Gen

unter der Kontrolle des SV40-Promotors (vgl. Abbildung 34).

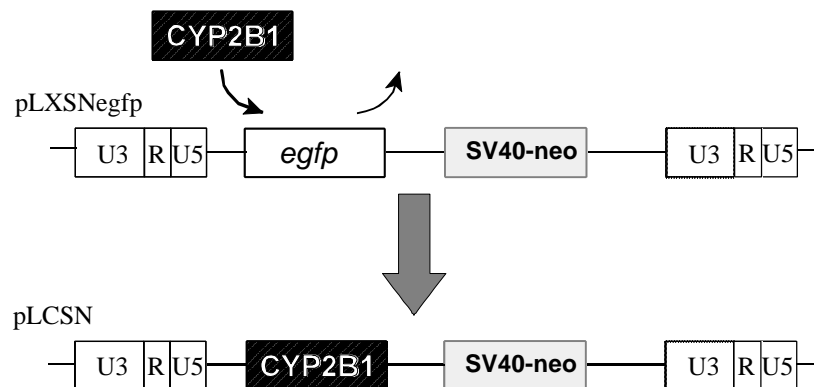


Abbildung 53: Herstellung des Vektors LCSN

Das *egfp*-Gen des Plasmids pLXSNegfp wurde herausgeschnitten und durch das CYP2B1-Gen ersetzt. Das resultierende Plasmid pLCSN enthält den retroviralen Vektor LCSN.

C Herstellung LCSN produzierender Verpackungszelllinien

Zur Produktion von retroviralen Vektoren muss die Plasmid-DNA in geeignete Verpackungszellen eingebracht und dort transkribiert werden. Um ein möglichst weites Infektionsspektrum der MLV-Vektoren zu erhalten, kamen als Verpackungszellen nur solche in Frage, die amphotropes *env*-Protein produzieren. Unter diesen Voraussetzungen standen die Verpackungszelllinien PA317 (Miller and Buttimore, 1986), FlyA (Cosset et al., 1995) und 2GP19Talf8P (Renate Renz, persönliche Mitteilung) zur Verfügung. PA317-Zellen sind eine häufig verwendete Verpackungszelllinie der zweiten Generation, während FlyA und 2GP19Talf8P bereits zur dritten Generation (vgl. 1.4.4 C Verpackungssysteme) gehören. Alle drei Zelllinien wurden mit dem Plasmid pLCSN transfiziert und durch Neomycin-Selektion stabil Virus-produzierende Populationen etabliert. Mit dem virushaltigen Überstand dieser Zellen wurden NIH3T3-Zellen infiziert (vgl. 2.2.2 F Infektionen) und nach der Infektion die Anzahl der Neomycin-resistenten Zellklone bestimmt (vgl. 2.2.2 G Selektionsmethoden).

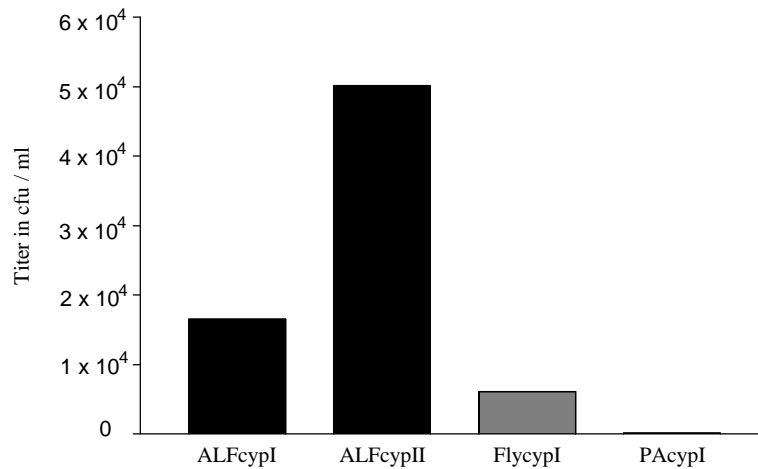


Abbildung 54: Virusproduktion verschiedener Verpackungszelllinien

Die Verpackungszelllinien 2GP19Talf8P, FlyA und PA317 wurden mit dem Plasmid pLCSN transfiziert. Nach Etablierung stabil Virus-produzierender Populationen (ALFcypI + II, FlycypI, PacypI) wurde der Überstand auf NIH3T3-Zellen übertragen und der Virustiter über die Anzahl Neomycin-resistenter Zellen durch Koloniebildung (*colony forming units*, cfu) bestimmt.

Alle drei verwendeten Verpackungszelllinien produzierten infektiöses Virus, das auf NIH3T3-Zellen eine Neomycinresistenz übertrug (vgl. Abbildung 54). Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Zellen. Den höchsten Titer zeigten die beiden auf 2GP19Talf8P-Zellen beruhenden LCSN produzierenden Populationen ALFcypI und ALFcypII ($1,8 \times 10^4$ bzw. 5×10^4 cfu/ml, vgl. Abbildung 54). Die Population, die auf FlyA-Zellen beruht, FlycypI und die auf PA317-Zellen beruhende Zellen PAcypI zeigten im Vergleich einen deutlich geringeren Titer (5×10^3 bzw. 63 cfu/ml). Die Titer der FlyA- und der PA317-Zellen lagen damit unter den Werten (10^6 bis 10^7 cfu/ml), die bereits von anderen Gruppen gemessen wurden (Cosset et al., 1995; Miller and Buttimore, 1986).

Da die beiden auf 2GP19Talf8P-Zellen beruhenden Populationen den höchsten Titer aufwiesen, wurden sie für die weiteren Experimente herangezogen.

D Etablierung eines „High Producers“

Um für nachfolgende Experimente einen Klon mit hoher Virusproduktion zur Verfügung zu haben, wurden von den mit dem Plasmid pLCSN transfizierten 2GP19Talf8P-Zellen zusätzliche Neomycin-resistente Klone isoliert und auf ihre Virusproduktion untersucht

(vgl. Abbildung 55). Obwohl alle Klone resistent gegenüber Neomycin waren, traten erhebliche Unterschiede bei der Virusproduktion auf. Den höchsten Titer zeigte Klon 23 ($9,8 \times 10^4$ cfu/ml), gefolgt von Klon 20 ($8,4 \times 10^4$ cfu/ml) nach Infektion von NIH3T3-Zellen. Die Klone 9, 12, 15, 16 und 17 zeigten eine schwache bis mittelstarke Virusproduktion. Bei den Klonen 10 und 18 wurde keine Virusproduktion beobachtet.

Somit besaßen ALFcyp23-Zellen die höchste Virusproduktion von allen pLCSN transfizierten 2GP19Talf8P-Klonen (vgl. Abbildung 55).

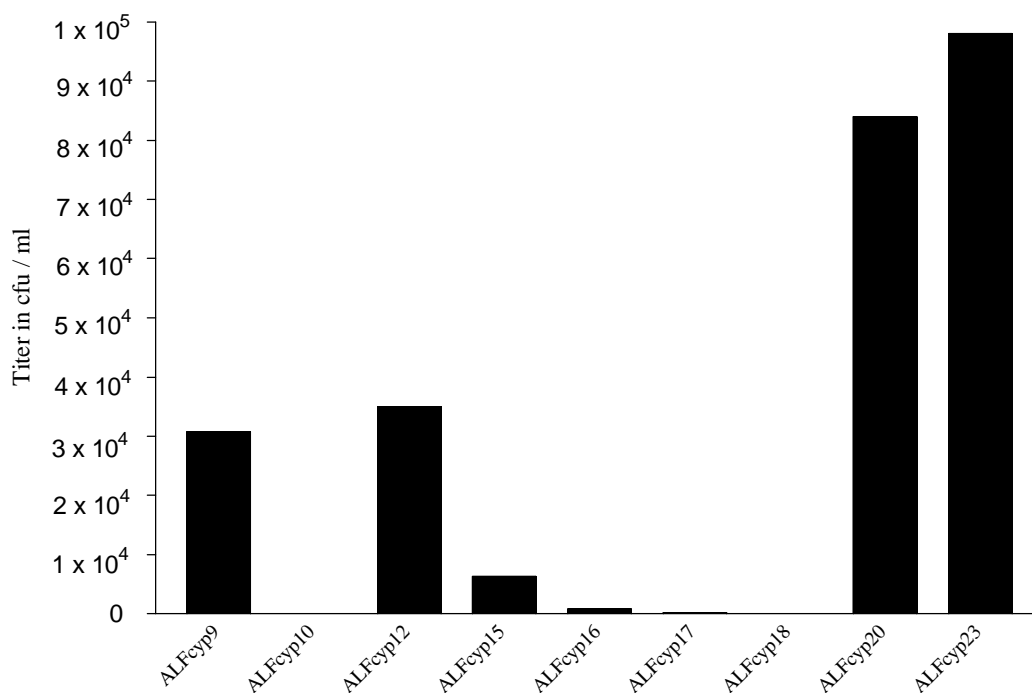


Abbildung 55: Titer einzelner LCSN produzierender 2GP19Talf8P-Zellklone

2GP19Talf8P-Zellen wurden mit dem Plasmid pLCSN transfiziert. Von stabilen Klonen wurde der Überstand auf NIH3T3-Zellen übertragen und der Anteil infizierter Zellen bestimmt (*colony forming units*, cfu).

E Toxizität von Ifosfamid auf pankreatische Tumorzellen nach endogener Aktivierung

Für die zellvermittelte Aktivierung von IFO wurden einzelne Zellklone verwendet, in denen das CYP2B1-Gen stark exprimiert wurde (vgl. 3.1.2 Herstellung von stabil CYP2B1-exprimierenden Zellklonen und 3.3.3 Messung der CYP2B1-Aktivität in isolierten 293-Zellklonen). Bei einer Virus-vermittelten Übertragung des CYP2B1-Gens auf Tumorzellen entsteht dagegen eine heterogene Population von infizierten Zellen mit

unterschiedlich starker CYP2B1-Expression. Zur Untersuchung, wie eine IFO-Behandlung auf eine LCSN transduzierte Zellpopulation wirkt, wurde diese Situation *in vitro* simuliert. Dazu wurden mehrere Zelllinien (PAN02, PANC1, MiaPaca2, PACA44, NIH3T3) mit dem Überstand der LCSN-produzierenden Zelllinie ALFcyp23 überschichtet und, um Unterschiede in der Infektionseffizienz auszugleichen, die infizierten Zellpopulation auf Neomycin selektiert. Die stabil infizierten Populationen, sowie die nicht infizierten parentalen Zellen wurden in Gegenwart von 1 mM IFO kultiviert und die Überlebensrate der Zellen ermittelt (vgl. Abbildung 56).

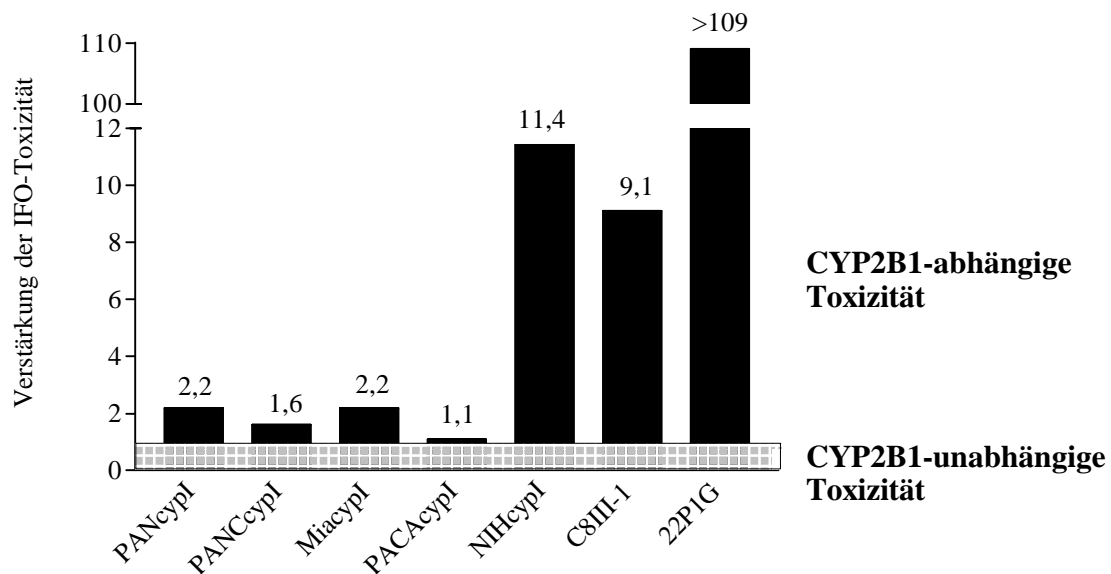


Abbildung 56: Verstärkung der IFO-Toxizität durch endogene CYP2B1-Expression

Verschiedene pankreatische Zelllinien und eine nicht-pankreatische Zelllinie wurden mit dem Überstand der Zelllinie ALFcyp23 überschichtet und nach der Infektion in Gegenwart von Neomycin kultiviert. Stabil Neomycin-resistente Zellpopulationen (PANcypI, PANCcypI, MIAcypI, PACAcypI, NIHcypI) wurden mit 1 mM IFO behandelt und die Verstärkung der IFO-Toxizität als Quotient der Überlebensraten von parentalen (PAN02, PANC1, MiaPaca, PACA44, NIH3T3) und CYP2B1-exprimierenden Zellen gemessen. Zum Vergleich wurde der Verstärkungsfaktor von C8III-1- und 22P1G-Zellen angegeben.

Alle infizierten Zelllinien zeigten nach IFO-Behandlung eine verstärkte Toxizität gegenüber IFO. Allerdings traten zwischen den verschiedenen Populationen deutliche Unterschiede auf. Die Populationen MIAcypI (2,2fache Verstärkung der IFO-Toxizität, Stammzelllinie MiaPaca), PANcypI (2,2fache Verstärkung, Stammzelllinie PAN02), PANCcypI (1,6fache Verstärkung, Stammzelllinie PANC1) und PACAcypI (1,1fache Verstärkung, Stammzelllinie PACA44) zeigten eine abnehmende Sensitivität gegenüber IFO. Die höchste cytotoxische Verstärkung bei 1 mM IFO wurde in NIHcypI-Zellen

gemessen (11,4fache Verstärkung, Stammzelllinie NIH3T3). Selbst bei dem CYP2B1-exprimierenden Zellklon C8III-1 wurde bei 1 mM IFO nur eine 9,1fache Verstärkung der Toxizität durch eine CYP2B1-Expression erreicht. Am stärksten jedoch war die Verstärkung der IFO-Toxizität in den auch in der klinischen Studie verwendeten 22P1G-Zellen. Hier konnte sie für 1 mM nicht mehr berechnet werden, da es unter diesen Bedingungen keine lebenden 22P1G-Zellen mehr gab (Nenner im Bruch = 0). Bei einer Konzentration von 0,5 mM IFO jedoch lag die Verstärkung bei einem Faktor von 109.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression von CYP2B1 die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber IFO im Vergleich zu den parentalen Zellen erhöht. Allerdings ist diese Erhöhung der Sensitivität gegenüber IFO in den pankreatischen Tumorzellen im Vergleich mit NIHcypI-Zellen, die auf der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 beruhen deutlich geringer. Auch gegenüber den beiden Zellklonen C8III-1 und 22P1G, die von Katzennierenzellen (CrFK) bzw. humanen embryonischen Nierenzellen (293) abstammen und das CYP2B1-Gen unter der Kontrolle des starken CMV-Promoters besitzen, zeigen die pankreatischen Zellen nur eine schwache Sensitivitätssteigerung. Ein naheliegender Grund ist eine geringere Aktivität des MLV-Promotors in den pankreatischen Zelllinien im Vergleich mit murinen NIH3T3-Zellen bzw. des CMV-Promotors in CrFK- und 293-Zellen. Dies soll nun im weiteren untersucht werden.

F Semiquantitative Bestimmung der MLV-Promotoraktivität in infizierten Zelllinien

Da zwischen den mit dem LCSN-Vektor infizierten Zellpopulationen deutliche Sensitivitätsunterschiede gegenüber IFO auftraten, wurde untersucht, wie stark die vom MLV-Promotor getriebene Expression in den einzelnen Zelllinien ist. Um Aufschluß über die Stärke des MLV-Promotors, der sowohl das egfp-Gen im Vektor LXSNegfp als auch das CYP2B1-Gen im Vektor LCSN treibt, zu bekommen, wurden die Zelllinien NIH3T3, PAN02, MiaPaca, PANC1 und PACA44 mit dem Überstand der den retroviralen Vektor LXSNegfp produzierenden Zelllinie PALSG infiziert und nach 48 Stunden die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des exprimierten egfp in den egfp-positiven infizierten Zielzellpopulationen mittels FACS-Analyse bestimmt.

Alle pankreatischen Zelllinien zeigten eine MFI, die zwischen 187 (PAN02) und 134 (MiaPaca) lag (vgl. Abbildung 57). Im Vergleich dazu wiesen NIH3T3-Zellen eine deutlich stärkere MFI von 707 auf. Das bedeutet, dass in allen pankreatischen Zelllinien zur Zeit der Messung 4mal (PAN02) bis 5,3mal (MiaPaca) weniger egfp-Protein in den Zellen vorlag als in den infizierten Mausfibroblasten (vgl. Abbildung 57).

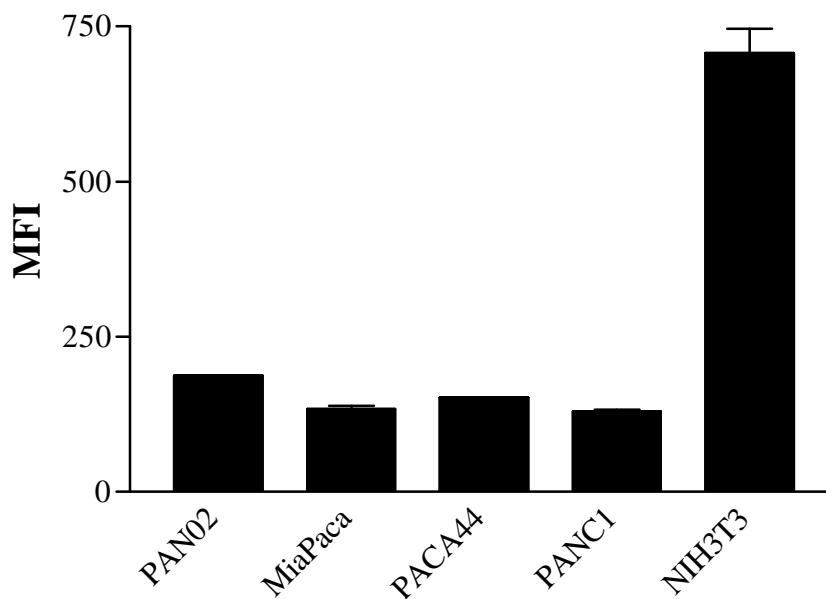


Abbildung 57: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) LXSNegfp infizierter Zelllinien

Verschiedene Zelllinien (NIH3T3, PAN02, MiaPaca, PANC1, PACA44) wurden mit dem Überstand einer LXSNegfp produzierenden Zelllinie (PALSG) überschichtet und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der egfp-positiven Zellen nach der Infektion mittels FACS-Analyse gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei Experimenten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die niedrige MFI der pankreatischen Zelllinien im Vergleich mit NIH3T3-Zellen höchstwahrscheinlich auch den Gehalt an CYP2B1-Protein in den LCSN infizierten Zellpopulationen reflektiert. Ein mögliche Ursache für den niedrigen egfp-Proteingehalt in den Zellen ist eine deutlich schwächere Aktivität des murinen MLV-Promotors in humanen (PANC1, PACA44, MiaPaca) und murinen (PAN02) pankreatischen Tumorzellen im Vergleich mit Mausfibroblasten (NIH3T3).

G Nachweis des CYP2B1-Proteins in infizierten Zelllinien

Zum Nachweis des CYP2B1-Proteins und zur Bestärkung der Korrelation zwischen der MFI LXSNegfp infizierter Zellen (PANC1, PAN02, PACA44) und dem CYP2B1-Gehalt der LCSN infizierten pankreatischen Tumorzellen (PANCcypI, PANcypI, PACAcypI), wurden Membranproteinextrakte hergestellt und 20 µg Gesamtmembranprotein mittels einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nylonmembran transferiert und das CYP2B1-Protein mit einem polyklonalen anti-CYP2B1-Antikörpers und eines sekundären Peroxidase gekoppelten anti-Ziege-Antikörpers detektiert.

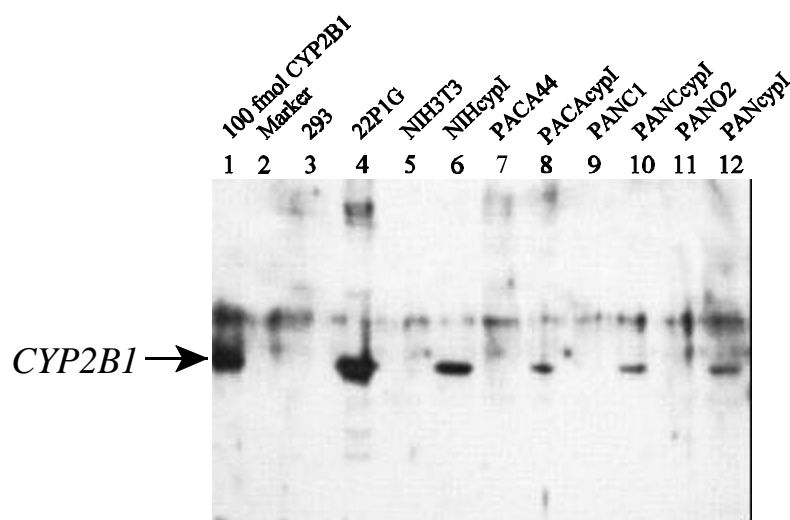


Abbildung 58: Western Blot Analyse von CYP2B1 in LCSN infizierten Zelllinien

20 µg Membranproteinextrakt von LCSN stabil infizierten Zellpopulationen (NIHcypI, PACAcypI, PANCcypI, PANcypI) sowie parentalen Zelllinien (NIH3T3, PACA44, PANC1, PAN02) wurden über eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Zum Vergleich wurden 100 fmol CYP2B1 bzw. 20 µg Membranproteinextrakt aus 22P1G-Zellen und deren parentale Zellen 293 mit aufgetragen. Die Membran wurde mit einem anti-CYP2B1-Antikörper (Daichi) und einem Peroxidase gekoppelten anti-Ziege-Zweitantikörper unkubiert und CYP2B1 mittels *enzyme based chemiluminescence* (ECL) detektiert.

Alle untersuchten LCSN infizierten Zelllinien (vgl. Abbildung 58, Spuren 4, 6, 8, 10 und 12) zeigten auf der Höhe der Positivkontrolle eine Bande (CYP2B1), die bei den parentalen Zelllinien nicht zu sehen war (vgl. Abbildung 58, Spuren 3, 5, 7, 9 und 11). Die CYP2B1-Bande der NIHcypI-Zellen (Spur 6) war jedoch deutlich stärker als die der drei pankreatischen Zelllinien (PACAcypI (Spur 8), PANCcypI (Spur 10), PANcypI (Spur 12)). Damit korreliert die IFO-Toxizität in den LCSN infizierten Zellen, sowie die MFI LXSNegfp infizierter Zellen mit dem Vorhandensein von intrazellulärem CYP2B1-Protein in LCSN infizierten Zellen.

Insgesamt zeigte der Nachweis des CYP2B1-Proteins in den LCSN-infizierten Zelllinien, dass zwar der LCSN-Vektor funktionell ist, jedoch die CYP2B1-Expression in den pankreatischen

Tumorzelllinien weniger effizient ist als in Mausfibroblasten. Da die Aktivität auch in den murinen Tumorzelllinien (PAN02) gering ist, liegt der Schluß nahe, dass die Aktivität des MLV-Promoters weniger von der Spezies sondern vom Gewebetyp abhängt.

H Kombination von endogener und exogener IFO-Aktivierung

Zur Untersuchung, ob ein additiver therapeutischer Effekt durch intrazelluläre IFO-Aktivierung (endogene Aktivierung) in Kombination mit einem *bystander effect* (exogene Aktivierung) erreicht werden kann, wurden 2×10^4 Reporterzellen (PANC1 bzw. PANCcypI) und auf das darüberliegende *transwell* 2×10^4 C8III-1 bzw. CrFKwt-Zellen ausgesät (2.2.3 C Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden Zellen). Am folgenden Tag wurde IFO (0 mM, 0,5 mM, 1 mM und 2 mM) zugegeben und am siebten Tag ausschließlich die Zahl der Reporterzellen (PANC1 bzw. PANCcypI) bestimmt.

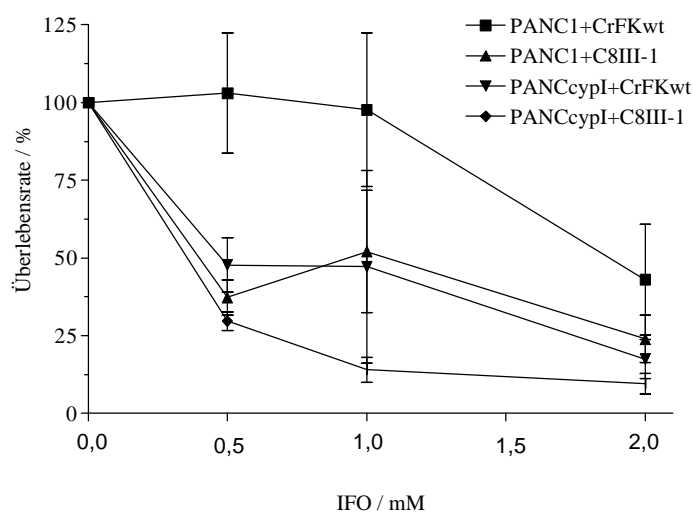


Abbildung 59: Additiver therapeutischer Effekt nach retroviralem Gentransfer

Reporterzellen (PANC1 oder PANCcypI) wurden getrennt durch eine *transwell*-Membran mit C8III-1 bzw. CrFKwt-Zellen in Gegenwart von 0, 0,5, 1 oder 2 mM IFO kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsiniert und gezählt. Angegeben ist die Überlebensrate als Quotient zwischen IFO-behandelten und -unbehandelten Zellen.

Bei diesem Kokultivierungsexperiment zeigten alle Ansätze, in denen zumindest eine Zellpopulation (im *transwell* oder der Schale) CYP2B1-exprimierte, nach Zugabe von IFO einen deutlichen toxischen Effekt (vgl. Abbildung 59,). Dabei war die IFO-Wirkung bei den Gruppen, in denen IFO entweder exogen (PANC1 + C8III-1) oder endogen (PANCcypI + CrFKwt) aktiviert wurde, ähnlich stark ausgeprägt (37 % versus 47 % bei 0,5 mM, 52 % versus

47 % bei 1 mM und 24 % versus 17 % bei 2 mM) (vgl. Abbildung 59, und). Fand die IFO-Aktivierung sowohl endogen als auch exogen statt (vgl. Abbildung 59,), trat bei allen IFO-Konzentrationen ein additiver toxischer Effekt auf (29 % bei 0,5 mM, 14 % bei 1 mM und 9 % bei 2 mM), der besonders deutlich bei 1 mM IFO sichtbar wurde. Somit wurde im Vergleich zu einer ausschließlich endogenen Aktivierung (PANCcypI + CrFKwt,), die mit einer Verdopplung der IFO-Toxizität verbunden war, die IFO-Toxizität bei Kombination von endogener und exogener Aktivierung (PANCcypI + C8III-1,) um den Faktor 7 verstärkt. Bei dem bereits vorher beschriebenen Experiment zur Untersuchung einer IFO-Toxizität nach endogener CYP2B1-vermittelter Aktivierung (vgl. Abbildung 56) wurde für PANCcypI-Zellen eine 1,6fache Verstärkung gemessen. Dieses Ergebnis konnte unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität in diesem ähnlichen Experiment (vgl. Abbildung 59) mit einem Faktor von 2 bestätigt werden.

Dies zeigt, dass eine zusätzliche endogene CYP2B-vermittelte IFO-Aktivierung das bisherige Konzept einer zellvermittelten Therapie mit exogener IFO-Aktivierung zumindest *in vitro* verbessern kann (vgl. Tabelle 5).

Kombination	PANC1 + CrFKwt	PANC1 + C8III-1	PANCcypI + CrFKwt	PANCcypI + C8III-1
Merkmal	keine Aktivierung	<i>bystander effect</i>	intrazelluläre IFO-Aktivierung	<i>bystander effect</i> + intrazelluläre IFO-Aktivierung
IC ₅₀ /mM	2	0,5 ≤ IC ₅₀ ≤ 1	0,5 ≤ IC ₅₀ ≤ 1	< 0,5

Tabelle 5 IC₅₀ von PANC1-Zellen bei intrazellulärer IFO-Aktivierung, *bystander effect* oder bei Kombination von beidem.

3.4.2 Wirksamkeit der Retrovirus vermittelten Aktivierung von IFO *in vivo*

A Etablierung eines geeigneten Tiermodells

Verschiedene murine Modelle für Pankreaskarzinome wurden an jeweils zwei Mäusen (Scid/bg oder C57Black/6) exemplarisch getestet. Dazu wurden 5 x 10⁶ Zellen (PAN02 oder PACA44) subkutan in die rechte Flanke injiziert und der Verlauf des Tumorwachstum, sowie das Allgemeinbefinden der Maus beurteilt. Erreichte der Primärtumor einen Durchmesser von 10 mm oder zeigte die Maus Anomalien in ihrem Verhalten, wurde sie getötet, sezirt und

makroskopisch untersucht.

Scid/bg-Mäuse besitzen kein funktionelles Immunsystem und zeigen daher auch keine Abstoßungsreaktion nach Transplantation fremder Zellen. Sind dies transformierte Zellen, führen sie in der Regel zur Bildung eines Tumors. Die Zellen können dabei von einer anderen Spezies (Xenograft) oder von einem anderen Mausstamm (Allograft) stammen. Eine andere Möglichkeit ist die Übertragung von Zellen, die vom gleichen Individuum oder der gleichen Mauslinie abstammen (Syngraft). Da es sich hierbei um „eigenes“ Gewebe handelt, wird das Gewebe auch nicht von immunkompetenten Tieren abgestoßen.

Modell	Mauslinie	Zelllinie	Typ des Modells	Charakteristika
1	Scid/bg (immun- defizient)	PACA44	Xenograft	schnelles Wachstum des Primärtumors, nicht invasiv, keine sichtbaren Metastasen
2	Scid/bg (immun- defizient)	PAN02	Allograft	unauffälliges Wachstum des Primärtumors, sehr invasiv, sofort metastasierend
3	C57Black/6 (immun- kompetent)	PAN02	Syngraft	langsames Wachstum des Primärtumors, später invasiv und metastasierend

Tabelle 6: Übersicht zu den getesteten Tiermodellen

Als Träger für pankreatische Tumoren standen Scid/bg und C57Black/6-Mäuse zur Verfügung. Zur Induktion von Tumoren in Scid/bg-Mäusen wurden entweder humane PACA44-Zellen (Xenograft) oder murine PAN02-Zellen (Allograft) verwendet. PAN02-Zellen bildeten in C57Black/6-Mäuse einen syngenen Tumor (Syngraft). Zur Beurteilung des Tumorstadiums wurden 5×10^6 -Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert und die Tumorentwicklung in den darauffolgenden Tagen beobachtet. Sobald der Tumor eine Größe von 10 mm Durchmesser erreichte oder die Maus Anomalien in ihrem Verhalten zeigte, wurde sie getötet, sezirt und makroskopisch untersucht.

Ein Beispiel für ein xenogenes Modell ist die Injektion von humanen PACA44-Zellen in Scid/bg-Mäuse. Ein derartiges Transplantationsexperiment führte zur schnellen Bildung eines Primärtumors. Dieser war von der Konsistenz her weich und bei der Sektion leicht vom umgebenden Gewebe zu trennen. Bei genauerer makroskopischer Untersuchung der einzelnen Organe konnten keine Metastasen festgestellt werden (vgl. Tabelle 6, Modell 1). Murine und damit allogene PAN02-Zellen bildeten in Scid/bg-Mäusen im Gegensatz einen langsam wachsenden Primärtumor. Schon bei einem Tumordurchmesser von ca. 2-3 mm verhielten sich die Mäuse untypisch. Die anschließende Sektion zeigte, dass der Primärtumor in das umgebende

Gewebe eingedrungen und untrennbar mit ihm verwachsen war. Bei der anschließenden makroskopischen Untersuchung konnten in fast allen Organen Metastasen festgestellt werden (vgl. Tabelle 6, Modell 2). Ein Syngraft von PAN02-Zellen auf C57Black/6-Mäusen induzierte einen mäßig wachsenden Primärtumor, der invasiv in das anliegenden Gewebe einwuchs. Bis zu einer Größe von 10 mm zeigten die Mäuse kein wesentliches symptomatisches Verhalten. Allerdings erwies sich dieser Tumor bei der anschließenden Sektion auch als metastasierend (vgl. Tabelle 6, Modell 3). Da dieses syngene Tumormodell der klinischen Situation am meisten ähnelt, wurde es für weitere Untersuchungen gewählt.

B Wachstumscharakteristik von PAN02-Tumoren in C57Black/6-Mäusen

Um nach der Injektion von PAN02-Zellen in C57/Black6-Mäusen die Tumorentwicklung zu charakterisieren, wurden bei jeweils zwei C57Black/6-Mäusen $2,5 \times 10^5$, 1×10^6 oder 5×10^6 PAN02-Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert und das Tumorstadium beobachtet. In regelmäßigen Abständen wurde der Tumor abgetastet und der mittlere Durchmesser bestimmt (vgl. Abbildung 60).

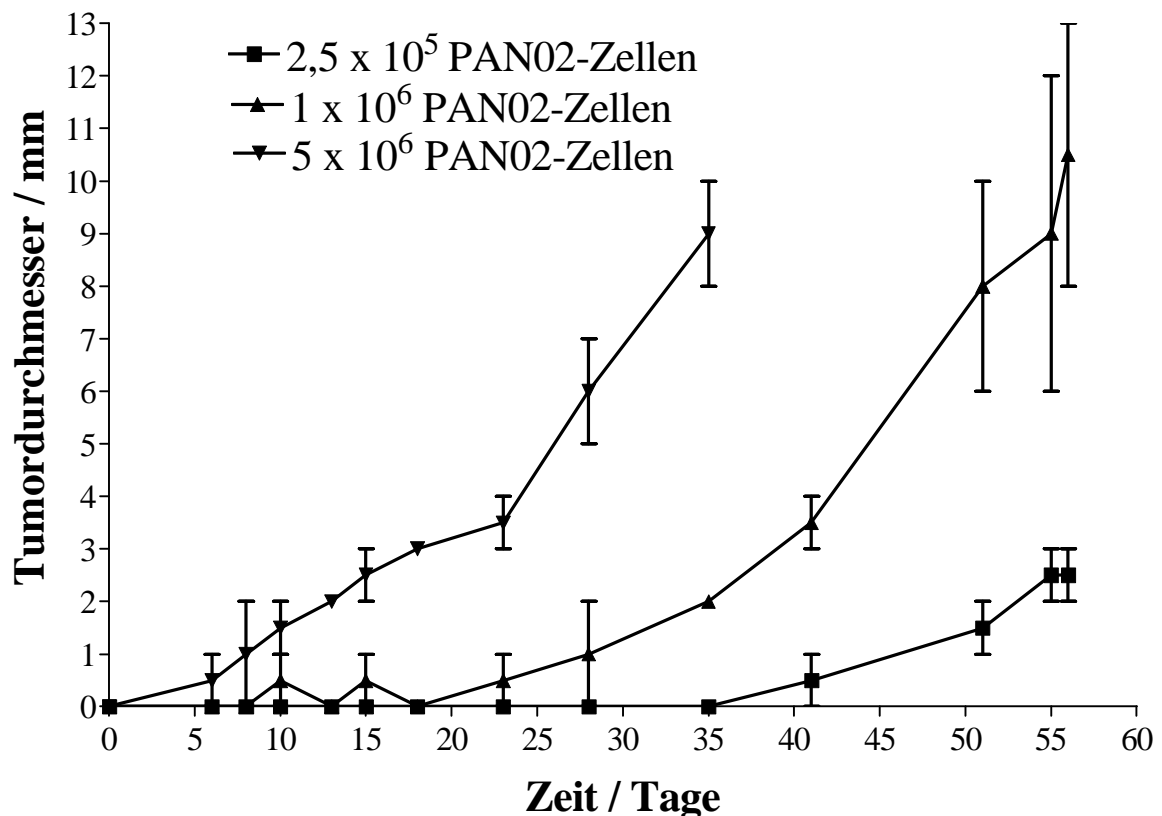


Abbildung 60: Tumorstadium in C57Black/6-Mäusen nach Injektion von PAN02-Zellen

$2,5 \times 10^5$, 1×10^6 bzw. 5×10^6 PAN02-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von je 2 C57Black/6-Mäusen injiziert. Das Tumorstadium wurde in regelmäßigen Abständen durch Abtasten der Tumoren bestimmt.

An allen Injektionsstellen kam es zur Tumorbildung. Jedoch war der Zeitpunkt bis zum ersten tastbaren Tumor deutlich abhängig von der Anzahl der injizierten Zellen. Sobald aber ein Primärtumor eine Größe von 1 bis 2 mm überschritten hatte, entwickelte er sich unabhängig von der injizierten Zellzahl mit der gleichen Geschwindigkeit. Bei Injektion von 5×10^6 Zellen war der Tumor bereits unmittelbar nach der Injektion tastbar und hatte nach ca. 25 Tagen einen mittleren Durchmesser von 5 mm (). Bei 1×10^6 Zellen war der Tumor nach dem 20. Tag tastbar und erreichte nach ca. 43 Tagen einen Durchmesser von 5 mm (). Die Inokulation von $2,5 \times 10^5$ Zellen () erzeugte einen tastbaren Primärtumor nach 40 Tagen, wobei das Experiment nach dem 56. Tag abgebrochen wurde. Zu diesem Zeitpunkt hatte der Tumor einen mittleren Durchmesser von 2,5 mm.

Für die weiteren Experimente erschien die Injektion von 5×10^6 Zellen am sinnvollsten, da dadurch eine flexible Planung und Gestaltung der weiteren Experimente möglich war.

C Virusvermittelte Aktivierung von Ifosfamid in C57Black/6-Mäusen

In *in vitro*-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Population von PAN02-Zellen, die nach einer Infektion mit dem retroviralen Vektor LCSN CYP2B1-exprimiert (PANcypI), nach Zugabe von IFO eine geringere Überlebensrate besitzt als die parentale Zelllinie (vgl. 3.4.1 E Toxizität von Ifosfamid auf pankreatische Tumorzellen nach endogener Aktivierung).

Um die Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen, wurden 5×10^6 PANcypI-Zellen in die rechte und die linke Flanke von jeweils 5 Mäusen injiziert. In fünf weitere Mäuse wurden je die gleiche Anzahl an parentalen (PAN02) oder LCSN infizierten PAN02-Zellen (PANcypI) inokuliert. Weiterhin wurden PAN02-Zellen, die vorher stabil mit Vektor LXSNI infiziert wurden (PANlxsni) wie beschrieben inokuliert. Der Vektor LXSNI ist identisch zum Vektor LCSN, besitzt jedoch kein CYP2B1 Gen. Alle drei Tage wurde der mittlere Tumordurchmesser durch Abtasten der Tumoren in der Flanke gemessen (vgl. Abbildung 61). Sobald der Tumor einen durchschnittlichen Durchmesser von knapp 1 mm besaß (vgl. Abbildung 61, $t=0$) wurde den Mäusen IFO (100 mg/kg) und als uroprotektives Medikament MESNA (50 mg/kg) in 0,2 ml PBS jeden dritten Tag intraperitoneal verabreicht. Parallel wurde jeder Maus zeitgleich 0,2 ml PBS injiziert.

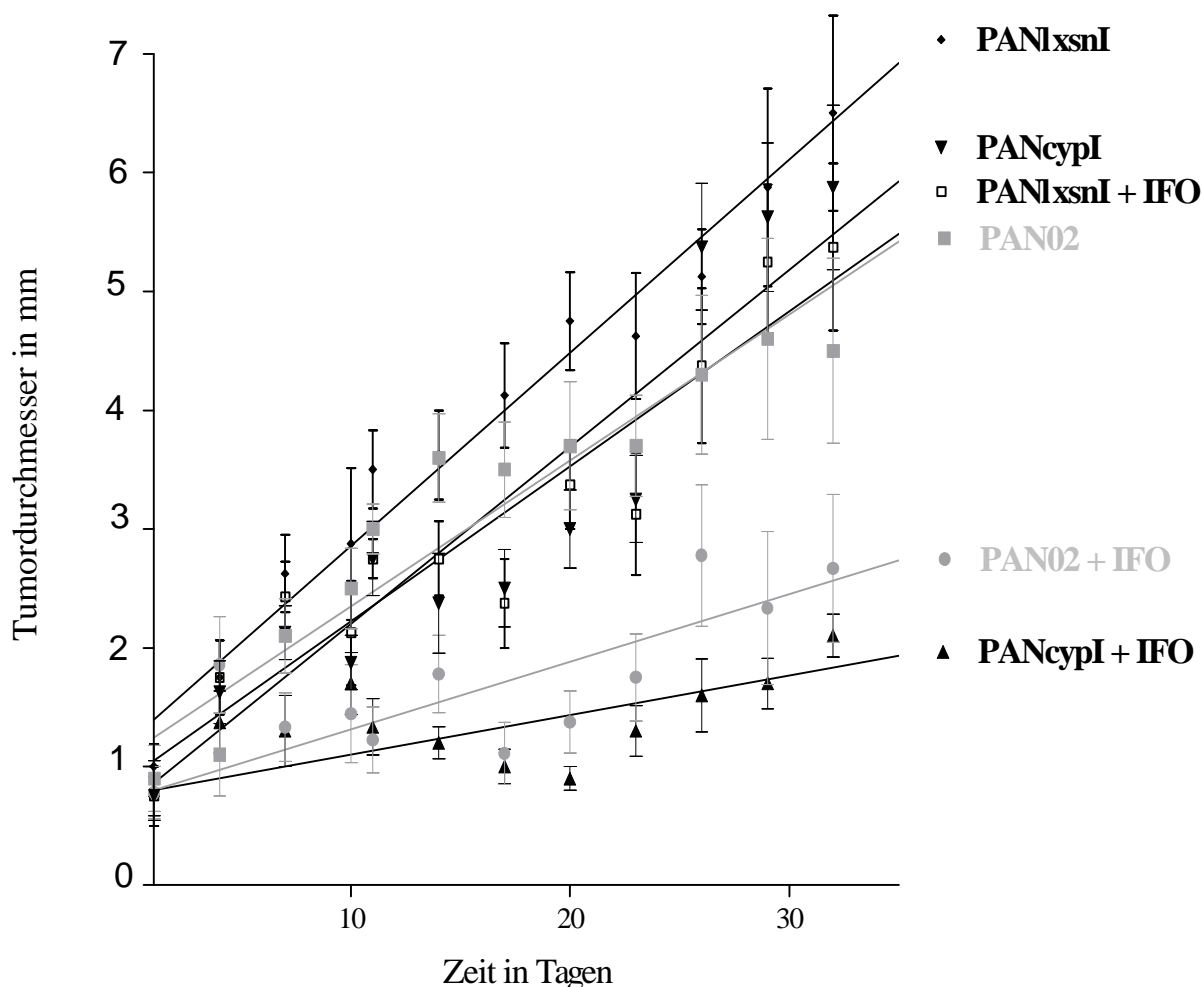


Abbildung 61: Wachstumskinetik CYP2B1-exprimierender PAN02-Tumoren nach IFO-Therapie

5×10^6 LCSN (PANcypI) oder LXS (PANlxsnI) stabil infizierte bzw. parentale PAN02-Zellen wurden subkutan in die linke und rechte Flanke von C57Black/6-Mäusen injiziert. Bei einem Tumordurchmesser von knapp 1 mm wurde eine Hälfte der Mäuse mit PBS und die andere Hälfte mit IFO/MESNA therapiert. Alle drei Tage wurde der Durchmesser der Tumoren bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Das mittlere Tumorwachstum wurde mittels eines Computerprogramms (Graph Pad Prism 3.0) berechnet.

Die Tumoren wuchsen zunehmend invasiv, weswegen es teilweise unmöglich war, den Tumor exakt abzutasten. Aus diesem Grund wurden nur klar abgrenzbare Tumoren in die Messung aufgenommen. Führte ein invasives Tumorwachstum zu ungenauen Messungen, wurde die zuletzt bestimmte Tumorgöße auch für die weiteren Untersuchungstage angenommen. Genauso wurde auch mit den Tumoren verfahren, wenn die Maus, aufgrund wesentlicher Beeinträchtigung der Gesundheit euthanasiert werden musste. Mit dieser Methode erhält man zwar nur eine Annäherung an die wirkliche Situation, jedoch scheint sie im Vergleich mit anderen Modellen der Wirklichkeit am ehesten zu entsprechen (vgl. Diskussion: 4.2.3. Wirkung einer Retrovirus-vermittelten CYP2B1/IFO-Behandlung *in vivo*). Am Ende des Experiments wurden alle Mäuse

getötet. Mit den gewonnenen Daten wurde mit einem Computerprogramm (Graph Pad Prism 3.0) die durchschnittliche Steigung der Tumorwachstumskurven errechnet.

Alle Mäuse entwickelten in den Bereichen, in denen die Tumorzellen injiziert wurden, Tumoren, die mit zunehmendem Durchmesser die Haut durchdrangen und mit dem umliegenden Gewebe verwachsen (vgl. Abbildung 61). Teilweise traten in Tumoren mit einem Durchmesser von mehr als 2 mm nekrotische Tumorbereiche auf, die wahrscheinlich auf eine mangelnde Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes zurückzuführen waren. Die Tumoren der PBS-behandelten Kontrollgruppe wiesen eine mittlere Wachstumsrate von 0,123 mm/d für PAN02-Zellen (), von 0,16 mm/d für PANlxsnI-Zellen () und von 0,149 mm/d bei PANcypI-Zellen () auf. In der IFO/MESNA behandelten Gruppe lag das Wachstum bei 0,057 mm/d für die PAN02-Tumoren (●), bei 0,131 für PANlxsnI-Tumoren () und bei 0,033 mm/d für die PANcypI-Tumoren () (vgl. Tabelle 7).

	PANlxsnI	PANcypI	PAN02
mit PBS	0,16 mm/d	0,149 mm/d	0,123 mm/d
mit IFO	0,131 mm/d	0,033 mm/d	0,057 mm/d
Verhältnis PBS/IFO	1,2	4,5	2,1

Tabelle 7: Tumorwachstum von PAN02, PANlxsnI und PANcypI-Tumoren nach PBS- und IFO/MESNA-Behandlung

Dieses Experiment zeigt, dass Zellen, die vorher *in vitro* infiziert wurden (PANlxsnI und PANcypI) ohne IFO-Behandlung schneller Tumoren bildeten als die parentalen Zellen (PAN02) (vgl. Abbildung 61, und). Durch Zugabe von IFO konnte das Wachstum von allen Tumoren verlangsamt werden. Jedoch war der therapeutische Effekt bei PANlxsnI-Tumoren nur sehr gering (1,2fache Verlangsamung des Tumorwachstums). Bei den parentalen Zellen (PAN02) trat eine 2,1fache Verlangsamung auf. Am größten war der therapeutische Effekt bei den CYP2B1-exprimierenden PANcypI-Tumoren. In diesem Fall war die Wachstumsverlangsamung 4,5fach. Auch waren die gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Mäuse in der PANcypI/IFO-Gruppe am geringsten, so dass die erste Maus erst am vorletzten Meßpunkt getötet werden musste. Zu diesem Zeitpunkt waren in den anderen Gruppen schon mindestens zwei Mäuse euthanasiert worden.

Sowohl die PANlxsnI- als auch die PANcypI-Zellen wurden vor der Injektion in die Mäuse *in vitro* infiziert und selektiert. Es ist daher möglich, dass sie durch die *in vitro* Selektion sich

veränderten, so dass sie bei einer *in vivo*-IFO-Behandlung sich anders verhalten, als die nicht transduzierten und selektionierten PAN02-Zellen. Zur Bewertung der intratumoralen CYP2B1 abhängigen IFO-Aktivierung sollten daher in erste Linie die mit dem leeren Vektor infizierten Zellen (PANlxsnl) mit den CYP2B1 transduzierten PAN02-Zellen (PANcypI) verglichen werden (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 61, und).

Insgesamt scheint eine IFO-Behandlung, wahrscheinlich nach Aktivierung der Prodroge in der Leber, das Tumorwachstums zu reduzieren, jedoch kann durch eine intratumorale CYP2B1-Expression das Tumorwachstum auf weniger als ein Viertel der Wachstumsgeschwindigkeit unbehandelter Tumoren gesenkt werden. Somit kann zwar die therapierte Maus nicht komplett geheilt werden, jedoch wird das Tumorwachstum gebremst und somit die Überlebenszeit verlängert.

4 Diskussion

4.1 Zelltherapeutische Behandlung

4.1.1 Etablierung und Analyse CYP2B1 produzierender Zellklone

Zur genterapeutischen Behandlung von Tumoren kommt die Verwendung von immunstimulatorischen, tumorsuppressiven, Ribozym-, *antisense*- oder Suizidgenen in Frage. Mit einer antitumorigenen Stimulierung des Immunsystems sollen nicht immunogene Tumorzellen gegenüber diesem sichtbar gemacht werden. In klinischen Studien konnte bereits demonstriert werden, dass die Aktivierung des Immunsystems gegen bestimmte Tumorantigene einen therapeutischen Vorteil bringen kann, jedoch entwickeln Tumorzellen häufig Abwehrmechanismen, wie z.B. durch eine unzureichende Antigenpräsentation oder eine Hemmung der durch T-Zellen induzierten Apoptose (Irmeler et al., 1997; Kataoka et al., 1998).

Tumorsuppressorgene können nur eingesetzt werden, wenn das betreffende Gen in den Tumorzellen auch mutiert ist. Es wurde für das sehr häufig mutierte p53 in vielen präklinischen und klinischen Studien ein therapeutischer Effekt nach dem Einbringen von wildtyp p53 beobachtet (Pearson et al., 1998; Swisher et al., 1999), jedoch gibt es auch Studien, in denen keine Wirkung von p53 beobachtet wurde (Vinyals et al., 1999). Abgesehen davon ist noch fraglich, wie stark der *bystander effect* einer p53-vermittelten Therapie ist (Rizk et al., 1999). Manche Untersuchungen beschreiben einen *bystander effect*, der durch freigesetzte anti-proliferative Proteine oder durch eine Hemmung der Vaskularisierung im Tumor induziert wird (Frank et al., 1998; Bouvet et al., 1998). Jedoch scheint dieser Effekt nur schwach zu sein, so dass das p53-Gen in fast jeder Tumorzelle exprimiert werden muß.

Antisense- und Ribozymgene, z.B. gegen *ras*, können sich nur gegen einzelne Onkogene richten. Sie werden vor allem eingesetzt, wenn Genprodukte in Folge einer Mutation überproduziert werden (Phylactou et al., 1998). Da es bei dieser Therapie keinen *bystander effect* gibt, muss jede Zelle das *antisense*- bzw. Ribozymkonstrukt erhalten.

Suizidgene, besonders das Gen der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus (*HSVtk*) werden neben den immunstimulatorischen Genen am häufigsten für die genterapeutische Krebsbehandlung herangezogen. Ihr Mechanismus ist weitgehend unabhängig von den mutierten Genen und ist bei den meisten Tumorarten wirksam. Jedoch gibt es auch hier Resistenzmechanismen, die eine cytotoxische Wirkung verringern oder verhindern können. Einer der häufigsten Resistenzmechanismen ist eine Hochregulierung der Expression des *multidrug*

resistance (mdr)1-Gens. Das Genprodukt (P-Protein) vermittelt den aktiven Export einer Vielzahl von cytotoxischen Drogen aus der Zelle (Fine, 1988; Hesdorffer et al., 1994; Roninson et al., 1986). Bei vielen Suizidsystemen ist bereits ein *bystander effect* beschrieben worden. Das bedeutet, dass das Suizidgen nicht in jede Tumorzelle eingebracht werden muss. Jedoch besteht beim HSVtk-Systems z.B. eine Abhängigkeit des *bystander effects* von interzellulären *gap junctions*, die vor allem aus Connexin bestehen. Eine verminderte Expression von Connexin unterdrückt den interzellulären Austausch von aktivierten Metaboliten und damit eine Wirkung auf nicht HSVtk-exprimierende Zellen (Yang et al., 1998). Falls ein Suizidgen aus zum Menschen entfernt verwandten Organismen isoliert wurde, besteht die Möglichkeit einer Immunreaktion gegen das Genprodukt, wodurch die exprimierende Zellen unter Umständen eliminiert wird, bevor sie die aktivierte Droge an das umgebende Tumorgewebe abgeben kann. Dieses Risiko besteht vor allem bei der von Pilzen oder E.coli stammenden Cytosindeaminase, der viralen HSVtk sowie der bakteriellen Nitroreduktase (Waxman et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Suizidgen die von der Ratte stammende cDNA des Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1)-Gens verwendet. Obwohl es mehrere hundert zur Cytochrom P450-Familie gehörende Isozyme gibt, können nur die humanen Isoformen 2C5, 2C11, sowie die Enzymsubfamilien 2B und 3A Oxazaphosphorine aktivieren (vgl. Abbildung 62). Die Isoformen 2C5 und 2C11 haben eine hohe Umsetzungsrate bei niedrigen Konzentrationen der Droge, jedoch ist die enzymatische Umsetzungsrate schnell gesättigt (Chang et al., 1993). Bei höheren Konzentrationen, wie sie bei einer systemischen IFO-Behandlung auftreten, sind vor allem die 3A und 2B-Isoformen für die Hydroxylierung und damit verbundene Aktivierung der Droge verantwortlich (Chang et al., 1993). Dabei ist das humane CYP3A4 besonders wirksam bei der Umsetzung von IFO (Walker et al., 1994), jedoch tritt zur gewünschten Hydroxylierung eine starke unerwünschte N-Dechloroethylierung auf, dessen Produkt Chloroacetaldehyd bei hoher Konzentration Schädigungen des Nervensystems oder der Nieren hervorrufen kann (Yu et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist die enzymatische Aktivität von CYP2B1 fast nur auf der Umsetzung der zum therapeutisch wirksamen Phosphoramidmustard führenden Hydroxylierung konzentriert (Yu et al., 1999). Ähnlich verhält es sich mit der humanen Isoform CYP2B6, die allerdings zu Beginn dieser Arbeit nicht so gut charakterisiert war wie das von der Ratte stammende CYP2B1 und daher auch nicht verwendet wurde (Code et al., 1997; Jounaidi et al., 1998).

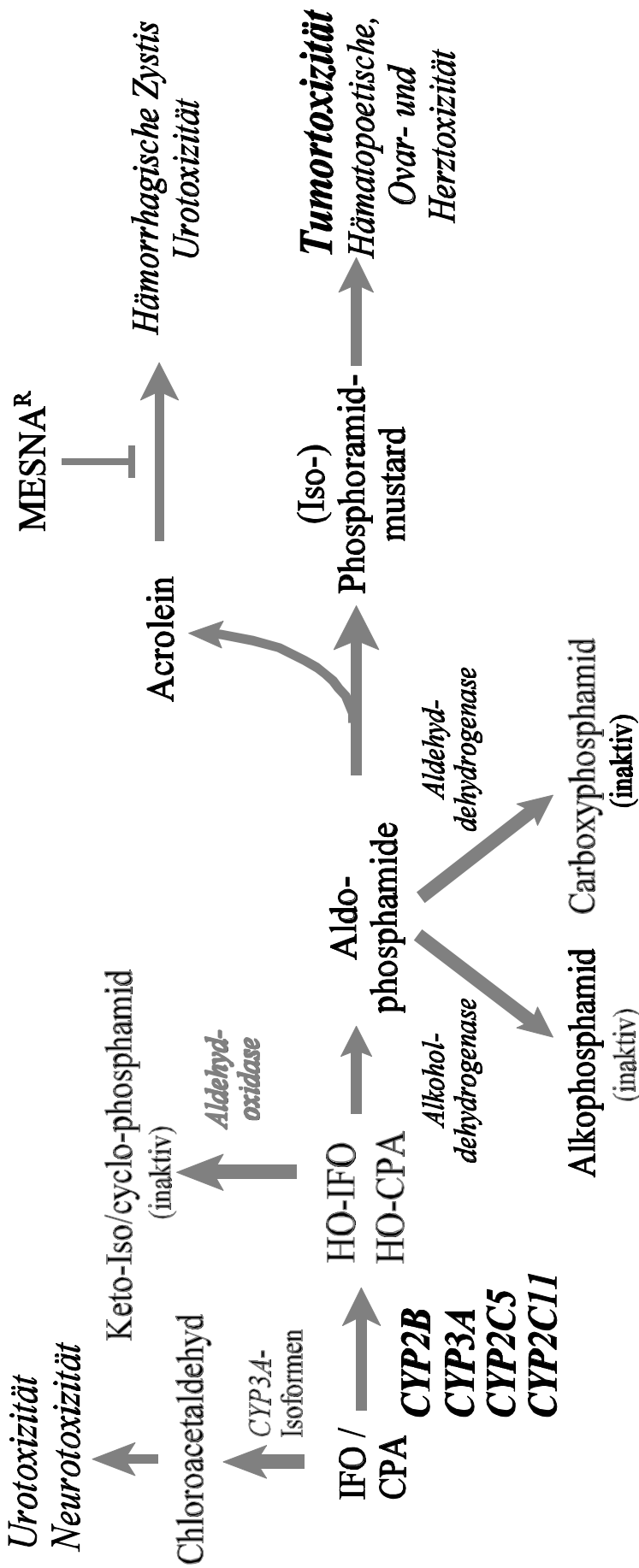


Abbildung 62: Metabolismus von IFO und CPA in der Leber

IFO und CPA können entweder durch Cytochrom 3A-Isoformen zu Chloroacetaldehyd umgesetzt werden, welches Neuro- und Urotoxizität hervorrufen kann. Alternativ kann IFO und CPA durch eine Mehrzahl von Isozymen (2B1, 3A4, 2C5, 2C11) am C4-Atom hydroxyliert werden. Dieses kann entweder durch die Aldehyddehydrogenase inaktiviert werden oder sich intramolekular zum Aldophosphamid umlagern. Das Aldophosphamid kann durch die Aldehyd- oder Alkoholdehydrogenase inaktiviert werden. Wird es nicht inaktiviert, zerfällt es in (Iso-)Phosphoramidmustard und Acrolein (Low et al., 1982). Vor allem (Iso-)Phosphoramidmustard wirkt auf den Tumor zytostatisch, kann aber in hohen Dosen hämatopoetische, Ovar- und Herztoxicität hervorrufen. Acrolein verursacht Nebenwirkungen wie hämorrhagische Cystis und Urotoxizität. Der schädigenden Wirkung von Acrolein kann durch Verwendung von MESNA^R vorgebeugt werden. Seine Sulphydrylgruppe reagiert mit dem toxischen Acrolein und inaktiviert es.

Bevor aus dem hydroxylierten Oxazaphosphorin das therapeutisch wirksame Phosphoramidmustard entstehen kann (vgl. Abbildung 62), besteht jedoch die Möglichkeit, dass die hydroxylierte Form in der Leberzelle durch die Aldehydoxidase inaktiviert wird. Auch die Zwischenform Aldophosphamid kann durch die hepatischen Enzyme Alkohol- oder Aldehyddehydrogenase inaktiviert werden (Fleming, 1997). Acrolein, das als Nebenprodukt von Phosphoramidmustard entsteht, hat kaum einen therapeutischen Nutzen und ist in hoher Konzentration hauptsächlich für unerwünschte Nebenwirkungen wie blutgefüllte Blasenbildung (hämorrhagische Cystis) und eine Schädigung der Blase (Urotoxizität) verantwortlich. Phosphoramidmustard verursacht durch Alkylierung der DNA und die damit verbundenen Bildung von *interstrand cross links* die cytostatische Wirkung auf den Tumor. Jedoch kann Phosphoramidmustard bei hohen systemischen Konzentrationen auch toxisch auf das hämatopoetische System und die Ovarien wirken. Durch eine tumorspezifische CYP2B1-Expression wird die intratumorale Konzentration der aktiven Metaboliten erhöht. Gleichzeitig wird eine unerwünschte Inaktivierung oder Metabolisierung durch hepatozelluläre Enzyme reduziert und die damit verbundenen systemischen Nebenwirkungen verringert.

Um eine optimale Expression des therapeutischen Gens zu erhalten, wurde es in einen Expressionsvektor mit dem starken, konstitutiven *enhancer*/frühen Promotor des Cytomegalievirus einkloniert (Boshart et al., 1985; Jeang et al., 1984). Dieser Promotor ist einer der stärksten Promotoren, die in eukaryonten Zellen getestet wurden (Martin-Gallardo et al., 1988). Die CYP2B1-Expressionskassette enthält stromabwärts von der CYP2B1-cDNA ein Polyadenylierungssignal des *bovine growth hormone* (bGH)-Gens. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich damit die Expression eines Gens um das dreifache steigern lässt und es in dieser Funktion dem Polyadenylierungssignal des *simian virus* (SV) 40 überlegen ist (Pfarr et al., 1986).

Die am häufigsten verwendete Methode zum Transfer von therapeutische Genen ist die Verwendung von *ex vivo* gentechnisch veränderten Zellen, die nach dem Einschleusen nicht nur die gewünschte genetische Information in den Körper bringen, sondern zusätzlich auch die Maschinerie zur Expression dieser Gene. Mit dieser Methode kann sehr effizient das Gen an den Wirkungsort übertragen werden, ohne mit dem Risiko einer ungewollten Expression in den falschen Zellen verbunden zu sein.

Der klonierte CYP2B1-Expressionsvektor wurde daher in CrFK- und in 293-Zellen transfiziert. Ursprünglich wurden die Experimente mit CrFK-Zellen begonnen, da diese generell eine hohe Expression zeigen. Für die geplante Anwendung beim Menschen wurden die Experimente mit 293-Zellen durchgeführt. Diese humanen embryonischen Nierenzellen sind durch Einbringen eines Fragments des Adenovirus (ADV) Typ 5 mit der früh im viralen Lebenszyklus exprimierten Region E1 transformiert worden (Graham et al., 1977; Graham et al., 1974) und lassen sich dadurch *in vitro* vermehren. 293-Zellen sind humanen Ursprungs und werden daher nicht durch das humane Komplementsystem erkannt und angegriffen. Zusätzlich wurde die verwendete

Charge von der Firma Q-One (Glasgow) als frei von human-pathogenen Organismen zertifiziert. Beim Transfer dieser allogenen Zellen in den Patienten besteht auch im Gegensatz zu xenogenem Gewebe (Xenograft) keine Gefahr einer Freisetzung von animalischen endogenen Retroviren, die im neuen Organismus unter Umständen pathologisch werden können (White and Nicholson, 1999). Von Bedeutung ist weiterhin die hohe Aktivität des CMV-Promotors in 293-Zellen (Wilkinson and Akrigg, 1992). Um die Klone mit besonders hoher CYP2B1-Expression isolieren zu können, wurden die mit dem CYP2B1-Expressionvektor transfizierten CrFK- und 293-Zellen mittels Neomycin selektiert und einzelne Klone isoliert. Die PCR zum Nachweis der CMV-CYP2B1-Expressionskassette erbrachte in den beiden untersuchten CrFK-Klonen sowie in fast allen 293-Klonen ein spezifisches Signal, das das Vorhandensein der Expressionskassette anzeigt. Die Funktionalität der CMV-CYP2B1-Expressionskassette konnte bei den beiden CrFK-Klonen durch den Nachweis des CYP2B1-Proteins mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden. Das produzierte Protein zeigte das gleiche Laufverhalten wie das CYP2B1-Protein, das in Form von Lebermikrosomen aufgetragen wurde. Die CYP2B1-Synthese des Klons C8III-1 war höher als beim Klon C8III-2. Mit einem weiteren Nachweissystem konnte als Ersatz für eine IFO-Hydroxylierung die CYP2B1 vermittelte Dealkylierung von 7-Pentoxyresorufin zu Resorufin bestimmt werden. Dabei konnte das Ergebnis der Western Blot Analyse bestätigt werden. Die Umsetzungsrate war beim Klon C8III-1 (535 pmol/mg Protein) 31 mal höher als beim Klon C8III-2. Noch höher als beim Klon C8III-1 war die Resorufin-O-Dealkylase-Aktivität bei den Zellklonen, die auf 293-Zellen beruhen. Da die Resorufinproduktion nicht nur die Präsenz des synthetisierten Proteins, sondern gleichzeitig auch dessen Funktionalität demonstriert, wurde bei den 293-Zellen zur Reihenuntersuchung kein Western Blot, sondern nur der Resorufintest durchgeführt. Alle 293-Klone, die die CMV-CYP2B1-Expressionskassette PCR enthielten, waren in der Lage, 7-Pentoxyresorufin zu dealkylieren. Dabei hatte der 293-Klon 22P1G die höchste enzymatische Aktivität (4750 pmol/mg Protein) was der 26fachen Aktivität von kultivierten Hepatozyten entsprach (Donato et al., 1992). Diese starke Aktivität läßt sich zum Teil auf die hohe Aktivität des CMV-Promotors in 293-Zellen zurückführen, wobei jedoch das Vorliegen von mehreren Kopien der CMV-CYP2B1-Expressionskassette auch einen Einfluß auf die Expression nehmen kann. Eine Southern Blot-Analyse ergab, dass die CMV-CYP2B1-Expressionskassette dreimal in das Genom integriert vorliegt, wobei weiterführende Untersuchungen der Firma Bavarian Nordic zeigten, dass es sich nur um zwei Integrationsstellen handelte, wobei die CMV-CYP2B1-Expressionskassette an einem Locus in Tandemformation vorliegt (Frank Heinemann, persönliche Mitteilung). Somit liegen insgesamt drei funktionelle CMV-CYP2B1-Expressionskassetten vor. Interessanterweise jedoch scheint die enzymatische Aktivität der Zellen nicht unbedingt mit dem Gehalt von CYP2B1 in der Zelle zu korrelieren. So war zwar die Resorufin-O-Dealkylaseaktivität von 22P1G-Zellen neunmal höher, als bei C8III-1-Zellen obwohl bei einem vergleichenden Western Blot die 22P1G-Bande nur geringfügig stärker war als bei C8III-1-Zellen. Es scheinen daher andere Faktoren wie z.B. die Aktivität der Cytochrom P450-Reduktase (vgl. Abbildung 65) eine entscheidende Rolle für die CYP2B1-Aktivität zu spielen (Huang et al., 2000; Jounaidi and Waxman, 2000; Waxman et al., 1999).

4.1.2 Umsetzung von Oxazaphosphorinen durch CYP2B1

A Suizideffekte

Der erste Nachweis der Umsetzung von Oxazaphosphorinen erfolgte durch Kultivierung von C8III-1 und C8III-2-Zellen in Gegenwart von 1 mM Cyclophosphamid bzw. 2 mM Ifosfamid. Diese Konzentrationen wurden bereits als ausreichend toxisch, aber nur gering toxisch ohne Aktivierung beschrieben (Chen et al., 1996). Bei dieser Konzentration trat ein starker cytotoxischer Effekt bei den CYP2B1-exprimierenden Zellklone C8III-1 und C8III-2 auf. Erst in späteren Experimenten stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu publizierten Daten diese IFO-Konzentration auch ohne Aktivierung toxisch wirkt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die C8III-1-Zellen im Vergleich mit CrFKwt-Zellen bei verschiedenen IFO-Konzentrationen kultiviert. Bei einer einfachen Giemsa-Anfärbung der am Ende des Experimentes verbleibenden Zellen trat bei den CYP2B1-exprimierenden Zellen ab 0,25 mM ein sichtbarer toxischer Effekt auf, bei CrFKwt-Zellen jedoch erst bei 5 mM. Da die Färbung von Zellen nicht quantitativ ist, wurde das Experiment wiederholt und die Zellen am Ende des Experiments gezählt. Bei dieser Quantifizierung wurde deutlich, dass IFO vor allem bei Konzentrationen über 1 mM auch ohne CYP2B1-Expression einen geringen cytotoxischen Effekt hat. Dieses Phänomen beruht evtl. auf der langsamen Hydrolyse von IFO, welche z.B. von anorganischem Phosphat katalysiert wird und bei der alkylierendes Chloroethylamin entsteht (Gilard et al., 1999; Penketh et al., 2000; Sanderson and Shield, 1996). Dennoch wurde deutlich, dass durch eine CYP2B1-Expression, die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber IFO deutlich gesteigert werden kann. Die 50 %ige Wachstums inhibitorische Konzentration (IC_{50}), lag für C8III-1-Zellen bei 0,05 mM IFO, während sie für die parentalen CrFKwt-Zellen bei ca 1 mM lag. Insgesamt war das Verhältnis von unspezifischer zu CYP2B1 vermittelter Toxizität am größten bei Konzentrationen zwischen 0,25 mM und 0,5 mM IFO. Interessanterweise ist dies genau die Konzentration, die nach einer systemischen IFO-Infusion im Blutplasma erreicht wird (0,1 - 0,5 mM (Yu and Waxman, 1996)). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei der Untersuchung von Glioma-, Gliosarcoma- und Brusttumorzellen erlangt. Auch hier wurden die CYP2B1-exprimierenden Zellen deutlich stärker durch Oxazaphosphorine geschädigt als lacZ-exprimierende Kontrollzellen (Chen et al., 1996; Chen and Waxman, 1995; Wei et al., 1994).

Eigenschaft	Wertung	Referenz
Aktivierung	CPA wird besser durch CYP2B-Isoformen aktiviert als IFO	(Chang et al., 1993)
Alternative Umsetzung	Aktivierung von IFO durch CYP3A-Isoformen erzeugt neurotoxisches Chloroacetaldehyd	(Chang et al., 1993)
Aktiver Metabolit	(Iso-)Phosphoramidmustard	(Brock et al., 1988)
Transportform im Blut	4OH-IFO bzw. 4OH-CPA	(Brock et al., 1988)
Nebenwirkungen	geringere hämatopoetische Toxizität und geringere Herztoxizität von IFO gegenüber CPA Urotoxizität von IFO kann durch MESNA ^R reduziert werden	(Brock et al., 1988)
Resistenz	Resistenzen durch IFO treten seltener auf als bei CPA	(Brade et al., 1986)
Wirksamkeit	therapeutischer Nutzen von IFO beim Pankreaskarzinom bereits demonstriert	(Loehrer et al., 1985)
Stabilität	IFO wird im Körper langsamer eliminiert als CPA und steht länger zur Aktivierung bereit	(Sanderson and Shield, 1996; Brock et al., 1988)
Selektivität	aktiviertes IFO (4OH-IFO) hat höhere krebstoxische Selektivität als CPA	(Brock et al., 1988)
Stabilität	IFO-Pulver bei Raumtemperatur: >5 Jahre IFO bei 37 °C, pH 7: 20 h IFO in Serum (<i>in vivo</i>): 7 - 15 h 4-OH-CPA in Serum bei 37 °C (<i>in vitro</i>): 17 min (IFO verhält sich ähnlich)	(Gilard et al., 1997) (Kaijser et al., 1991) (Allen et al., 1976) (Wright et al., 1995)
Mutagenität	Isophosphoramidmustard ist weniger mutagen als Phosphoramidmustard	(Struck et al., 1983)
maximale Serumkonzentration	CPA: 0,1 - 0,5 mM IFO ¹ : 0,2 mM 4OH-IFO ¹ : 1,5 µM	(Yu and Waxman, 1996) (Kurowski and Wagner, 1993)

Tabelle 8: Charakteristika einer IFO- bzw. CPA-Anwendung

¹bei einer systemischen Dosis von 1,5 g / m² Körperoberfläche

CPA wurde bei diesen Experimenten nicht getestet, da IFO hinsichtlich der geplanten Anwendung bei Pankreaskarzinomen wesentliche Vorteile gegenüber seinem Isomer CPA besitzt (vgl. Tabelle 8). Die *in vivo*-Eliminierung von IFO ist langsamer als von CPA. Dadurch steht die Prodroge länger zur Aktivierung im Körper des Patienten zur Verfügung (Sanderson and Shield,

1996). Weiterhin zeigt IFO eine stärkere Antitumoraktivität als CPA und ist häufig bei Tumoren, die bereits Resistenzen gegenüber anderen Cytostatika entwickelt haben, wirksamer (Brade et al., 1986). Gleichzeitig besitzt die hydroxylierte Form von IFO (4OH-IFO) die höchste cytotoxische Spezifität von allen Oxazaphosphorinen, d.h. das beste Verhältnis von Tumortoxizität zu unerwünschten Nebenwirkungen (Brock et al., 1988). Bei der Behandlung des sonst kaum chemotherapierbaren Pankreaskarzinoms zeigten klinische Studien, dass IFO neben 5-Fluorouracil und Gemzar das einzige Cytostatikum ist, das einen therapeutischen Effekt in klinischen Studien aufwies (Loehrer et al., 1985). Nachteilig ist, dass die Aktivierung von CPA durch CYP2B1 effizienter ist als die von IFO (Yu and Waxman, 1996).

B Bystander effect

i Bystander effect auf Zellen gleichen Ursprungs

Neben der Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierenden Zellen wurde auch die Wirkung auf Nachbarzellen, die kein CYP2B1-exprimierten (*bystander effect*) untersucht. Bei Kokultivierung von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen mit nicht CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen (Reporterzellen) in Gegenwart von IFO, zeigten zusätzlich zu den CYP2B1-exprimierenden Zellen auch die Reporterzellen schon bei IFO-Konzentrationen ab 0,25 mM eine Reduktion der Zellzahl. Im Gegensatz dazu waren die Reporterzellen bei einer Kokultivierung mit CrFKwt-Zellen bis 1 mM IFO kaum im Zellwachstum beeinflusst. Ein ähnliches Ergebnis, dass bereits bei niedrigen IFO-Konzentrationen ein inhibierender Effekt auf benachbarte Reporterzellen auftritt, ergab bereits die Untersuchung des *bystander effects* auf Gliosarkom-Zellen nach einer CYP2B1 vermittelten Aktivierung (Chen and Waxman, 1995). Dies deutet daraufhin, dass von den CYP2B1-exprimierenden Zellen Faktoren an die Reporterzellen abgegeben werden, die das Zellwachstum hemmen oder Zellen derart schädigen, so daß diese absterben. In Frage kommen dabei zelluläre Botenmoleküle oder aktive Metaboliten, die nach der IFO-Hydroxylierung entstehen. Proteine, die sich unter Umständen negativ auf die Zellpopulation auswirken können, sind z.B. *transforming growth factor* (TGF) β , *tumor necrosis factor* (TNF) α oder der Fas-Ligand, die entweder die Zellproliferation bremsen bzw. den Zelltod durch Apoptose einleiten (Atfi et al., 1997; Liu et al., 1997; Nagata, 1998). Beim HSVtk/GCV-Suizidsystems scheint z.B. Fas und der Fas-Ligand eine wichtige Rolle beim Zelltod zu spielen (Wei et al., 1999).

ii Bystander effect auf pankreatische Tumorzellen

Um die Frage zu beantworten, ob diese Interaktion nur zwischen Zellen des gleichen Typs stattfinden kann, wurden an Stelle von CrFK-Zellen als Reporterzellen zunächst Ratteninsulinoma (RIN5)-Zellen gewählt. Auch hier trat ein *bystander effect* auf die RIN5-Reporterzellen auf. Allerdings schien hier der Effekt schwächer zu sein, da er nur bei IFO-Konzentrationen über 0,5 mM zu beobachten war. Daraus läßt sich schließen, dass der *bystander effect* kein zelltyp-

spezifisches Phänomen ist, sondern sich auch auf andere Zellen übertragen läßt. Jedoch wurde auch deutlich, dass die Wirksamkeit des *bystander effects* je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Diese Übertragung des *bystander effect* auf Zellen, die von einem anderen Gewebe abstammen, wurde bisher noch nicht beschrieben. Dadurch wird die Übertragung von zellwachstumshemmenden Moleküle von CYP2B1-exprimierenden Zellen auf beliebige Tumorzellen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit einer CYP2B1/IFO-Behandlung auf pankreatische Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden humane Tumorzellen des exokrinen Pankreas bei einem varrierenden Anteil an kokultivierten CYP2B1-exprimierenden Zellen (C8III-1) untersucht. Damit es bei unterschiedlich schnellem Wachstum der Zellpopulationen nicht zu unterschiedlichen Verhältnissen zwischen PANC1- und CrFK-Zellen kommt, wurde die C8III-1-Population mit CrFKwt-Zellen so angereichert, dass immer gleich viele pankreatische wie Katzennierenzellen ausgesät wurden (vgl. Tabelle 2 und 4). Damit wurden Variationen, die durch eine sterische Hinderung bei ungleichmäßiger Verteilung der Zelltypen oder eine unterschiedliche Konzentration sezernierter Wachstumsfaktoren verursacht werden, minimiert. In Anwesenheit von IFO zeigten die pankreatischen Zellen eine reduzierte Überlebensrate, die mit zunehmenden Anteil an CYP2B1-exprimierenden Zellen in der CrFK-Population anstieg (vgl. Abbildung 32). Dabei wurde maximal eine 86 %ige Hemmung im Vergleich mit der nicht IFO behandelten Kontrollgruppe erreicht, wenn CYP2B1-exprimierende Zellen zu gleichen Teilen mit pankreatischen Tumorzellen ausgesät wurden. Dies zeigt, dass humane exokrine pankreatische Tumorzellen nach einer Aktivierung durch andere benachbarte Zellen effektiv im Wachstum gehindert werden können. Allerdings demonstriert dieses Experiment auch, dass der *bystander effect* nicht ausreicht um eine Tumorzellpopulation, zumindest unter den beschriebenen Bedingungen *in vitro* komplett zu eliminieren. Die Wirkung von aktiviertem IFO läßt sich vor allem auf eine DNA-Alkylierung und damit verbundene Bildung von DNA *interstrand cross links* zurückführen. Obwohl auch diese Mutationen anscheinend durch Exzission repariert werden können, sind sie doch die DNA-Modifikation, die am häufigsten zum Absterben der Zelle führt (Ferguson and Pearson, 1996). Dabei sind vor allem proliferierende Zellen betroffen, die durch die kovalent verbundenen DNA-Stränge in ihrer Replikation gehemmt werden. Zellen, die sich nur langsam teilen oder ruhen, sind von einer IFO-Behandlung deutlich weniger betroffen. In diesem Fall muss aktiviertes IFO so lange auf die Zellen einwirken können bzw. die durch IFO verursachten Schäden nicht repariert werden, bis die Zellen den nächsten Zellzyklus durchlaufen. Um eine ausreichende DNA-Schädigung zu erreichen, könnte der therapeutische Effekt von metabolisiertem oder zerfallenem IFO durch Zugabe von neuem IFO kompensiert werden. Dies war nicht der Fall in den hier beschriebenen Experimenten, wo nur einmal am Beginn IFO zugesetzt wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, die Aktivierung der CYP2B1-produzierende Zellen über einen längeren Zeitraum aufrechtzuhalten, in dem das gleichzeitige Absterben der IFO-aktivierenden Zellen durch Zugabe frischer IFO-aktivierender Zellen oder durch den Einbau von geeigneten Resistenzmechanismen gegenüber aktivem IFO kompensiert wird (vgl. Abbildung 65).

4.1.3 Mechanismus des *bystander effects*

Bei Kokultivierung von A20-Suspensionszellen mit CYP2B1-exprimierenden C8III-1-Zellen wurde nach IFO-Gabe trotz fehlender *gap junctions* ein *bystander effect* von aktivierten IFO beobachtet. Demnach scheint, im Gegensatz zu anderen Suizidsystemen wie z.B. HSVtk/GCV, eine Zell-Zell-Verbindung z.B. über *gap junctions* (Yang et al., 1998) zur Vermittlung eines *bystander effects* nicht notwendig. Um den *bystander effect* weiter zu analysieren, wurden CYP2B1-exprimierende CrFK- mit PANC1-Zellen als Reporterzellen kokultiviert, wobei die beiden Populationen durch eine Membran getrennt waren. Diese Membran ermöglichte einen Austausch von niedermolekularen Molekülen, vermied jedoch einen Aufbau von direkten *gap junctions*. Dabei zeigte sich, dass der *bystander effect* unabhängig von einem direkten Zell-Zellkontakt ist. Die nach der IFO-Aktivierung frei werdenden Metaboliten können die Zelle verlassen, durch das Medium diffundieren und wieder in eine Reporterzelle gelangen. Dieses Ergebnis stimmt auch mit Erkenntnissen überein, die Chen et al., 1995 an einem Gliosarkomamodell *in vitro* gewonnen haben (Chen and Waxman, 1995).

4.1.4 Mechanismus des Zelltod

Die Untersuchung der Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende 22P1G-Zellen ergab, dass bei einer Endpunktbestimmung der Zellzahl die CYP2B1-exprimierenden 22P1G-Zellen eine IC_{50} deutlich unter 0,25 mM IFO besitzen müssen während die IC_{50} der parentalen 293-Zellen zwischen 0,5 und 1 mM IFO lag. Die niedrige IC_{50} der 22P1G-Zellen läßt sich zum einen auf die hohe CYP2B1-Aktivität und eventuell auf einen empfindlicheren Zelltyp zurückführen. Bei einer dynamischen Messung des Zellwachstums wurden die Zellen ab einer bestimmten IFO-Konzentration zuerst in ihrem Wachstum gehemmt wobei die Zellzahl stagnierte. Erst nach einer Periode konstanter Zellzahl, die von der Konzentration des zugegebenen IFOs abhing, begannen die Zellen zu sterben. Bei der Untersuchung des *bystander effects* auf A20-Zellen zeigte sich, dass diese durch die Zugabe von IFO in ihrer Teilungsaktivität verlangsamt werden. Andere haben gezeigt, dass die CYP2B1/CPA vermittelte Aktivierung in einem Brusttumormodell sich vor allem auf Zellen auswirkt, die gerade die S-Phase durchliefen und sie in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretierte (Davidoff and Mendelow, 1993). Die betroffenen Zellen konnten damit nicht mehr in die G1/G0-Phase übergehen (Chen et al., 1996; Davidoff and Mendelow, 1993). Dies scheint ein ähnlicher Mechanismus, wie beim häufigsten verwendeten Suizidsystem HSVtk/GCV zu sein. Bei diesem werden die Zellen in der S-Phase durch GCV in der Proliferation gehemmt und am G2/M-*checkpoint* irreversibel arretiert werden, bis sie durch Apoptose sterben (Halloran and Fenton, 1998). Auf Grund dieser Ähnlichkeiten zwischen dem HSVtk/GCV- und dem CYP2B1/IFO-System wurde auch der durch IFO hervorgerufene Zelltod näher untersucht.

Der Mechanismus, durch den eine Tumorzelle letztendlich zu Grunde geht, kann einen

entscheidenden Einfluss auf das Ansprechen der Therapie sowie deren Verlauf haben. Man unterscheidet, neben kleinen Unterformen, zwischen Nekrose und Apoptose, dem programmierten Zelltod. Apoptose ist der Mechanismus, durch den sich der Körper unter normalen Umständen überflüssig gewordener Zellen entledigt, die während der Organogenese sowie während des Erhalts und des Umbaus von Organen auftreten. Apoptotische Zellen senden Signale aus (z.B. invertiertes Phosphatidylserin), die „reinigende“ Macrophagen anziehen, durch die sie schließlich phagozytiert und degradiert werden (Melcher et al., 1999). Obwohl die Macrophagen die aufgenommenen Antigene gegenüber T-Zellen präsentieren, erfolgt unter physiologischen Bedingungen keine Immunantwort, da weitere Signale von immunstimulatorischen Molekülen fehlen, oder immunhemmende Stoffe (z.B. IL-10) sezerniert werden (Melcher et al., 1999). Im Gegensatz dazu verliert die nekrotische Zelle ihre Integrität und entläßt ihre Antigene in das umgebende Gewebe. Durch diesen pathologischen Tod werden Antigen-präsentierende Zellen nach der Aufnahme des Zelldebris aktiviert und sezernieren immunstimulatorische Botenstoffe, die wiederum cytotoxische T-Zellen anlocken und aktivieren. Diese entzündliche Reaktion des Immunsystems auf die pathologische Situation kann die Immuntoleranz des Tumorgewebes brechen (Melcher et al., 1999), jedoch bedeutet sie für den Patienten unter Umständen unerwünschte Nebenwirkungen, wie z.B. Fieber (Gallucci et al., 1999).

Zur Diagnose von Apoptose werden hauptsächlich drei Methoden verwendet: Elektronenmikroskopie (Cohen, 1993), *in situ*-Markierung von entstehenden DNA-Fragmenten mittels terminaler Desoxyribonucleotidyltransferase (TUNEL-Färbung) (Gavrieli et al., 1992) und Nachweis von 170 bis 180 bp-Oligomeren durch Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen (*DNA-laddering*) (Gavrieli et al., 1992). Während die Elektronenmikroskopie eine ausgezeichnete Diagnose der zellulären Morphologie erlaubt und damit eine sehr hohe Aussagekraft besitzt, werden bei der TUNEL-Färbung nicht nur apoptotische Zellen, sondern häufig auch nekrotische Zellen angefärbt (Grasl-Kraupp et al., 1995; Nishizaki et al., 1999; Stahelin et al., 1998; Yasuda et al., 1995). Das *DNA-laddering* besitzt ähnlich wie die Elektronenmikroskopie eine sehr hohe Aussagekraft, jedoch ist die Methode unter Umständen sehr unempfindlich und nur rein qualitativ (Ueda and Shah, 1994). Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung des zum Zelltod führenden Mechanismus auf eine TUNEL-Färbung und ein Nachweis des *DNA laddering* verzichtet. Als Ergänzung zur Elektronenmikroskopie wurde stattdessen eine Doppelfärbung von Zellen mit Annexin V und Propidiumiod durchgeführt. Annexin V bindet an das invertierte Phosphatidylserin sterbender Zellen, wobei nekrotische Zellen durch zusätzliche Anfärbung mit Propidiumiodid von den apoptotischen Zellen unterschieden werden können (Vermees et al., 1995).

Die Annexin V/Propidiumiodid Anfärbung von CrFK- und Vero-Zellen ergab, dass nach einer Behandlung mit aktiviertem IFO in der behandelten Population verstärkt nekrotische (Annexin V und Propidiumiodid positive) Zellen sichtbar werden, jedoch in der apoptotischen Subpopulation (Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ), die schon vor Behandlung mit aktiviertem IFO

festzustellen war, kaum Veränderungen auftraten. Durch Messungen, die bereits am Tag nach Drogenzugabe begannen und an jedem Tag fortgesetzt wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der nekrotischen Population um ursprünglich apoptotische Zellen handelte, die nach einiger Zeit (sekundär) nekrotisch wurden. Im Vergleich dazu nahm bei den Zellen, die mit Staurosporin, einem Apoptose-Induktor, behandelt wurden, die apoptotische Population am nächsten Tag deutlich zu. Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Analyse der Zellbeschaffenheit während der FACS-Analyse mittels *forward* und *sideward scatter*. Dabei ist der *forward scatter* ein Maß für die Größe der jeweils gemessenen Zelle (Scherer et al., 1999) während der *sideward scatter* das Ausmaß an intrazellulären Strukturen (Granulosität) widerspiegelt (Zucker et al., 1988). Dem gemessenen Werten zufolge, nimmt das Volumen und die Granulosität der behandelten Zellen zu. Die Zunahme des Volumens ist ein weiterer Hinweis für einen nekrotischen Mechanismus. Diese Annahme wird weiterhin bestärkt durch die elektronenmikroskopische Analyse. Während die meisten Staurosporin behandelten Zellen die typischen morphologischen Anzeichen einer Apoptose aufwiesen, besaßen die meisten mit aktiviertem oder nicht aktivierten IFO behandelten, aber dann CYP2B1-exprimierenden Zellen zumeist nur geringfügige Veränderungen, wie eine nukleäre Lappung, Mikronukleusation oder intrazelluläre Vesikelbildung. Die wenigen Zellen, die deutlich verändert waren, besaßen vermehrt Vakuolen oder ein dilatiertes ER. Es muss jedoch erwähnt werden, dass kaum eine typisch nekrotische Zelle, vor oder in direkter Lyse, gefunden wurde. Ein möglicher Grund ist die sehr fragile Wand spät nekrotischer Zellen, die während der Präparation leicht zerfällt und daher nur noch Debris zurückbleibt. Dieser Debris wurde z.B. während der FACS-Analyse sichtbar. Auch wenn das Endstadium einer Nekrose nicht elektronenmikroskopisch erfasst wurde, deuten alle beobachteten Merkmale (kein Propidiumiodidausschluß, vergrößertes Zellvolumen, dilatiertes ER, keine DNA-Kondensation, keine *apoptotic bodies*) auf einen nekrotischen Mechanismus hin. Einschränkend muss erwähnt werden, dass manche Autoren einen Unterschied zwischen Nekrose *in vivo* oder *in vitro* machen. So ist ein nicht-apoptotischer Zelltod *in vitro*, der z.B. durch Gefrieren und Auftauen einer Zelle induziert wurde, nicht unbedingt vergleichbar mit einer pathologischen Nekrose, wie sie *in vivo* auftritt. In diesem Fall handelt es sich lediglich um eine einfache Zellyse. Diese hätte auch *in vivo* keine verstärkte Immunreaktion zur Folge (Melcher et al., 1999). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die mit 4-OOH-IFO oder IFO behandelten Zellen nur zellytisch sterben, da der Mechanismus, der zum Absterben der Zelle führt komplex zu sein scheint. Die Zelle wird erst in der G2/M-Phase arretiert (Davidoff and Mendelow, 1993) und stirbt anschließend nach mehreren Tagen nekrotisch (vgl. Abbildung 63).

Der nekrotische Zelltod steht damit im deutlichen Gegensatz zu den meisten bisher publizierten Arbeiten über einen durch Oxazaphosphorine induzierten apoptotischen Zelltod (Davidoff and Mendelow, 1993; Meyn et al., 1994), jedoch wurde in einem murinen Melanommodell mit Oxazaphosphorinbehandlung ein ähnlicher nekrotischer Mechanismus, wie in dieser Arbeit beschrieben, beobachtet (Kuwashima, 1996).

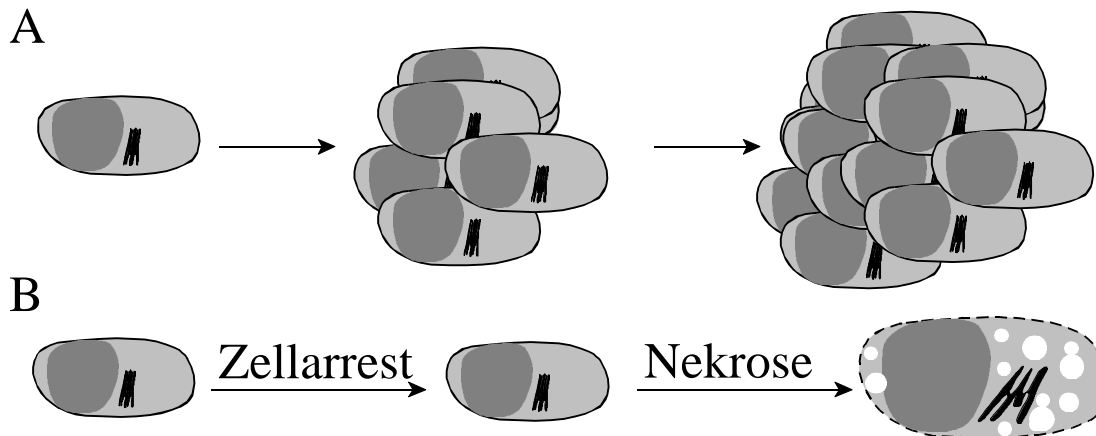


Abbildung 63: Verhalten einer Tumorzelle ohne und mit IFO-Behandlung

(A) Unbehandelte Tumorzellen proliferieren ungehemmt während (B) Oxazaphosphorin behandelte Zellen arretiert werden und schließlich durch Nekrose sterben.

Bei den in Rostock durchgeführten Untersuchungen an Nacktmäusen wurden verkapselte CYP2B1-exprimierende Zellen in subkutanen Tumoren aus pankreatische Tumorzellen injiziert und die Mäuse anschließend systemisch mit IFO behandelt (vgl. 3.1.4 Zellvermittelte Therapie von Pankreastumoren *in vivo*). Es wurden dabei neben der Tumorgroße auch andere Parameter wie Histologie des Tumorgewebes und die Zellteilungsaktivität bestimmt. Dabei wurde ersichtlich, dass die mit Kapseln und IFO behandelten Tumoren eine Reduktion des Anteils proliferierender Zellen im Tumorgewebe aufwiesen und teilweise ausgedehnte nekrotische Regionen im Tumor auftraten (Löhr et al., 1998). Diese *in vivo*-Daten ähneln den hier bereits beschriebenen *in vitro*-Ergebnissen eines Zellarrest mit anschließender Nekrose. Bei den in Rostock durchgeführten Experimenten wurden zur Untersuchung des Zelltodmechanismus Zellkerne isoliert und der DNA-Gehalt bestimmt. Das Ergebnis bestätigte, dass in den behandelten Tumoren sich ein geringerer Anteil der Zellen in der S- bzw. G2/M-Phase in Vergleich mit unbehandelten Tumoren befindet. Bei der FACS-Analyse von Tumorzellen zur Bestimmung des DNA-Gehalts besaß ein Teil der von IFO-behandelten Tumoren abstammenden Zellen einen geringeren DNA-Gehalt als in normalen Zellen vorliegt (*sub-G1-peak*, (Löhr et al., 1998)). Diese in der Publikation als apoptotisch beschriebene Population spiegelt eventuell die im Rahmen dieser Doktorarbeit festgestellten nukleären Vesikel wieder, die nach einer IFO-Behandlung häufig elektronenmikroskopisch sichtbar wurden. Für eine DNA-Gehaltbestimmung mittels FACS-Analyse, wie sie in der Publikation beschrieben wurde (Löhr et al., 1998), wird von den zu untersuchenden Zellen die Cytoplasmamembran entfernt, so daß letztendlich nur noch die Zellkerne analysiert werden. Ohne Cytoplasmamembran werden aber nukleäre Vesikel nicht mehr zu einer Zelle zusammengefasst und treten als einzelne Partikel mit subzellulären DNA-Gehalt

auf. Diese subnukleäre Partikel können den Anschein apoptotischer Zellen oder *apoptotic bodies* geben.

Das Tumorsuppressorprotein p53 kann in Zellen mit DNA-Schädigungen, wie sie z.B. durch alkylierende Substanzen verursacht werden, Apoptose induzieren. Die Tatsache, dass Oxazaphosphorin behandelte Tumoren durch Zellarrest und Nekrose zugrunde gehen, erklärt auch, dass bei manchen Tumorbehandlungen mit Oxazaphosphorinen keine Korrelation zwischen dem Ausgang der Therapie und dem p53-Status in den Tumorzellen festgestellt werden konnte (Hengstler et al., 1999). Abgesehen davon besitzen die meisten pankreatischen Tumorzellen Mutationen im p53-Gen (vgl. 1.1.3 Genetische Veränderungen während der Tumorgenese). Damit haben diese Zellen nicht mehr die Möglichkeit über eine p53-vermittelte Apoptose zu sterben. Entweder sterben dann diese Zellen durch eine p53-unabhängige Apoptose oder gehen nekrotisch zu Grunde.

Merkmal	Apoptose	Nekrose
Nucleus	<ul style="list-style-type: none"> • nukleäre DNA-Kondensation • DNA-laddering 	---
Membran	<ul style="list-style-type: none"> • extrazelluläre Knospung von umhüllten Cytoplasmabereichen • Translokation von Phosphatidylserin • Ausschluss von Farbstoffen 	<ul style="list-style-type: none"> • Membranlyse • Translokation von Phosphatidylserin • durchlässig für Propidiumiodid
Cytoplasma	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion • Kondensation 	<ul style="list-style-type: none"> • Anschwellen
Organellen	<ul style="list-style-type: none"> • Ribosomen lösen sich vom rauhen ER 	<ul style="list-style-type: none"> • ER und Golgi sind geschwollen
Veränderungen des Stoffwechsels	<ul style="list-style-type: none"> • Expression von pro-apoptischen Genen • aktive Proteinsynthese • Aktivierung von Proteasen 	<ul style="list-style-type: none"> • evtl. Expression von Stressproteinen
Cytoskelett	<ul style="list-style-type: none"> • zerstört 	<ul style="list-style-type: none"> • intakt
Entzündung (in vivo)	<ul style="list-style-type: none"> • unwahrscheinlich 	<ul style="list-style-type: none"> • wahrscheinlich

Tabelle 9: Charakteristika des apoptotischen und des nekrotischen Zelltod

4.1.5 Verkapselung von Zellen

Die Verwendung von autologen Zellen für eine Therapie hat Vorteile wie z.B. ein fehlendes Risiko einer Abstoßungsreaktion oder einer Übertragung von pathogenen Organismen. Jedoch ist es sehr aufwendig, wenn nicht sogar unmöglich, für jeden einzelnen Patienten autologe Zellen zu isolieren, in der gewünschten Weise zu manipulieren und zu reinfundieren. Um die mit allogenen Zelltransplantaten verbundenen Probleme zu umgehen und um eine ungewünschte Ausbreitung der implantierten Zellen im Körper des Patienten zu vermeiden, wurden Zellen in Zellulosesulfatkapseln verpackt. Diese Kapseln besitzen Poren, die einen Austausch von Molekülen bis 200 kD ermöglichen, aber ein Freiwerden der umschlossenen Zellen bzw. ein Eindringen von Immunzellen verhindern (Dautzenberg et al., 1999). Anstatt aus Zellulosesulfat kann bei Kapseln die Wand auch aus Proteinen oder Alginat bestehen. Proteinkapseln werden jedoch in erster Linie zur kontrollierten Freisetzung von synthetischen Faktoren verwendet (Newton and Razzo, 1975). Dagegen werden Alginatkapseln auch zur Verkapselung von Zellen verwendet, doch haben sie eine geringere mechanische Stabilität und ein schlechteres Wanddicke-Nutzvolumen-Verhältnis (Dautzenberg et al., 1999). In mehreren Studien zum Verhalten der Zellulosesulfatkapseln *in vivo*, bzw. des Empfängerorganismus wurde überzeugend demonstriert, dass das Kapselmaterial von den umschlossenen Zellen sehr gut toleriert wird und die Kapseln ohne wesentliche pathologische Veränderungen in immunkompetente Organismen implantiert werden können (Löhr et al., 1998; Kröger et al., 1999).

In den hier durchgeführten *in vitro*-Analysen konnten verkapselte 22P1G-Zellen IFO aufnehmen, aktivieren und die aktiven Metaboliten wieder an das umgebende Medium abgeben. Der dabei entstehende *bystander effect* war vergleichbar mit dem unverkapselter Zellen.

In der in Rostock durchgeführten präklinischen Studie, bei der Nacktmäuse mit subkutanen Tumoren bestehend aus humanen pankreatischen Tumorzellen mit verkapselten Zellen behandelt wurden, konnte der zusätzliche therapeutische Nutzen durch verkapselte, CYP2B1-exprimierende Zellen gegenüber einer Monotherapie mit IFO gezeigt werden. Es stellte sich durch den Einsatz der verkapselten Zellen und systemischer IFO-Gabe bei einem Teil der Mäuse ein kompletter Tumorverlust, ausgedehnte intratumorale Nekrosen und eine Hemmung der Zellteilungsaktivität ein. Ohne Kapseln trat bei 30 % der Versuchstiere nach IFO-Gabe eine partielle Tumorreduktion statt. Ungefähr das gleiche Ergebnis ergab die Kombination von nicht verkapselten CYP2B1-exprimierenden Zellen mit IFO. Hier ist anzunehmen, dass die einzelnen Zellen, da sie nicht in Kapseln zusammengefasst waren, sich von der Injektionsstelle weg im Körper verteilten oder die felines Zellen durch das murine Komplementsystem eliminiert wurden. Damit war die lokale IFO-Aktivierung verhindert und nur noch die Wirkung nach einer hepatozellulären IFO-Aktivierung vorhanden. In einer aktuellen Studie zur Wirkung von CYP2B1/CPA beim Brustkrebs in zwei immunkompetenten Modellen wurden auch verkapselte

CYP2B1-exprimierende Zellen verwendet. In diesem Fall wurde kein wesentlicher Antitumoreffekt ausschließlich mit CPA ersichtlich, während in Kombination mit implantierten Kapseln eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums auftrat (Kammertoens et al., 2000). Die ist ein weiterer Beleg für die Bedeutung einer intratumoralen Aktivierung von Oxazaphosphorinen.

Für die Anwendung beim Menschen musste ein Weg gefunden werden, wie die Kapseln in das Pankreas implantiert werden können. Im Gegensatz zum Nacktmausmodell, bei dem die Tumoren subkutan wuchsen und damit leicht zugänglich waren, ist das humane Pankreas in der Bauchhöhle umgeben und verwachsen mit anderen Organen und nur sehr schwer zugänglich. Neben der sehr aufwendigen Bauchöffnung (Laparoskopie) standen die beiden weniger invasiven Applikation einer direkten Injektion der Kapseln durch die Bauchdecke in das Pankreas sowie eine intra-arterielle Implantation mittels eines Katheters zur Auswahl. Ein chirurgischer Eingriff, auch wenn es nur eine intratumorale Injektion ist, birgt immer das Risiko, dass Tumorzellen verschleppt werden und in anderen Teilen des Körpers Metastasen bilden. Nur bei der intra-arteriellen Injektion existiert dieses Risiko nicht. Dafür besteht hier das Risiko, dass Kapseln, die in die pankreatischen Gefäße entlassen werden, eine ungewollte mangelnde Blutversorgung (Ischämie) mit anschließendem Absterben des Gewebes verursachen. In den durchgeführten Experimenten an einem porcinen Model konnte jedoch gezeigt werden, dass außer kleinen Entzündungsherden (Perivasculäre Granulomatose) oder geringfügigen Gefäßverschlüssen (Thromben), keine auffälligen klinischen Symptome, wie eine mangelnde Blutversorgung im Pankreas auftraten. Unter Umständen kann eine reduzierte Blutversorgung sogar einen positiven Effekt haben, da dadurch die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes unterbrochen wird und die Zellen absterben (Beaujeux et al., 1996).

4.1.6 Klinische Studie

Ausgehend von den positiven Ergebnissen bei den präklinischen Vorversuchen wurde an der Universitätsklinik in Rostock eine klinische Studie der Phase I/II durchgeführt. Ziel war es, etwaige nachteilige Nebenwirkungen der Therapie für den Patienten festzustellen und, falls möglich zu eliminieren. Bei dieser Studie wurden 14 Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom mit der vorher am porcinen Modell etablierten Methode der Verabreichung über einen Katheter behandelt. Hier wurden menschliche Zellen verwendet um Probleme der Eliminierung und der Xenotransplantation auszuschließen. Die verwendeten 293-Zellen wurden zuvor von der Firma Q-One auf das Fehlen von gefährlichen Krankheitserregern untersucht und entsprechend zertifiziert. Sie wurden unter *good laboratory practice* (GLP)-Bedingungen mit einer CYP2B1-Expressionkassette transfiziert und der Klon mit der höchsten Expression (22P1G-Zellen, vgl. 3.1.2 Herstellung von stabil CYP2B1-exprimierenden Zellklonen) unter *good manufacturing practice* (GMP)-Bedingungen expandiert und verkapselt (Q-One). Jeder Patient

erhielt 300 Kapseln mit 22P1G-Zellen. Nach der Implantation der enkapsulierten Zellen wurden die Patienten in zwei Serien mit jeweils drei IFO-Infusionen (1g IFO pro 1 m² Körperoberfläche) an drei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt (vgl. Abbildung 64). Nach der Behandlungsphase wurden die Patienten mindestens noch bis zur 20. Woche in regelmäßigen Abständen beobachtet (Löhr et al., 1999).

Alle behandelten Patienten vertrugen die Instillation der Kapseln ohne wesentliche Nebenwirkungen. Nach der IFO-Behandlung zeigten 2 Patienten einen partiellen Rückgang des Tumors um mindestens 50 %, zwei weitere einen Rückgang um 25 % bis 50% und 10 Patienten eine Stabilisierung der Krankheit. Patienten mit ähnlich weit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom haben unter normalen Umständen eine durchschnittliche Lebenserwartung von ca. 20 Wochen. Im Vergleich dazu konnte bei dieser klinischen Studie, die vor allem der Untersuchung der Sicherheit der Therapie galt, die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten mit dieser Methode auf mehr als 41 Wochen verlängert werden (Löhr et al., 2000). Die erfolgreichsten konventionellen Chemotherapien mit Gemzar, IFO oder 5-Fluorouracil/Leucovorin zeigen zwar eine therapeutische Reaktion in bis zu 11 % (Casper et al., 1994), 22 % (Loehrer et al., 1985) bzw. 7 % (DeCaprio et al., 1991) der Patienten, jedoch wird bei keiner der Therapien selbst bei früherer Erkennung der Krankheit eine mittlere Lebenserwartung von 27 Wochen überschritten. Eine kombinierte Therapie von CYP2B1-exprimierenden Zellen mit IFO scheint daher einer konventionellen Chemotherapie überlegen zu sein. Dies wird auch deutlich, wenn man die Überlebensrate nach einem Jahr betrachtet. Eine retrospektive Studie, die an Patienten mit vergleichbaren Krankheitsgrad an der Universitätsklinik in Rostock durchgeführt wurde, ergab eine 1 Jahresüberlebensrate von 11 %. Bei der derzeit effektivsten konventionellen Chemotherapie mit Gemzar sind es 18 % (Burris et al., 1997). In dieser Studie überlebten 36 % der Patienten die folgenden 12 Monate nach Diagnosestellung. Das entspricht immerhin einer Verdreifachung gegenüber der historischen Gruppe unbehandelter Patienten bzw. eine Verdoppelung gegenüber Patienten, die mit der bisher besten konventionellen Chemotherapie für inoperable Pankreaskarzinome mit Gemzar behandelt wurden (Burris et al., 1997). Allerdings war bei dieser Studie keine parallel geführte Kontrollgruppe vorhanden, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese neue Art der Behandlung beim Patienten eher psychologisch fundierte Heilungserfolge bewirkt hat. Weiterhin muss erwähnt werden, dass zur Zeit die erfolgreichste Therapie des Pankreaskarzinoms eine Operation ist, bei der das Pankreas, der Zwölffingerdarm (Duodenum) und der untere Teil des Magens entfernt wird (Whipple-Operation). Nur etwa 10 % der Patienten können operiert werden. Dieser Eingriff ist allerdings so schwer, dass sich die Patienten häufig von der Operation nicht mehr komplett erholen und ca 5 % noch innerhalb des ersten Monats nach der Operation sterben (Hunstad and Norton, 1995). Erholt sich ein Patient von der Operation kann er bei ständiger Einnahme von Medikamenten und starker Beeinträchtigung der Lebensqualität mit einer mittleren Lebenserwartung von 22 Monaten rechnen (Z'Graggen et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist die intraarterielle Kapselinstillation ambulant und sehr gut auch bei inoperablen Karzinomen, wie sie in der therapierten Patientengruppe vorlagen, verträglich durchführbar. Den Patienten hätte alternativ nur eine

chemotherapeutische Behandlung zur Verfügung gestanden. Inzwischen wurde eine Phase II Studie gestartet, in der diese Therapiemöglichkeit in mehreren medizinischen Zentren (München, Rostock, Mannheim, Berlin, Bern) weiter getestet wird.

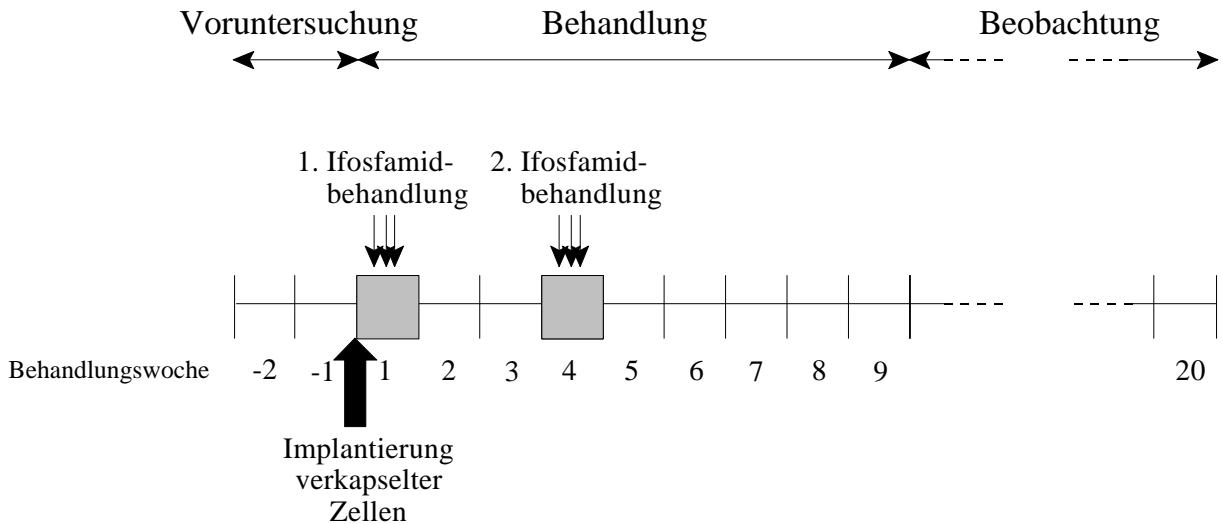


Abbildung 64: Schematische Darstellung des Protokolls zur Behandlungsphase I/II

Nach einer 14-tägigen Voruntersuchungsphase wurden je 300 Kapseln mit 22P1G-Zellen in 14 Patienten mit inoperablen Pankreaskarzinom verabreicht. In der ersten und vierten Woche nach Implantation der Kapseln wurden die Patienten an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer niedrigen Dosis IFO (1 g / 1 m² Körperoberfläche) behandelt und anschließend bis zur 20. Woche in regelmäßigen Abständen untersucht (Löhr et al., 1999).

Ein sehr wichtiges Problem ist, dass zwar der Primärtumor in der Regel für das pathologische Befinden des Patienten verantwortlich ist und dass die Patienten am Primärtumor in diesem Fall sterben. Daher muss der Primärtumor als erstes bekämpft werden. Allerdings sind metastasierende Zellen nur schwer zu erreichen und manifestieren sich in der Regel nach Verschwinden des Primärtumors. Es muss also ganz klar gesagt werden, dass diese zellvermittelte Therapie zwar in der Lage ist die Lebenserwartung der Patienten zu erhöhen, aber nach bisherigen Ergebnissen keine komplette Heilung bewirken kann. Die Wahrscheinlichkeit kann jedoch erhöht werden, wenn die Neoplasie möglichst frühzeitig behandelt wird und auch Metastasen mit einer lokalen IFO-Aktivierung erreicht werden. Um mit einer Gentherapie auch Metastasen zu erreichen, muss eine Anwendung von Suizidgenen entweder durch eine Kombination mit immunstimulatorischen Genen oder durch einen Transfer des therapeutischen Gens in metastasierende Zellen mittels (retro)viraler Vektoren verbessert werden. Dieser Schritt ist aber sehr viel schwieriger und benötigt eine angemessene Vorbereitungsphase um sämtliche Effizienz- und die Sicherheitskriterien erfüllen zu können.

4.2 IFO-Behandlung mit retroviralem CYP2B1-Gentransfer

Für eine effiziente *in vivo*-Gentherapie, zielen die vorhandenen viralen und nicht-viralen Transfermethoden darauf ab, möglichst effizient, selektiv und sicher das gewünschte Gen in Zielzellen zu exprimieren. Virale Vektoren sind in der Regel nicht-viralen Transfermethoden z.B. Liposomen in ihrer Effizienz Gene zu übertragen, überlegen (Schofield and Caskey, 1995). Zu den wichtigsten relevanten Virusgruppen gehören Adenoviren (ADV), Adenoassoziierte Viren (AAV) und Retroviren (RV).

ADV-Vektoren haben den großen Vorteil, dass sie hochkonzentriert hergestellt werden können, eine hohe Verpackungskapazität für Fremd-DNA besitzen und wie AAV-Vektoren die meisten ruhenden und proliferierende Zellen effizient *in vivo* infizieren (Günzburg and Salmons, 1995). Auf der anderen Seite sind ADVs toxisch und stark immunogen (McClane et al., 1997), so dass eine Infektion mit diesen Viren, das Immunsystem gegen die viralen Antigene aktiviert und sowohl freie Viren, als auch infizierte Zellen bekämpft. Dadurch ist die virale Halbwertszeit im Körper nur gering. Die Dauer der Genexpression wird zusätzlich durch den episomalen Zustand des ADV-Genoms in der Zelle reduziert. Da die meisten verwendeten ADV-Vektoren nicht replikationsfähig sind, wird die ADV-Vektor-DNA bei vermehrter Zellteilung ausgedünnt. Eine kontinuierliche Produktion von ADV-Vektoren *in vivo* ist auch ausgeschlossen, da die Synthese neuer Viren immer mit der Lyse der Verpackungszelle endet. Einzige Ausnahme sind selektiv replizierende ADV-Vektoren, die durch Deletion des E1B-Gens sich nur in Tumorzellen mit nicht-funktionellem p53-Protein vermehren können und dabei das Tumorgewebe lysieren (onkolytische Vektoren) (Harada and Berk, 1999; Rothmann et al., 1998). AAV-Vektoren benötigen zur Replikation einen lytischen Helfervirus (Adenovirus oder Herpesvirus) oder deren lytisch wirkenden Helferfunktionen. Dadurch ist auch die Langzeit- *in vivo* Produktion Verwendung von replikationsfähigen AAV-Vektoren zumindest derzeit nicht möglich. Bei AAV-Vektoren werden ohne Aufkonzentration in der Regel Titer erreicht, die ca. zwei bis drei Zehnerpotenzen unter denen von Adenoviren liegen. Eine Zeitlang schien es, dass wildtyp AAV spezifisch an einen bestimmten nicht kodierenden Locus auf Chromosom 19 integriert und damit dieser Vektortyp möglicherweise einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen zufällig integrierenden Vektorsystemen hat (Linden and Berns, 1997; Samulski, 1993), jedoch zeigten weitere Untersuchungen, dass für die zielgerichtete Integration auf jeden Fall virale Funktionen *in trans* vorhanden sein müssen, die auf den AAV-Vektoren aus Platzgründen in der Regel fehlen. Häufig wird auch die Expression des übertragenen Gens durch Rearrangements und Konkatemerbildung des Virus unterbrochen bzw. fehlkontrolliert (Giraud et al., 1995). Noch etwas niedriger sind die Titer RV-Vektorsystemen. Jedoch ist es möglich Verpackungszellen für retrovirale Vektoren herzustellen und zu implantieren. Diese produzieren permanent retrovirale Vektoren und setzen diese kontinuierlich frei ohne wesentlich in ihren Stoffwechselfunktionen

gehemmt zu sein. Weiterhin infizieren C-Typ-Retroviren, zu denen auch MLV gehört, nur sich teilende Zellen. Auf der einen Seite ist dies ein Nachteil, da sich langsam teilende oder ruhende Tumorzellen nur schlecht infiziert werden können, auf der anderen Seite bedeutet dies jedoch auch, dass gesundes, meist ruhendes Gewebe nicht infiziert wird. Dies erhöht die Sicherheit eines viralen Suizidgentransfers in Tumorzellen. Retroviren integrieren stabil colinear in das Genom der infizierten Zelle und werden bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Die Integration in das zelluläre Genom birgt das geringe Risiko einer Insertionsmutagenese und einer damit verbundenen Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Varmus, 1983). Ein solches Phänomen gibt es z.B. bei GR-Mäusen, die mit dem *Mouse Mammary Tumour virus* (MMTV) infiziert wurden (Nusse et al., 1985), jedoch ist eine solche Transformation von gesunden Zellen durch eine Insertionsmutagenese bisher nicht beim Menschen beschrieben worden (Gunzburg and Salmons, 2000).

4.2.1 Retroviraler Gentransfer in Tumorzellen

Alle getesteten pankreatische Tumorzellen ließen sich in den durchgeführten Infektionsstudien infizieren, jedoch war die Effizienz deutlich geringer als bei Mausfibroblasten. Für die Studien wurden Vektoren mit amphotropen *env*-Protein (vgl. 1.4.4 Retrovirale Vektorsysteme) verwendet (Cosset et al., 1995; Miller and Buttimore, 1986). Dieses Protein bindet mit dem *surface*-Bereich an den auf Säugetierzellen nahezu ubiquitären Rezeptor Pit-2 (Ram-1) (Miller and Chen, 1996). Ein Grund für die trotz ubiquitären Rezeptors niedrigere Transduktionseffizienz kann ein ineffizientes Binden des Retroviralen Vektors sein, das eventuell durch eine niedrigere Rezeptordichte auf der Oberfläche der Tumorzelle bedingt wird (Kurre et al., 1999). Um die Effizienz einer *in vivo* Therapie zu steigern, kann in der Verpackungszelle zusätzlich das G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus exprimiert werden. Beim Zusammenbau der Virionen wird es mit in die Virushülle eingefügt, stabilisiert dadurch die äußere Hülle des Kapsids und erweitert sein Infektionsspektrum (Yee et al., 1994).

Nach dem Eindringen kann MLV als Vertreter der C-Typ-Retroviren nur in der M-Phase des Zellzyklus seine Erbsubstanz in das Wirtsgenom einbauen. Zudem beträgt die Halbwertszeit eines MLV-Vektors im Cytoplasma nur ungefähr 6,8 Stunden (Lieber et al., 2000). Daher ist bei den sich langsamer als Mausfibroblasten teilenden Tumorzellen möglich, dass das Virus im Cytoplasma degradiert wird, bevor es in der nächsten M-Phase integrieren kann (Roe et al., 1993). Problematisch kann dies besonders bei einer einmaligen Injektion von retroviralen Vektoren sein. Im Falle einer kontinuierlichen Freisetzung der Viren, z.B. aus implantierten verkapselten, virus-produzierenden Zellen, sollten im Tumorbereich permanent genügend Viren vorhanden sein um eine sich teilende Zelle zu infizieren. Ein andere Möglichkeit zur Infektion sich nicht oder nur sehr langsam teilender Zellen, ist der Einsatz von lentiviralen Vektoren, z.B. basierend auf dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV), die durch zusätzliche akzessorische

Proteine auch ruhende Zellen infizieren können (Uchida et al., 1998).

Ein Infektion unter suboptimalen Bedingungen bedingt durch Mucus bzw. sich nur langsam teilende Zellen kann unter Umständen kompensiert werden, in dem das Verhältnis von Virus- zu Zellzahl (*multiplicity of infection, moi*) erhöht wird. Dies wurde durch Austesten verschiedener Verpackungszelllinien und anschließender Isolierung einzelner Klone mit hoher Virusproduktion erreicht. Unter den durchgeführten Bedingungen war die Virusproduktion durch PA317 und FlyA-Zellen geringer als mit den auf 2GP19Talf8P-Zellen beruhenden. Allerdings waren die bei PA317- und den FlyA-Zellen erreichten Titer deutlich geringer als in der Literatur (10^7 cfu/ml) beschrieben wurde (Cosset et al., 1995; Miller and Buttimore, 1986). Dies kann z.B. durch eine hohe Passagenzahl der verwendeten Verpackungszellen oder Unterschiede im Vergleich mit der publizierten Methode zur Titerbestimmung (siehe unten) bedingt sein. So hat Cosset et al., nur die Virusproduktion von Klonen gemessen, bei denen vorher Reverse Transkriptase-Aktivität gemessen wurde. Abgesehen davon wurde der Titer mittels Verdünnungsstufen bestimmt, die bei der hier durchgeführten, vor allem zwischen 2GP19Talf8P-, FlyA- und PA317-Zellen vergleichenden Studie nicht notwendig war. Bei Verwendung von Verdünnungsstufen kann jedoch eine Limitierung der Anzahl infizierbarer Zellen bei hoher MOI ausgeschlossen werden. Weiterhin werden die Infektion inhibierende Faktoren z.B. freies *env*-Protein oder Proteoglykane verdünnt (Nihrane et al., 1997, Le Doux, 1996 #16).

Von den isolierten auf 2GP19Talf8P beruhenden Klonen zeigten nur sechs der getesteten Klone eine Virusproduktion. Die transfizierten Plasmide, die den viralen Vektor enthalten, integrieren zufällig in das Wirtsgenom der Verpackungszelle. Dabei ist es möglich, dass zwar die Neomycin-Resistenzkassette intakt bleibt, jedoch essentielle virale *cis*-aktive Elemente zerstört wurden. Dadurch werden zwar noch die viralen Hüll- und Kapsidproteine von den 2GP19Talf8P-Zellen produziert, jedoch wird die synthetisierte RNA nicht verpackt. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass die Expression des Vektors vom Integrationsort beeinflusst wird. Eine Integration in der Nähe eines zellulären *enhancer* oder *silencer* kann unter Umständen die virale Promotoraktivität verstärken oder erniedrigen. Der Klon ALFcyp23 basiert auf 2GP19Talf8P-Zellen, in die das Plasmid pLCSN transfiziert wurde. Der Titer, der mit dem Klon ALFcyp23 erreicht wurde, liegt auch unter den Titern, die bereits für andere MLV-Verpackungssysteme beschrieben wurde (Cosset et al., 1995; Miller and Rosman, 1989). Als mögliche Gründe sind die gleichen zu nennen, wie sie bereits weiter oben beschrieben wurden.

4.2.2 Wirkung einer intrazellulären IFO-Aktivierung

Für die Untersuchung der IFO-Wirkung auf pankreatische Zelllinien, die CYP2B1-exprimieren, wurden stabil LCSN (vgl. Abbildung 53) infizierte Zellen in Gegenwart von 1 mM IFO kultiviert. Diese Konzentration erschien als sehr interessant, da sie auch unter Umständen im Serum von Patienten erreicht werden kann und zum zweiten haben die Ergebnisse bei der Untersuchung des *bystander effect* mit Hilfe eines *transwell system* (vgl. 2.2.3 C *transwell system*) gezeigt, dass bei 1 mM kaum Toxizität für die pankreatischen Zellen, die mit parentalen CrFK-Zellen kokultiviert wurden, bestand jedoch ein deutlicher cytotoxischer Effekt auf die pankreatischen Zellen auftrat, wenn sie in Gegenwart von C8III-1-Zellen wuchsen. Die stabil mit dem CYP2B1-transduzierenden Vektor LCSN infizierten Zellen zeigten bei diesem Experiment eine erhöhte Sensitivität gegenüber IFO, so dass die Überlebensrate im Vergleich zu den parentalen Zellen sank. Auf der anderen Seite war diese Verstärkung der Toxizität durch eine intrazelluläre IFO-Aktivierung bei den pankreatischen Zelllinien nur sehr gering (Faktor 1,1fach PACAcypI bis 2,2fach bei PANcypI in Abbildung 56). Im Vergleich mit den Zellklonen 22P1G, C8III-1 und NIHcypI-Population waren die Cytotoxizitätseffekte auf die pankreatischen Zelllinien bei 1 mM IFO geringer (vgl. Abbildung 56). Grund hierfür ist wahrscheinlich die geringere Produktion des CYP2B1-Proteins in den pankreatischen Zellen im Vergleich mit NIHcypI- und 22P1G-Zellen (vgl. Abbildung 58). Dafür kann eventuell eine geringere Promotoraktivität des MLV-LTRs in pankreatischen Zellen als in NIH3T3-Zellen ursächlich sein, bzw. eine stärkere Promotoraktivität des CMV-Promotors in CrFK- und 293-Zellen. Ein Hinweis für eine unterschiedliche Expression wurde in den einzelnen pankreatischen Zellen bei der Messung der *mean fluorescence intensity* (MFI) in LXSNegfp infizierten Zellen ersichtlich. NIH3T3-Zellen, die die höchste MFI aufwiesen, zeigten auch von allen untersuchten Populationen das stärkste Signal beim Western Blot bzw. höchste IFO-Sensitivität nach retroviralem CYP2B1-Gentransfer im Vergleich zu den pankreatischen Zelllinien. Ähnlich wie die CYP2B1-vermittelte Toxizitätsverstärkung war auch die in der FACS-Analyse gemessene MFI war bei allen pankreatischen Zelllinien ungefähr gleich hoch. Die schwache Promotoraktivität ist damit eine mögliche Erklärung für die geringe CYP2B1-vermittelte Verstärkung der IFO-Toxizität. Abgesehen davon können jedoch auch die mRNA- oder Proteinstabilität einen Einfluß nehmen (Hargrove and Schmidt, 1989; Saini et al., 1990).

Eine andere Möglichkeit für die unterschiedliche Überlebensrate der verschiedenen Zelltypen kann die Ausbildung von Resistenzen sein. Obwohl bereits gezeigt wurde, dass die Expression des *mdr1*-Gens keinen Resistenzmechanismus für eine Oxazaphosphorinbehandlung darstellt, scheint eine verstärkte Synthese der Glutathion-S-Transferase bzw. der Aldehyd-Dehydrogenase die Zelle vor der cytotoxischen Wirkung von Phosphoramidmustard zu schützen (Chen and Waxman, 1995; Lewis et al., 1988; Robson et al., 1987). Eine andere Möglichkeit sind

unterschiedlich ausgeprägte Reparaturmechanismen der einzelnen Zelltypen. Die durch Phosphoramidmustard induzierten *interstrand cross links* gehören zu den DNA-Veränderungen, die am häufigsten zum Tod der Zelle führen, jedoch wird ein Großteil der DNA-Veränderungen wahrscheinlich durch Exzissionsreparatur korrigiert (Lawley and Phillips, 1996; Murnane and Byfield, 1981; Sanderson and Shield, 1996). Noch häufiger ist die Korrektur von Acrolein induzierten Alkylierungen, die durch die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase repariert werden (Lawley and Phillips, 1996; Sanderson and Shield, 1996). So kann eine unterschiedliche Ausprägung der Reparaturfähigkeit einer Zelle auch Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber IFO nehmen. Bei anderen Cytostatika, die durch Induktion von Apoptose zum Tod der Zelle führen, scheint häufig auch der Zustand der Gene für p53 oder p21 einen entscheidenden Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zelle zu haben (Weller, 1998). Da IFO *in vitro* jedoch eine Nekrose induziert ist ein Einfluss von p21 und p53 auf eine Empfindlichkeit gegenüber aktiviertem IFO unwahrscheinlich. Cytochrom P450-Enzyme müssen vor ihrer Reaktion durch die Cytochrom P450-Reduktase (CYP-RED) in einen reduzierten Zustand überführt werden. Unter gewissen Umständen ist denkbar, dass in Tumorzellen die CYP-RED-Aktivität vermindert ist, so dass CYP2B1 nicht mehr in der Lage ist, IFO zu aktivieren und die Tumorzelle gegenüber einer CYP2B1/IFO-Therapie unempfindlich wird. In diesem Fall kann jedoch eine Koexpression von CYP-RED in den Tumorzellen die IFO-Aktivierung steigern und damit den cytotoxischen Effekt verstärken (Chen et al., 1997; Waxman et al., 1999). Eine andere Möglichkeit zur Verstärkung des cytotoxischen Effekts kann durch Kombination von intrazellulärer (mittels CYP2B1-Transduktion) und extrazellulärer (mittels *bystander effect*) IFO-Aktivierung erfolgen. Diese Verstärkung konnte durch den zusätzlichen cytotoxischen Effekt durch Koaktivierung von IFO durch PANCcypI- und benachbarte C8III-1-Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 59).

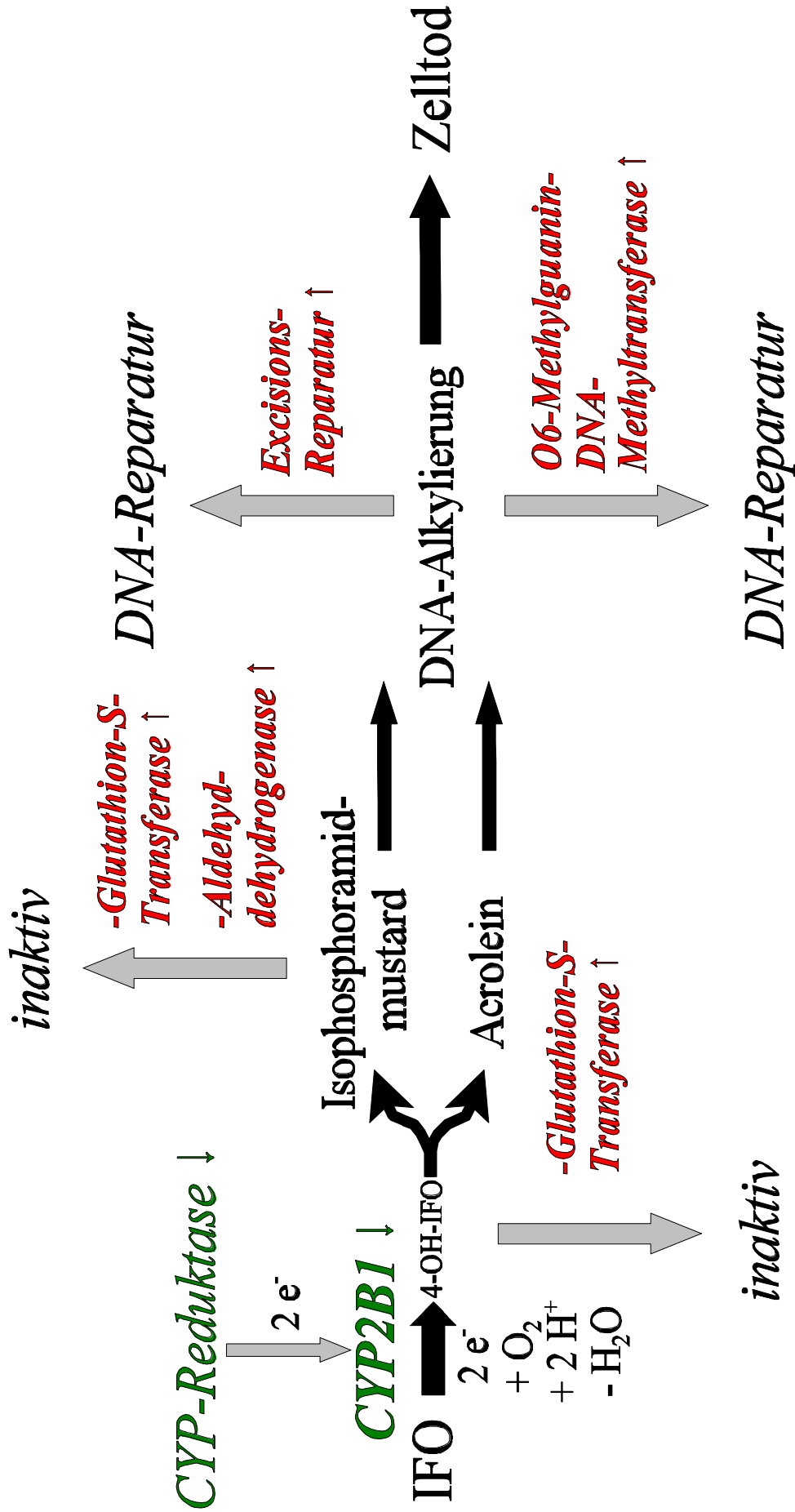


Abbildung 65: Resistenzmechanismen gegenüber einer IFO-Behandlung

4.2.3 Wirkung einer Retrovirus vermittelte CYP2B1/IFO-Behandlung *in vivo*

Um die Wirksamkeit dieses Retrovirus vermittelten CYP2B1-Gentransfers *in vivo* demonstrieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Modelle auf ihre Anwendbarkeit und Aussagekraft hin untersucht: (i) humane PACA44-Zellen erzeugten in immundefizienten Scid/*bg*-Mäusen schnell wachsende Primärtumoren, die nicht zur Metastasierung neigten. (ii) Im Gegensatz dazu entwickelten PAN02-Zellen in Scid/*bg*-Mäusen fast keinen Primärtumor, jedoch innerhalb weniger Tage letale Metastasen. (iii) Das Modell, das der Situation im Menschen am meisten ähnelt, sind PAN02-Zellen, die in syngenem immunkompetenten C57Black/6-Mäusen ductale pankreatische Tumoren erzeugen. Bei diesem Modell entwickeln die Mäuse deutliche Primärtumoren, die mit zunehmender Größe invasiv wachsen und im weiteren Verlauf metastasieren.

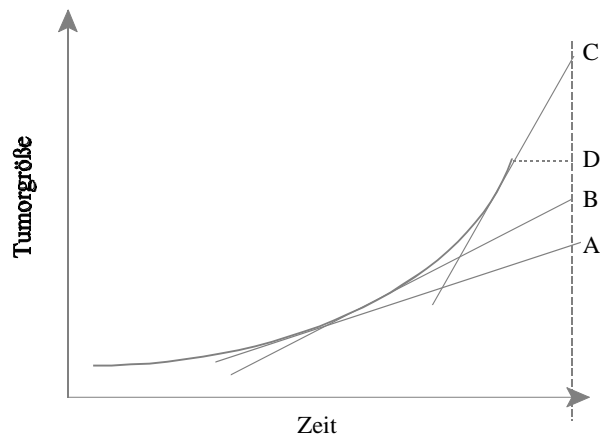


Abbildung 66: Modellberechnungen zur Bestimmung der theoretischen Tumorgöße nach dem Tod einer Maus

Gezeigt wird die idealisierte exponentielle Zunahme des Tumordurchmessers innerhalb des Untersuchungszeitraums, sowie die Steigungen am Beginn des Tumorwachstums A, des terminalen Tumorwachstums B. Für die durchgeführten Experimente (vgl. Abbildung ???) wurde eine Modellkalkulation D verwendet, bei dem die letzte noch exakt messbare Tumorgöße als konstant angesehen wurde.

Dieses invasive Wachstum von Tumoren aus PAN02-Zellen in C57Black/6-Mäusen erwies sich bei der Bestimmung des Tumorwachstums als problematisch. Manche Tumoren wuchsen so invasiv, dass sie nicht mehr genau vermessen werden konnten. Um dennoch eine Annäherung zur Charakteristik des Tumorwachstums zu haben, standen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl (vgl. Abbildung 66). Bei einem Tumor, der am Anfang des Versuchs sich einer genauen Messung entzog und bei Annahme, dass das ursprüngliche Tumorwachstum konstant blieb, wird wahrscheinlich die Tumorgöße am Ende des Experimentes unterschätzt (vgl. Abbildung 66, Punkt A). Ähnlich ist dies auch bei einer einfachen rechnerischen Mittelung der Steigung über den

ganzen Zeitraum (Punkt B). Da das Tumorwachstum nicht immer linear verläuft, ist es auf der anderen Seite möglich, dass die zuletzt angenommene Steigung (C) eventuell nicht repräsentativ sind und damit das Ergebnis verfälscht wird. Aus diesem Grund wurde der zuletzt gemessene Tumordurchmesser auch für die restlichen Untersuchungstage als konstant angenommen (D). Bei einer vergleichenden Berechnung zeigte sich, dass die Unterschiede beim Ergebnis zwischen der Berechnungsmethode (B, Mittelung der Steigung) und (D, feste Endgröße) nur minimal waren.

Für die erste Untersuchung der Wirkung einer intrazellulären Aktivierung *in vivo* wurden LCSN präinfizierte CYP2B1-exprimierende PAN02-Zellen (PANcypI) in C57Black/6-Mäuse injiziert. An jeder Injektionsstelle entwickelte sich innerhalb weniger Tage ein Tumor. Bei diesem Modell ist jede einzelne Tumorzelle beim Beginn der IFO-Behandlung mit dem Vektor LCSN *ex vivo* infiziert worden. Zwar handelt es sich hierbei um eine gemischte Population, wie sie während einer *in vivo*-Infektion auch angenommen werden kann, jedoch ist bei einer *in vivo*-Infektion selbst bei optimalen Bedingungen nie eine 100 %ige Durchinfektion des gesamten Tumorgewebes zu erwarten. Es handelte sich hierbei um einen optimierten Versuchsansatz. Unter diesen Bedingungen konnte die Tumorstadiumsgeschwindigkeit durch Zugabe von IFO auf ein Viertel gesenkt werden. Im Vergleich dazu reduzierte eine IFO-Therapie, die ausschließlich auf einer hepatozellulären IFO-Aktivierung beruht, die Tumorstadiumsgeschwindigkeit auf ca. die Hälfte (parentale PAN02-Zellen). Bei *ex vivo* präinfizierten Zellen, die jedoch mit dem Leervektor ohne CYP2B1 infiziert wurden, trat nur eine marginale Reduktion des Tumorstadiums auf (1,2fache Reduktion). Für PANlxsNI- und PANcypI-Zellen war die *in vitro*-Vorbehandlung identisch. Um die Wirkung einer IFO-Toxizität nach zellulärer CYP2B1-abhängiger Aktivierung zu beurteilen, sollte daher das Tumorstadium von PANcypI-Zellen vor allem mit dem von PANlxsNI-Zellen verglichen werden. Ein Grund für das schnellere Tumorstadium in Abwesenheit von IFO der beiden *ex vivo* präinfizierten Zelllinien (PANcypI und PANlxsNI) im Vergleich mit den parentalen Zellen (PAN02) kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass MLV-Vektoren nur sich teilende Zellen infizieren und mit einer Selektion auf eine stabile Integration des MLV-Vektor *in vitro* auch sich schnell teilende Zellen angereichert werden. Diese sich schneller teilenden Zellen induzieren eventuell *in vivo* schneller wachsende Tumoren.

Die einzige Gruppe von Versuchstieren, mit bis zuletzt meßbaren Tumoren, waren die Mäuse, die mit CYP2B1/IFO behandelt wurden. In allen anderen Gruppen wuchsen die Tumoren so invasiv oder Mäuse musste vorzeitig getötet werden, so dass die Tumorstadiumgröße nicht mehr genau ermittelt werden konnte. Es ist daher zu erwarten, dass mit einer exakteren Tumorstadiumgrößenvermessung in den Gruppen, in denen bereits vorzeitig Tumoren nicht gemessen werden konnten, die Zunahme der Tumorstadiumdurchmessers noch schneller gewesen wäre, was wiederum den Unterschied zu den CYP2B1-exprimierenden Tumoren noch mehr hervorgehoben hätte.

Trotz des partiellen Erfolgs von intratumoraler IFO-Aktivierung in den PANcypI-Tumoren wurde keine Maus komplett geheilt. Verglichen mit der Studie in Rostock, in der PACA44-Zellen in Nacktmäuse injiziert wurden und immerhin 19 % der Mäuse ein komplettes Verschwinden der Tumoren aufwiesen und bei allen anderen Mäusen zumindest eine partielle Tumorreduktion zu sehen war, ist dieses Ergebnis deutlich schlechter. Grund hierfür ist wahrscheinlich die geringe Aktivität des MLV-Promotors in den verwendeten pankreatischen Zelllinien (PANcypI-Zellen) im Vergleich zu der starken Aktivität des CMV-Promotors in 293-Zellen (22P1G-Zellen) (vgl. Abbildung 58). Man kann versuchen die schwache Expression unter Verwendung geeigneter retroviraler Vektorsystem (z.B. ProCon-Vektoren) in Verbindung mit starken, evtl. gewebespezifischen Promotoren zu verbessern und damit die Umsetzung von IFO zu steigern. Eine andere Möglichkeit für das unzureichende Ansprechen des syngenen Modells auf die Therapie ist das komplett andere Modellsystem. So bilden PAN02-Zellen im Vergleich mit PACA44-Zellen relativ langsam wachsende Tumoren, die eine höhere Zelldichte und Festigkeit als Tumoren aus PACA44-Zellen besitzen. Wie auch die meisten humanen pankreatischen Karzinome sind PAN02-Zellen gegen eine Vielzahl von antitumorigen wirkenden Medikamenten (Cytostatika) einschließlich CPA resistent (Priebe et al., 1992). So kann ein Grund für das schlechte Ansprechen der IFO-Therapie eine partielle Kreuzresistenz zwischen CPA und IFO sein (Brade et al., 1986). Auf der anderen Seite war bei den vorher durchgeführten *in vitro*-Cytotoxizitätsexperimenten mit präinjizierten pankreatischen Tumorzellen das Verhalten der PACA44- und PAN02-Zellen anders. PACA44-Zellen zeigten bei CYP2B1-vermittelter Aktivierung kaum einen zusätzlichen cytotoxischen Effekt, während PAN02-Zellen den höchsten additiven cytotoxischen Effekt aller getesteten pankreatischen Zelllinien nach einer intrazellulären IFO-Aktivierung aufwiesen. Um die Therapie *in vivo* zu verbessern kann die Kombination einer endogenen Aktivierung mit einer durch enkapsulierte Zellen vermittelten (extrazellulären) IFO-Aktivierung untersucht werden. *In vitro*-Experimente mit humanen pankreatischen Tumorzellen haben einen additiven therapeutischen Effekt bei intra- und extrazellulärer IFO-Aktivierung bestätigt. Dieser mag dadurch zustande kommen, dass (i) eine Subpopulation IFO-sensitiver Zellen keine nennenswerte intrazelluläre IFO-Aktivierung haben und dadurch auf extrazelluläres aktivierte IFO angewiesen sind (*bystander effect*), bzw. (ii) dass Zellen extrazelluläres 4OH-IFO schlechter aufnehmen und dann die intrazelluläre Aktivierung entscheidend für einen toxischen Effekt wird.

Die Aktivierung von IFO erfolgt durch eine Hydroxylierung, die mit einem Elektronentransfer von CYP2B1 auf die Prodroge verbunden ist. CYP2B1 erhält die Elektronen von einer auch in der ER-Membran lokalisierten Cytochrome P450-Reduktase (CYP-RED), die unter Umständen der limitierende Faktor bei der Aktivierung von Oxazaphosphorinen sein kann. Sollte in den PAN02-Tumoren die Expression CYP-RED ein limitierender Faktor sein, kann das entsprechende Gen kotransduziert werden (Waxman et al., 1999). Eine andere Möglichkeit ist die intrazelluläre Expression des Somatostatin-Rezeptors, wodurch die Tumorzelle gegenüber der antiproliferativen Wirkung des pankreatischen Somatostatins empfindlich wird (Rochaix et al., 1999). Vielversprechend ist weiterhin eine Stimulation des Immunsystems durch Expression des

heat shock protein 70 (HSP70), wodurch nekrotisches Gewebe leichter als pathologisch durch das zelluläre Immunsystem erkannt und unter Umständen die Tumortoleranz im Körper gebrochen werden kann (Melcher et al., 1999).

5 Zusammenfassung

Trotz ständiger Verbesserung der konventionellen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung des humanen Pankreaskarzinoms rangiert diese relativ seltene Erkrankung auf Platz vier der Krebs verursachten Todesfälle. Bisherige Behandlungsmöglichkeiten sind die Resektion, die allerdings nur bei ca 10 % der Patienten möglich ist, eine Strahlen- oder Chemotherapie. Bei einer konventionellen Chemotherapie mit Ifosfamid wird dieses Cytostatikum fast ausschließlich in der Leber aktiviert und muß damit über den Blutkreislauf an den Wirkort (Tumor) gelangen. Während dieses Transports reagiert ein Teil des kurzlebigen aktivierten IFOs mit gesundem Gewebe, wodurch die antitumorogene Wirkung verringert wird und Nebenwirkungen auftreten können. Daher wäre es sinnvoll eine direkte Aktivierung von IFO im Tumorgewebe zu bewirken um damit die antitumorigen Wirkung zu steigern bzw. die Nebenwirkungen zu reduzieren.

Die zellvermittelte IFO-Aktivierung durch das hepatische Enzym Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) wurde in Klone verschiedener Zelllinien, die stabil die CYP2B1-cDNA von einem nicht-viralen Vektor exprimieren, untersucht. Die Präsenz und Funktion des CYP2B1-Proteins konnte mittels Western-Blot und eines enzymatischen Nachweissystems demonstriert werden. Durch Zugabe von IFO konnte eine Population CYP2B1-exprimierender Zellen in ihrem Wachstum *in vitro* stark gehemmt werden. Diese cytotoxische Wirkung betraf auch umgebenden nicht CYP2B1-exprimierende Zellen (*bystander effect*). Unter Vermeidung eines direkten Zell-Zell-Kontakts konnten als Ursache für die toxische Wirkung frei diffundierbare Metaboliten nachgewiesen werden. Ein Teil der Zellen, die von der toxischen Wirkung betroffen waren, zeigten im späteren Verlauf morphologische Veränderungen, die sich deutlich von denen apoptotischer Zellen unterschieden und damit der Nekrose zuzuordnen sind.

In Zusammenarbeit mit der Universität Rostock wurden CYP2B1-exprimierende Zellen, die zuvor in Zellulosesulfatkapseln verpackt wurden, in humane Pankreastumoren von Nacktmäusen implantiert und dadurch eine deutliche Verstärkung eines antitumoralen Effekts nach systemischer Chemotherapie mit IFO im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie nachgewiesen. Zusammen mit der Universität Rostock und dem Allgemeinen Krankenhaus Wien wurde eine Methode zur mikroinvasiven intraarteriellen Instillation verkapselter Zellen in das humane Pankreas an einem porcinen Modell etabliert. Diese Ergebnisse waren Basis für eine klinische Studie der Phase I, in der verkapselte CYP2B1-exprimierende Zellen in das humane Pankreas implantiert wurden und anschließend die Patienten systemisch mit IFO behandelt wurden. Dabei konnte die mittlere Überlebensrate im Vergleich zu retrospektiven Daten einer vergleichbaren Kontrollgruppe fast verdoppelt werden. Gleichzeitig wurde die Einjahresüberlebensrate im Vergleich mit unbehandelten Patienten verdreifacht bzw. gegenüber Patienten, die das derzeit wirkungsvollste Chemotherapeutikum für pankreatische Karzinome - Gemzar - erhielten, verdoppelt.

Zur Verbesserung der intratumoralen IFO-Aktivierung wurden CYP2B1-transduzierende retrovirale Vektoren basierend auf dem murinen Leukämievirus (MLV), hergestellt. Pankreatische Tumorzellen zeigten nach Infektion mit diesen Viren im Vergleich zu leicht infizierbaren Mausfibroblasten eine geringere Infektionseffizienz und eine niedrigere Aktivität des MLV-Promotors. Dennoch konnte für CYP2B1-transduzierte pankreatische Tumorzellpopulationen, eine CYP2B1-vermittelte erhöhte Sensitivität gegenüber IFO nachgewiesen werden. Um die Wirkung dieser schwachen intrazellulären IFO-Aktivierung in Tumorzellen *in vivo* untersuchen zu können, wurden mehrere murine Pankreastumormodelle etabliert. In einem syngenen Tumormodell wurden schließlich parentale oder CYP2B1-transduzierte pankreatische Tumorzellen in immunkompetente Mäuse injiziert und daraus subkutane Tumoren etabliert. Bei der anschließenden IFO-Behandlung wuchsen CYP2B1-transduzierte Tumoren langsamer als Tumoren, die aus nicht-CYP2B1-exprimierenden Zellen entstanden.

Es wurde somit ein System für eine zellvermittelte Gentherapie für pankreatische Tumoren etabliert und *in vitro*, *in vivo* und in einer klinischen Studie in Zusammenarbeit mit anderen Gruppen untersucht. Um die Wirksamkeit weiter zu verbessern wurde die Möglichkeit einer Gentherapie mittels einer zusätzlichen Übertragung des Suizidgens durch retrovirale Vektoren getestet. Obwohl dieser Ansatz durch eine bessere Suizidgenexpression in pankreatischen Tumoren mittels geeigneter Promotoren noch weiter optimiert werden muss, konnte das *“proof of concept”* mit dieser Arbeit etabliert werden.

6 Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab, Z., Weltz, C., Hester, D., Pickett, N., Vervaert, C., Barber, J. R., Jolly, D., and Seigler, H. F. (1997): A Phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene- modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 80, pp. 401-12.

Aghi, M., Chou, T. C., Suling, K., Breakefield, X. O., and Chiocca, E. A. (1999): Multimodal cancer treatment mediated by a replicating oncolytic virus that delivers the oxazaphosphorine/rat cytochrome P450 2B1 and ganciclovir/herpes simplex virus thymidine kinase gene therapies. *Cancer Res* 59, pp. 3861-5.

Agrawal, A. K., and Shapiro, B. H. (1996): Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2: pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Mol Pharmacol* 49, pp. 523-31.

Alison, M., and Sarraf, C. (1997): *Understanding Cancer*, (Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge).

Allen, L. M., Creaven, P. J., and Nelson, R. L. (1976): Studies on the human pharmacokinetics of isophosphamide (NSC-109724). *Cancer Treat Rep* 60, pp. 451-8.

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988): Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53, pp. 549-54.

Artzt, K. (1972): Breeding and husbandry of "nude" mice. *Transplantation* 13, pp. 547-9.

Atfi, A., Buisine, M., Mazars, A., and Gespach, C. (1997): Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 272, pp. 24731-4.

Bailey, S. M., and Hart, I. R. (1997): Nitroreductase activation of CB1954--an alternative 'suicide' gene system. *Gene Ther* 4, pp. 80-81.

Bailey, S. M., Knox, R. J., Hobbs, S. M., Jenkins, T. C., Mauger, A. B., Melton, R. G., Burke, P. J., Connors, T. A., and Hart, I. R. (1996): Investigation of alternative prodrugs for use with *E. coli* nitroreductase in 'suicide gene' approaches to cancer therapy. *Gene Ther* 3, pp. 1143-1150.

Barinaga, M. (1998): Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* 281, pp. 1302-3.

Bartkova, J., Lukas, J., and Bartek, J. (1997): Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3, pp. 211-20.

Baskar, S. (1996): Gene-modified tumor cells as cellular vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 43, pp. 165-73.

Baumann, J. G., Gunzburg, W. H., and Salmons, B. (1998): CrFK feline kidney cells produce an RD114-like endogenous virus that can package murine leukemia virus-based vectors. *J Virol* 72, pp. 7685-7.

Beaujeux, R., Laurent, A., Wassef, M., Casasco, A., Gobin, Y. P., Aymard, A., Rufenacht, D., and Merland, J. J. (1996): Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, II: preliminary clinical evaluation in tumors and arteriovenous malformations. *AJNR Am J Neuroradiol* 17, pp. 541-8.

Bellamy, C. O. (1997): p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 53, pp. 522-38.

Bernabé, E. G., Ferrandiz, S., Font, F., and Serra, L. (1998): Anatomie, (Barcelona: Instituto Monsa De Ediciones).

Bordignon, C. (1998): A new chance for SCID gene therapy. *Nat Med* 4, pp. 19-20.

Bordignon, C., Carlo-Stella, C., Colombo, M. P., De Vincentiis, A., Lanata, L., Lemoli, R. M., Locatelli, F., Olivieri, A., Rondelli, D., Zanon, P., and Tura, S. (1999): Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 84, pp. 1110-1149.

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, pp. 521-30.

Bosma, G. C., Custer, R. P., and Bosma, M. J. (1983): A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, pp. 527-30.

Bouvet, M., Ellis, L. M., Nishizaki, M., Fujiwara, T., Liu, W., Bucana, C. D., Fang, B., Lee, J. J., and Roth, J. A. (1998): Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 58, pp. 2288-92.

Brade, W., Seeber, S., and Herdrich, K. (1986): Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 18, pp. S1-S9.

Brenner, M. K., Cunningham, J. M., Sorrentino, B. P., and Heslop, H. E. (1995): Gene transfer into human hemopoietic progenitor cells. *Br Med Bull* 51, pp. 167-91.

Bridgewater, J. A., Springer, C. J., Knox, R. J., Minton, N. P., Michael, N. P., and Collins, M. K. (1997): Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur J Cancer* 31A, pp. 2362-2370.

Brock, N., Hilgard, P., Peukert, M., Pohl, J., and Sindermann, H. (1988): Basis and new developments in the field of oxazaphosphorines. *Cancer Invest* 6, pp. 513-32.

Brower, V., Chahine, K., Dorey, E., Dove, A., Francisco, M., Hodgson, J., Michael, A., and Marshall, A. (1998): All clear for HIV-targeting ribozyme in phase II. *Nat Biotechnol* 16, pp. 123.

Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., and Von Hoff, D. D. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15, pp. 2403-13.

Caldas, C., Hahn, S. A., da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J., and Kern, S. E. (1994): Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8, pp. 27-32.

Casper, E. S., Green, M. R., Kelsen, D. P., Heelan, R. T., Brown, T. D., Flombaum, C. D., Trochanowski, B., and Tarassoff, P. G. (1994): Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 12, pp. 29-34.

Cavallo, F., Martin-Fontecha, A., Bellone, M., Heltai, S., Gatti, E., Tornaghi, P., Freschi, M., Forni, G., Dellabona, P., and Casorati, G. (1995): Co-expression of B7-1 and ICAM-1 on tumors is required for rejection and the establishment of a memory response. *Eur J Immunol* 25, pp. 1154-62.

Cepko, C. L., Ryder, E. F., Austin, C. P., Walsh, C., and Fekete, D. M. (1993): Lineage analysis using retrovirus vectors. *Methods Enzymol* 225, pp. 933-60.

Chang, P. L. (1997): Microcapsules as bio-organs for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 831, pp. 461-73.

Chang, T. K., Weber, G. F., Crespi, C. L., and Waxman, D. J. (1993): Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* 53, pp. 5629-37.

Chang, T. M., and Prakash, S. (1998): Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells. *Mol Med Today* 4, pp. 221-7.

Channon, K. M., and George, S. E. (1997): Improved adenoviral vectors: cautious optimism for gene therapy. *Qjm* 90, pp. 105-9.

Chase, M., Chung, R. Y., and Chiocca, E. A. (1998): An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat Biotechnol* 16, pp. 444-8.

Chen, G., and Waxman, D. J. (1995): Identification of glutathione S-transferase as a determinant of 4-hydroperoxycyclophosphamide resistance in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 49, pp. 1691-1701.

Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Ledbetter, J. A., McGowan, P., and Linsley, P. S. (1992): Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71, pp. 1093-102.

Chen, L., Waxman, D. J., Chen, D., and Kufe, D. (1996): Sensitization of Human Breast Cancer Cells to Cyclophosphamide and Ifosfamide by Transfer of a Liver Cytochrome P450 Gene. *Cancer Res* 56, pp. 1331-40.

Chen, L., and Waxman, J. (1995): Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer Res* 55, pp. 581-589.

Chen, L., Yu, L. J., and Waxman, D. J. (1997): Potentiation of cytochrome P450/cyclophosphamide-based cancer gene therapy by coexpression of the P450 reductase gene. *Cancer Res* 57, pp. 4830-4837.

Chen, Z. H., Olopade, O. I., and Savarese, T. M. (1997): Expression of methylthioadenosine phosphorylase cDNA in p16-, MTAP- malignant cells: restoration of methylthioadenosine phosphorylase-dependent salvage pathways and alterations of sensitivity to inhibitors of purine de novo synthesis. *Mol Pharmacol* 52, pp. 903-11.

Chiang, H. S., Yang, R. S., Lin, S. W., and Huang, T. F. (1998): Tissue factor activity of SW-480 human colon adenocarcinoma cells is modulated by thrombin and protein kinase C activation. *Br J Cancer* 78, pp. 1121-7.

Chick, W. L., Warren, S., Chute, R. N., Like, A. A., Lauris, V., and Kitchen, K. C. (1977): A transplantable insulinoma in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, pp. 628-32.

Cirenei, N., Colombo, B. M., Mesnil, M., Benedetti, S., Yamasaki, H., and Finocchiaro, G. (1998): In vitro and in vivo effects of retrovirus-mediated transfer of the connexin 43 gene in malignant gliomas: consequences for HSVtk/GCV anticancer gene therapy. *Gene Ther* 5, pp. 1221-6.

Classen, M., Diehl, V., and Kochsiek, K. (1994): *Innere Medizin*, 3 Edition, (München - Wien - Baltimore: Urban & Schwarzenberg).

Code, E. L., Crespi, C. L., Penman, B. W., Gonzalez, F. J., Chang, T. K., and Waxman, D. J. (1997): Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos* 25, pp. 985-93.

Cohen, J. J. (1993): Apoptosis. *Immunol Today* 14, pp. 126-30.

Cohen, J. J. (1993): Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)* 28, pp. 35-43.

Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, pp. 2110-4.

Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A. C. (1981): Construction of a dominant selective marker useful for gene transfer studies in animal cells. *Dev Biol Stand* 50, pp. 323-6.

Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A. C. (1981): A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J Mol Biol* 150, pp. 1-14.

Collaco, R. F., Cao, X., and Trempe, J. P. (1999): A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* 238, pp. 397-405.

Cone, R. D., and Mulligan, R. C. (1984): High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, pp. 6349-53.

Connors, T. A. (1995): The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther* 2, pp. 702-709.

Corbett, T. H., Roberts, B. J., Leopold, W. R., Peckham, J. C., Wilkoff, L. J., Griswold, D. P. J., and Schabel, F. M. J. (1984): Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 44, pp. 717-726.

Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A., and Collins, M. K. (1995): High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 69, pp. 7430-6.

Crandell, R. A., Fabricant, C. G., and Nelson-Rees, W. A. (1973): Development, characterization, and virus susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *in vitro* 9, pp. 176-185.

Dai, R., Pincus, M. R., and Friedman, F. K. (1998): Molecular modeling of cytochrome P450 2B1: mode of membrane insertion and substrate specificity. *J Protein Chem* 17, pp. 121-9.

Dautzenberg, H., Schuldt, U., Grasnack, G., Karle, P., Müller, P., Löhr, M., Pelegrin, M., Piechaczyk, M., Rombs, K. V., Günzburg, W. H., Salmons, B., and Saller, R. M. (1999): Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. *Ann N Y Acad Sci* 875, pp. 46-63.

Davidoff, A. N., and Mendelow, B. V. (1993): Cell-cycle disruptions and apoptosis induced by the cyclophosphamide derivative mafosfamide. *Exp Hematol* 21, pp. 922-7.

Davis, B. M., Koc, O. N., Lee, K., and Gerson, S. L. (1996): Current progress in the gene therapy of cancer. *Curr Opin Oncol* 8, pp. 499-508.

Day, J. D., DiGiuseppe, J. A., Yeo, C., Lai-Goldman, M., Anderson, S. M., Goodman, S. N., Kern, S. E., and Hruban, R. H. (1996): Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 27, pp. 119-24.

DeCaprio, J. A., Mayer, R. J., Gonin, R., and Arbuck, S. G. (1991): Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously untreated patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas: results of a phase II trial. *J Clin Oncol* 9, pp. 2128-33.

DiGiuseppe, J. A., Hruban, R. H., Goodman, S. N., Polak, M., van den Berg, F. M., Allison, D. C., Cameron, J. L., and Offerhaus, G. J. (1994): Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 101, pp. 684-8.

DiGiuseppe, J. A., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., Clement, M. J., van den Berg, F. M., Cameron, J. L., and van Mansfeld, A. D. (1994): Detection of K-ras mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 144, pp. 889-95.

Dilber, M. S., and Smith, C. I. (1997): Suicide genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther* 4, pp. 273-4.

Donato, M. T., Gomez Lechon, M. J., and Castell, J. V. (1992): The CytoFlour™ 2350 Fluorescence Measurement System. Millipore: Technical Brief, pp. .

Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., and Castell, J. V. (1993): A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 213, pp. 29-33.

Duflot-Dancer, A., Piccoli, C., Rolland, A., Yamasaki, H., and Mesnil, M. (1998): Long-term connexin-mediated bystander effect in highly tumorigenic human cells in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther* 5, pp. 1372-8.

Dugan, M. C., Dergham, S. T., Kucway, R., Singh, K., Biernat, L., Du, W., Vaitkevicius, V. K., Crissman, J. D., and Sarkar, F. H. (1997): HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 14, pp. 229-36.

Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959): *Virology* 8, pp. 396.

Efstathiou, S., and Minson, A. C. (1995): Herpes virus-based vectors. *Br Med Bull* 51, pp. 45-55.

Fallaux, F. J., and Hoeben, R. C. (1996): Gene therapy for the hemophilias. *Curr Opin Hematol* 3, pp. 385-9.

FDA, F. a. D. A. (1999): Human Gene Marker/Therapy Clinical Protocols. *Hum Gene Ther*, pp. 1074-92.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, pp. 7413-7.

Ferguson, L. R., and Pearson, A. E. (1996): The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat Res* 355, pp. 1-12.

Field, A. K., Davies, M. E., DeWitt, C., Perry, H. C., Liou, R., Germershausen, J., Karkas, J. D., Ashton, W. T., Johnston, D. B., and Tolman, R. L. (1983): 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, pp. 4139-43.

Fields, B., and Knipe, D. (1991): *Fundamental Virology*, 2. Edition, (New York: Raven Press Ltd.).

Fine, R. L. (1988): Multidrug resistance. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 10, pp. 73-84.

Fleming, R. A. (1997): An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy* 17, pp. 146S-54S.

Forestell, S. P., Dando, J. S., Chen, J., de Vries, P., Bohnlein, E., and Rigg, R. J. (1997): Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Ther* 4, pp. 600-610.

Frank, D. K., Frederick, M. J., Liu, T. J., and Clayman, G. L. (1998): Bystander effect in the adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy model of human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 4, pp. 2521-8.

Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tsichlis, P. N. (1995): The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, pp. 727-36.

Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L., and Abraham, G. N. (1993): The "bystander effect": tumor regression when a

fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 53, pp. 5274-5283.

Furuwatari, C., Yagi, A., Yamagami, O., Ishikawa, M., Hidaka, E., Ueno, I., Furihata, K., Ogiso, Y., and Katsuyama, T. (1998): A comprehensive system to explore p53 mutations. *Am J Clin Pathol* 110, pp. 368-73.

Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999): Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, pp. 1249-55.

Gao, X., and Huang, L. (1995): Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2, pp. 710-22.

Garabrant, D. H., Kinnard, M., Schenk, M. J., Fryzek, J., and Braselton, E. (1998): Epidemiology of Pancreatic Cancer: Environmental and Medical Risk Factors. *Pancreatic Cancer*, F. H. Srkar and M. Dugan, eds.: Eaton Publishing), pp. 3-11.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, pp. 493-501.

Gilard, V., Martino, R., Malet-Martino, M., Niemeyer, U., and Pohl, J. (1999): Chemical stability and fate of the cytostatic drug ifosfamide and its N-dechloroethylated metabolites in acidic aqueous solutions. *J Med Chem* 42, pp. 2542-60.

Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K. I. (1995): Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J Virol* 69, pp. 6917-6924.

Glorioso, J. C., Goins, W. F., Schmidt, M. C., Oligino, T., Krisky, D. M., Marconi, P. C., Cavalcoli, J. D., Ramakrishnan, R., Poliani, P. L., and Fink, D. J. (1997): Engineering herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Adv Pharmacol* 40, pp. 103-36.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, pp. 59-74.

Graham, F. L., van der Eb, A. J., and Heijneker, H. L. (1974): Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* 251, pp. 687-91.

Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21, pp. 1465-8.

Grau, A. M., Zhang, L., Wang, W., Ruan, S., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Zhang, W., and Chiao, P. J. (1997): Induction of p21^{waf1} expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 57, pp. 3929-34.

Green, N. K., Youngs, D. J., Neoptolemos, J. P., Friedlos, F., Knox, R. J., Springer, C. J., Anlezark, G. M., Michael, N. P., Melton, R. G., Ford, M. J., Young, L. S., Kerr, D. J., and Searle, P. F. (1997): Sensitization of colorectal and pancreatic cancer cell lines to the prodrug 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by retroviral transduction and expression of the *E. coli* nitroreductase gene. *Cancer Gene Ther* 4, pp. 229-38.

Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1999): Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther* 10, pp. 2445-50.

Guarini, A., Gansbacher, B., Cronin, K., Fierro, M. T., and Foa, R. (1995): IL-2 gene-transduced human HLA-A2 melanoma cells can generate a specific antitumor cytotoxic T-lymphocyte response. *Cytokines Mol Ther* 1, pp. 57-64.

Gunzburg, W. H., and Salmons, B. (2000): Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought? *Mol Med Today* 6, pp. 199-208.

Günzburg, W. H., and Salmons, B. (1997): Gentransfer in Säugetierzellen, (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Günzburg, W. H., and Salmons, B. (1995): Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1, pp. 410-7.

Haber, D. A., and Fearon, E. R. (1998): The promise of cancer genetics. *Lancet* 351 *Suppl* 2, pp. SIII-8.

Hall, P. A., and Lane, D. P. (1994): p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?--Revisited! *J Pathol* 172, pp. 1-4.

Halloran, P. J., and Fenton, R. G. (1998): Irreversible G2-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues. *Cancer Res* 58, pp. 3855-65.

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, pp. 557-80.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996): Regulation of

p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16, pp. 859-67.

Harada, J. N., and Berk, A. J. (1999): p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* 73, pp. 5333-44.

Hargrove, J. L., and Schmidt, F. H. (1989): The role of mRNA and protein stability in gene expression. *Faseb J* 3, pp. 2360-70.

Hartree, E. F. (1972): A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Analyt Biochem* 48, pp. 422-427.

Haseloff, J., and Gerlach, W. L. (1988): Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334, pp. 585-91.

He, Y. Q., He, Y. A., and Halpert, J. R. (1995): Escherichia coli expression of site-directed mutants of cytochrome P450 2B1 from six substrate recognition sites: substrate specificity and inhibitor selectivity studies. *Chem Res Toxicol* 8, pp. 574-9.

Hengstler, J. G., Tanner, B., Moller, L., Meinert, R., and Kaina, B. (1999): Activity of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer* 84, pp. 388-95.

Herman, J. G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R. G., Issa, J. P., Davidson, N. E., Sidransky, D., and Baylin, S. B. (1995): Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55, pp. 4525-30.

Hesdorffer, C., Antman, K., Bank, A., Fetell, M., Mears, G., and Begg, M. (1994): Human MDR gene transfer in patients with advanced cancer. *Hum Gene Ther* 5, pp. 1151-60.

Hitt, M. M., Addison, C. L., and Graham, F. L. (1997): Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol* 40, pp. 137-206.

Holub, M., Rossmann, P., Tlaskalova, H., and Vidmarova, H. (1975): Thymus rudiment of the athymic nude mouse. *Nature* 256, pp. 491-3.

Hornsby, P. J., and Salmons, B. (1994): Oncogene-expressing cell lines from steroidogenic tissues. *Protocols in Cell and Tissue Culture*,: John Wiley Press), pp. 1-5.

Hruban, R. H., van Mansfeld, A. D., Offerhaus, G. J., van Weering, D. H., Allison, D. C.,

Goodman, S. N., Kensler, T. W., Bose, K. K., Cameron, J. L., and Bos, J. L. (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143, pp. 545-54.

Huang, Z., Raychowdhury, M. K., and Waxman, D. J. (2000): Impact of liver P450 reductase suppression on cyclophosphamide activation, pharmacokinetics and antitumoral activity in a cytochrome P450-based cancer gene therapy model. *Cancer Gene Ther* 7, pp. 1034-42.

Hunstad, D. A., and Norton, J. A. (1995): Management of pancreatic carcinoma. *Surg Oncol* 4, pp. 61-74.

Hunt, K. K., Fleming, J. B., Abramian, A., Zhang, L., Evans, D. B., and Chiao, P. J. (1998): Overexpression of the tumor suppressor gene Smad4/DPC4 induces p21waf1 expression and growth inhibition in human carcinoma cells. *Cancer Res* 58, pp. 5656-61.

Hwu, P., Yannelli, J., Kriegler, M., Anderson, W. F., Perez, C., Chiang, Y., Schwarz, S., Cowherd, R., Delgado, C., Mule, J., and et al. (1993): Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-alpha cDNA for the gene therapy of cancer in humans. *J Immunol* 150, pp. 4104-15.

Ibelgaufts, H. (1990): Gentechnologie von A bis Z, (Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH).

Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, pp. 190-5.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1969): Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4, pp. 549-53.

Jeang, K. T., Cho, M. S., and Hayward, G. S. (1984): Abundant constitutive expression of the immediate-early 94K protein from cytomegalovirus (Colburn) in a DNA-transfected mouse cell line. *Mol Cell Biol* 4, pp. 2214-23.

Jounaidi, Y., Hecht, J. E., and Waxman, D. J. (1998): Retroviral transfer of human cytochrome P450 genes for oxazaphosphorine- based cancer gene therapy. *Cancer Res* 58, pp. 4391-401.

Jounaidi, Y., and Waxman, D. J. (2000): Combination of the bioreductive drug tirapazamine with the chemotherapeutic prodrug cyclophosphamide for P450/P450-reductase-based cancer

gene therapy. *Cancer Res* 60, pp. 3761-9.

Kaetzel, M. A., and Dedman, J. R. (1995): Annexins: Novel Ca²⁺-Dependent Regulators of Membrane Function. *NIPS* 10, pp. 171-6.

Kaiser, R., Thiel, E., and Kreuser, E. D. (1996): Human gene therapy in gastrointestinal diseases: in vivo and in vitro approaches. *Recent Results Cancer Res* 142, pp. 51-61.

Kammertoens, T., Gelbmann, W., Karle, P., Alton, K., Saller, R., Salmons, B., Gunzburg, W. H., and Uckert, W. (2000): Combined chemotherapy of murine mammary tumors by local activation of the prodrugs ifosfamide and 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 7, pp. 629-36.

Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K. J. (1995): Application of ribozymes to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2, pp. 213-23.

Kashihara, N., Maeshima, Y., and Makino, H. (1998): Antisense oligonucleotides. *Exp Nephrol* 6, pp. 84-8.

Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E., Lotze, M. T., Blaese, R. M., Anderson, W. F., and et al. (1990): Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, pp. 473-7.

Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J., and Tschopp, J. (1998): FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161, pp. 3936-42.

Kedzie, K. M., Balfour, C. A., Escobar, G. Y., Grimm, S. W., He, Y. A., Pepperl, D. J., Regan, J. W., Stevens, J. C., and Halpert, J. R. (1991): Molecular basis for a functionally unique cytochrome P450IIB1 variant. *J Biol Chem* 266, pp. 22515-21.

Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991): Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, pp. 1708-11.

Kianmanesh, A. R., Perrin, H., Panis, Y., Fabre, M., Nagy, H. J., Houssin, D., and Klatzmann, D. (1997): A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor. *Hum Gene Ther* 8, pp. 1807-14.

Kim, J. H., Ho, S. B., Montgomery, C. K., and Kim, Y. S. (1990): Cell lineage markers in human pancreatic cancer. *Cancer* 66, pp. 2134-43.

Kim, K. J., Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H., and Asofsky, R. (1979): Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 122, pp. 549-54.

Klein, D., Indraccolo, S., von Rombs, K., Amadori, A., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1997): Rapid identification of viable retrovirus-transduced cells using the green fluorescent protein as a marker. *Gene Ther* 4, pp. 1256-60.

Kohler, G., Albrecht, B., and Fisch, P. (1998): Novel molecular and cellular strategies in cancer therapy. In *Vivo* 12, pp. 35-41.

Kokron, O. (1974): Treatment of oat cell metastazing bronchial carcinoma with isofosfamide. Results of a prospective randomized study. *Osterr Kneipp Mag*, pp. 123-7.

Kolenko, V., Uzzo, R. G., Bukowski, R., Bander, N. H., Novick, A. C., Hsi, E. D., and Finke, J. H. (1999): Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 59, pp. 2838-42.

Kozarsky, K. F., and Wilson, J. M. (1993): Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr Opin Genet Dev* 3, pp. 499-503.

Kröger, J. C., Bergmeister, H., Hoffmeyer, A., Ceijna, M., Karle, P., Saller, R., Schwendenwein, I., von Rombs, K., Liebe, S., Günzburg, W. H., Salmons, B., Hauenstein, K., Losert, U., and Löhr, M. (1999): Intraarterial instillation of microencapsulated cells in the pancreatic arteries in pig. *Ann N Y Acad Sci* 880, pp. 374-8.

Kurowski, V., and Wagner, T. (1993): Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde, and 2-and 3-dechloroethylifosfamide in patients on fractionated intravenous ifosfamide therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 33, pp. 36-42.

Kurre, P., Kiem, H. P., Morris, J., Heyward, S., Battini, J. L., and Miller, A. D. (1999): Efficient transduction by an amphotropic retrovirus vector is dependent on high-level expression of the cell surface virus receptor. *J Virol* 73, pp. 495-500.

Kuwashima, Y. (1996): Cytomorphology of murine B16 melanoma in vivo after treatment with cyclophosphamide: evidence of "oncotic" cell death. *Anticancer Res* 16, pp. 2997-3000.

Lan, K. H., Kanai, F., Shiratori, Y., Okabe, S., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Tanaka, T., Ohashi, M., and Omata, M. (1996): Tumor-specific gene expression in carcinoembryonic antigen--producing gastric cancer cells using adenovirus vectors. *Gastroenterology* *111*, pp. 1241-51.

Lawley, P. D., and Phillips, D. H. (1996): DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mutat Res* *355*, pp. 13-40.

Levine, A. J. (1992): The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* *326*, pp. 1350-2.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, pp. 323-31.

Lewis, A. D., Hickson, I. D., Robson, C. N., Harris, A. L., Hayes, J. D., Griffiths, S. A., Manson, M. M., Hall, A. E., Moss, J. E., and Wolf, C. R. (1988): Amplification and increased expression of alpha class glutathione S- transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, pp. 8511-5.

Li, M., Lonial, H., Citarella, R., Lindh, D., Colina, L., and Kramer, R. (1996): Tumor inhibitory activity of anti-ras ribozymes delivered by retroviral gene transfer. *Cancer Gene Ther* *3*, pp. 221-9.

Lieber, A., Kay, M. A., and Li, Z. Y. (2000): Nuclear import of moloney murine leukemia virus DNA mediated by adenovirus preterminal protein is not sufficient for efficient retroviral transduction in nondividing cells. *J Virol* *74*, pp. 721-34.

Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., and Todaro, G. (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* *15*, pp. 741-747.

Linden, R. M., and Berns, K. I. (1997): Site-specific integration by adeno-associated virus: a basis for a potential gene therapy vector. *Gene Ther* *4*, pp. 4-5.

Littlefield, J. W. (1964): Selection fo hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* *145*, pp. 709.

Liu, F., Pouponnot, C., and Massague, J. (1997): Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* *11*, pp. 3157-67.

Loehrer, P. J. S., Williams, S. D., Einhorn, L. H., and Ansari, R. (1985): Ifosfamide: an active drug in the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *J Clinical Oncology* 3, pp. 367-372.

Löhr, M., Bago, Z. T., Bergmeister, H., Ceijna, M., Freund, M., Gelbmann, W., Günzburg, W. H., Jesnowski, R., Hain, J., Hauenstein, K., Henninger, W., Hoffmeyer, A., Karle, P., Kroger, J. C., Kundt, G., Liebe, S., Losert, U., Müller, P., Probst, A., Puschel, K., Renner, M., Renz, R., Saller, R., Salmons, B., Walter, I., and et al. (1999): Cell therapy using microencapsulated 293 cells transfected with a gene construct expressing CYP2B1, an ifosfamide converting enzyme, instilled intra-arterially in patients with advanced-stage pancreatic carcinoma: a phase I/II study. *J Mol Med* 77, pp. 393-8.

Löhr, M., Hoffmeyer, A., Kröger, J. H., Freund, M., Gianella-Borradoris, A., Günzburg, W. H., Hain, J., Holle, A., Karle, P., Knöfel, W. T., Liebe, S., Müller, P., Nizze, H., Renner, M., Saller, R., Salmons, B., Wagner, T., and Hauenstein, K. (2000): Stable disease and tumor regressions after microencapsulated, cell mediated therapy of inoperable pancreatic carcinoma. *nature medicine submitted*, pp. .

Löhr, M., Müller, P., Karle, P., Stange, J., Mitzner, S., Jesnowski, R., Nizze, H., Nebe, B., Liebe, S., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1998): Targeted chemotherapy by intratumor injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450. *Gene Ther* 5, pp. 1070-8.

Löhr, M., Trautmann, B., Gottler, M., Peters, S., Zauner, I., Maillet, B., and Kloppel, G. (1994): Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer* 69, pp. 144-51.

Low, J. E., Borch, R. F., and Sladeck, N. E. (1982): Conversion of 4-Hydroperoxycyclophosphamide and 4-Hydroxycyclophosphamide to Phosphoramidate Mustard and Acrolein Mediated by Bifunctional Catalysts. *Cancer Res* 42, pp. 830-837.

Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193, pp. 265-75.

Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. (1988): A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62, pp. 1120-4.

Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995): Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition

by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, pp. 1545-56.

Martin-Gallardo, A., Montoya-Zavala, M., Kelder, B., Taylor, J., Chen, H., Leung, F. C., and Kopchick, J. J. (1988): A comparison of bovine growth-hormone gene expression in mouse L cells directed by the Moloney murine-leukemia virus long terminal repeat, simian virus-40 early promoter or cytomegalovirus immediate-early promoter. *Gene* 70, pp. 51-6.

Matteucci, C., Grelli, S., De Smaele, E., Fontana, C., and Mastino, A. (1999): Identification of nuclei from apoptotic, necrotic, and viable lymphoid cells by using multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 35, pp. 145-53.

Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, pp. 560-4.

McClane, S. J., Hamilton, T. E., Burke, C. V., and Raper, S. E. (1997): Functional consequences of adenovirus-mediated murine pancreatic gene transfer. *Hum Gene Ther* 8, pp. 739-746.

Melcher, A., Gough, M., Todryk, S., and Vile, R. (1999): Apoptosis or necrosis for tumor immunotherapy: what's in a name? *J Mol Med* 77, pp. 824-33.

Mercola, D., and Cohen, J. S. (1995): Antisense approaches to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2, pp. 47-59.

Meyn, R. E., Stephens, L. C., Hunter, N. R., and Milas, L. (1994): Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 33, pp. 410-4.

Middleton, P. G., and Alton, E. W. (1998): Gene therapy for cystic fibrosis: which postman, which box? *Thorax* 53, pp. 197-9.

Miller, A., and Rosman, G. (1989): Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7, pp. 980-990.

Miller, A. D., and Buttimore, C. (1986): Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6, pp. 2895-902.

Miller, A. D., and Chen, F. (1996): Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol* 70, pp. 5564-71.

Moore, G. E., Gerner, R. E., and Franklin, H. A. (1967): Culture of normal human

leukocytes. *Jama* 199, pp. 519-24.

Morgan, R. A. (1999): Genetic strategies to inhibit HIV. *Mol Med Today* 5, pp. 454-458.

Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1997): p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 57, pp. 2140-3.

Müller, P., Jesnowski, R., Karle, P., Renz, R., Saller, R., Stein, H., Puschel, K., von Rombs, K., Nizze, H., Liebe, S., Wagner, T., Günzburg, W. H., Salmons, B., and Löhr, M. (1999): Injection of encapsulated cells producing an ifosfamide-activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy to pancreatic tumors. *Ann N Y Acad Sci* 880, pp. 337-51.

Mulligan, R. C., and Berg, P. (1981): Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, pp. 2072-6.

Murnane, J. P., and Byfield, J. E. (1981): Irreparable DNA cross-links and mammalian cell lethality with bifunctional alkylating agents. *Chem Biol Interact* 38, pp. 75-86.

Muzyczka, N. (1994): Adeno-associated virus (AAV) vectors: will they work? *J Clinical Invest* 94, pp. 1351.

Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D., and Chang, A. E. (1993): Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, pp. 11307-11.

Nabel, G. J., Yang, Z. Y., Nabel, E. G., Bishop, K., Marquet, M., Felgner, P. L., Gordon, D., and Chang, A. E. (1995): Direct gene transfer for treatment of human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 772, pp. 227-31.

Nagata, S. (1998): Fas-induced apoptosis. *Intern Med* 37, pp. 179-81.

Nash, S. V., and Said, J. W. (1986): Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. A histochemical and immunohistochemical study of epithelial (keratin proteins, carcinoembryonic antigen) and neuroendocrine (neuron-specific enolase, bombesin and chromogranin) markers in foregut, midgut, and hindgut tumors. *Am J Clin Pathol* 86, pp. 415-22.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, pp. 841-5.

Newton, J. M., and Razzo, R. N. (1975): Proceedings: The influence of formulation variables on the in vitro release of drug from hard gelatin capsules. *J Pharm Pharmacol* 27 *Suppl*?-2, pp. 79P.

Nielsen, L. L., and Maneval, D. C. (1998): P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 5, pp. 52-63.

Niemeyer, U., Engel, J., Hilgard, P., Peukert, M., Pohl, J., and Sindermann, H. (1989): Mafosfamide - A Derivative of 4-Hydroxycyclophosphamide. *Progress Clinical Biochem Medicin*, Springer-Verlag, ed. (Berlin Heidelberg).

Nihrane, A., Lebedeva, I., Lyu, M. S., Fujita, K., and Silver, J. (1997): Secretion of a murine retroviral Env associated with resistance to infection. *J Gen Virol* 78, pp. 785-93.

Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T., and Sakai, T. (1982): Antineoplastic effect of 5-fluorocytosine and cytosine deaminase on brain tumor. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 22, pp. 344-352.

Nishizaki, K., Yoshino, T., Orita, Y., Nomiya, S., and Masuda, Y. (1999): TUNEL staining of inner ear structures may reflect autolysis, not apoptosis. *Hear Res* 130, pp. 131-6.

Nusse, R., van Ooyen, A., Rijsewijk, F., van Lohuizen, M., Schuurin, E., and van't Veer, L. (1985): Retroviral insertional mutagenesis in murine mammary cancer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 226, pp. 3-13.

Ohta, Y., Tone, T., Shitara, T., Funato, T., Jiao, L., Kashfian, B. I., Yoshida, E., Horng, M., Tsai, P., Lauterbach, K., and et al. (1994): H-ras ribozyme-mediated alteration of the human melanoma phenotype. *Ann N Y Acad Sci* 716, pp. 242-53; discussion 253-6.

Ohwada, A., Hirschowitz, E. A., and Crystal, R. G. (1996): Regional delivery of an adenovirus vector containing the Escherichia coli cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum Gene Ther* 7, pp. 1567-1576.

O'Rourke, M. G., Schmidt, C. W., TR, O. R., and Ellem, K. A. (1997): Immunotherapy, including gene therapy, for metastatic melanoma. *Aust N Z J Surg* 67, pp. 834-41.

Palmer, T. D., Thompson, A. R., and Miller, A. D. (1989): Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B. *Blood* 73, pp. 438-45.

Parks, D. R., Hardy, R. R., and Herzenberg, L. A. (1984): Three-color immunofluorescence analysis of mouse B-lymphocyte subpopulations. *Cytometry* 5, pp. 159-68.

Pearson, A. S., Bouvet, M., Evans, D. B., and Roth, J. A. (1998): Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Biosci* 3, pp. E230-7.

Penketh, P. G., Shyam, K., and Sartorelli, A. C. (2000): Comparison of DNA lesions produced by tumor-inhibitory 1,2-bis(sulfonyl)hydrazines and chloroethylnitrosoureas. *Biochem Pharmacol* 59, pp. 283-91.

Pfarr, D. S., Rieser, L. A., Woychik, R. P., Rottman, F. M., Rosenberg, M., and Reff, M. E. (1986): Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammalian cells. *Dna* 5, pp. 115-22.

Phylactou, L. A., Tsiouras, P., and Kilpatrick, M. W. (1998): Hammerhead ribozymes targeted to the FBN1 mRNA can discriminate a single base mismatch between ribozyme and target. *Biochem Biophys Res Commun* 249, pp. 804-10.

Plautz, G., Nabel, E. G., and Nabel, G. J. (1991): Selective elimination of recombinant genes in vivo with a suicide retroviral vector. *New Biol* 3, pp. 709-15.

Plautz, G. E., Yang, Z. Y., Wu, B. Y., Gao, X., Huang, L., and Nabel, G. J. (1993): Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, pp. 4645-9.

Poston, G. J., Gillespie, J., and Guillou, P. J. (1991): Biology of pancreatic cancer. *Gut* 32, pp. 800-812.

Powers, J. F., and Sladek, N. E. (1983): Cytotoxic activity relative to 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard concentrations in the plasma of cyclophosphamide-treated rats. *Cancer Res* 43, pp. 1101-1106.

Priebe, T. S., Atkinson, E. N., Pan, B. F., and Nelson, J. A. (1992): Intrinsic resistance to anticancer agents in the murine pancreatic adenocarcinoma PANC02. *Cancer Chemother Pharmacol* 29, pp. 485-489.

Pugachev, K. V., Abernathy, E. S., and Frey, T. K. (1997): Improvement of the specific infectivity of the rubella virus (RUB) infectious clone: determinants of cytopathogenicity induced by RUB map to the nonstructural proteins. *J Virol* 71, pp. 562-8.

Rabkin, S. D., Mineta, T., Miyatake, S., and Yazaki, T. (1997): Gene therapy: targeting tumor cells for destruction. *Hum Cell* 9, pp. 265-276.

Rauber, A., and Kopsch, F. (1987): Anatomie des Menschen, 20 Edition, Volume 2, (Stuttgart: Leonhardt, H.).

Rees, R. C., and Mian, S. (1999): Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. *Cancer Immunol Immunother* 48, pp. 374-81.

Rizk, N. P., Chang, M. Y., El Kouri, C., Seth, P., Kaiser, L. R., Albelda, S. M., and Amin, K. M. (1999): The evaluation of adenoviral p53-mediated bystander effect in gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 6, pp. 291-301.

Robson, C. N., Lewis, A. D., Wolf, C. R., Hayes, J. D., Hall, A., Proctor, S. J., Harris, A. L., and Hickson, I. D. (1987): Reduced levels of drug-induced DNA cross-linking in nitrogen mustard-resistant Chinese hamster ovary cells expressing elevated glutathione S-transferase activity. *Cancer Res* 47, pp. 6022-7.

Rochaix, P., Delesque, N., Esteve, J. P., Saint-Laurent, N., Voight, J. J., Vaysse, N., Susini, C., and Buscail, L. (1999): Gene therapy for pancreatic carcinoma: local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer. *Hum Gene Ther* 10, pp. 995-1008.

Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993): Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12, pp. 2099-108.

Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1986): Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, pp. 4538-42.

Rosenecker, J., Schmalix, W. A., Schindelbauer, D., Plank, C., and Reinhardt, D. (1998): Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 3, pp. 149-56.

Rossi, J. J. (1995): Therapeutic antisense and ribozymes. *Br Med Bull* 51, pp. 217-25.

Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N. J., Scheffner, M., and zur Hausen, H. (1998): Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72, pp. 9470-8.

Rowley, S., Lindauer, M., Gebert, J. F., Haberkorn, U., Oberdorfer, F., Moebius, U., Herfarth, C., and Schackert, H. K. (1996): Cytosine deaminase gene as a potential tool for the

genetic therapy of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 61, pp. 42-48.

Saini, K. S., Summerhayes, I. C., and Thomas, P. (1990): Molecular events regulating messenger RNA stability in eukaryotes. *Mol Cell Biochem* 96, pp. 15-23.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual., 2 Edition, (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Samulski, R. J. (1993): Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus. *Curr Opin Genet Dev* 3, pp. 74-80.

Sanderson, B. J., and Shield, A. J. (1996): Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents. *Mutat Res* 355, pp. 41-57.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, pp. 5463-7.

Sarkar, F. H., and Dugan, M. C. (1998): Pancreatic Cancer: Advances in molecular pathology, diagnosis and clinical management, (USA: Eaton Publishing).

Schendel, D. J., Gansbacher, B., Oberneder, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmuller, G., and Segurado, O. G. (1993): Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol* 151, pp. 4209-20.

Scherer, J. M., Stillwell, W., and Jenki, L. J. (1999): Anomalous changes in forward scatter of lymphocytes with loosely packed membranes. *Cytometry* 37, pp. 184-90.

Schmidt, R., F., and Thews, G. (1990): Physiologie des Menschen, 23 Edition.

Schmidt-Wolf, G. D., and Schmidt-Wolf, I. G. (1996): Cancer and gene therapy. *Ann Hematol* 73, pp. 207-18.

Schofield, J. P., and Caskey, C. T. (1995): Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull* 51, pp. 56-71.

Schwegler, J. S. (1998): Der Mensch: Anatomie und Physiologie; Schritt für Schritt Zusammenhänge verstehen, 2. Edition, (Stuttgart: Thieme).

Seufferlein, T., Van Lint, J., Liptay, S., Adler, G., and Schmid, R. M. (1999): Transforming

growth factor alpha activates Ha-Ras in human pancreatic cancer cells with Ki-ras mutations. *Gastroenterology* 116, pp. 1441-52.

Skuse, G. R., and Ludlow, J. W. (1995): Tumour suppressor genes in disease and therapy. *Lancet* 345, pp. 902-6.

Sladek, N. E. (1972): Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of inhibition of its metabolism. *Cancer Res* 32, pp. 1848-1854.

Slebos, R. J. C., Ceha, H. M., Kern, S. E., and Hruban, R. H. (1998): Molecular genetics of pancreatic cancer. *Pancreatic cancer: advances in molecular pathology, diagnosis and clinical management*, F. H. Sarkar and M. C. Dugan, eds. (Natick: Eaton Publishing), pp. 65-82.

Sleigh, M. J. (1976): The mechanism of DNA breakage by phleomycin in vitro. *Nucleic Acids Res* 3, pp. 891-901.

Smith, K. O., Galloway, K. S., Kennell, W. L., Ogilvie, K. K., and Radatus, B. K. (1982): A new nucleoside analog, 9-[[2-hydroxy-1- (hydroxymethyl)ethoxyl]methyl]guanine, highly active in vitro against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 22, pp. 55-61.

Soon-Shiong, P., Heintz, R. E., Merideth, N., Yao, Q. X., Yao, Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M. K., Schmehl, M., Harris, M., and et al. (1994): Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343, pp. 950-1.

Southern, P. J., and Berg, P. (1982): Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1, pp. 327-41.

Spicer, S. S., Sato, A., Vincent, R., Eguchi, M., and Poon, K. C. (1981): Lysosome enlargement in the Chediak-Higashi syndrome. *Fed Proc* 40, pp. 1451-5.

Stahelin, B. J., Marti, U., Solioz, M., Zimmermann, H., and Reichen, J. (1998): False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol* 51, pp. 204-8.

Steele, R. J., Thompson, A. M., Hall, P. A., and Lane, D. P. (1998): The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg* 85, pp. 1460-7.

Struck, R. F., Dykes, D. J., Corbett, T. H., Suling, W. J., and Trader, M. W. (1983):

Isophosphoramidate mustard, a metabolite of ifosfamide with activity against murine tumours comparable to cyclophosphamide. *Br J Cancer* 47, pp. 15-26.

Stryer, L. (1990): Biochemie, 4 Edition, (Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).

Swairjo, M. A., Concha, N. O., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., and Seaton, B. A. (1995): Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* 2, pp. 968-74.

Swisher, S. G., Roth, J. A., Nemunaitis, J., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., Connors, D. G., El-Naggar, A. K., Fossella, F., Glisson, B. S., Hong, W. K., Khuri, F. R., Kurie, J. M., Lee, J. J., Lee, J. S., Mack, M., Merritt, J. A., Nguyen, D. M., Nesbitt, J. C., Perez-Soler, R., Pisters, K. M., Putnam, J. B., Jr., Richli, W. R., Savin, M., Waugh, M. K., and et al. (1999): Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, pp. 763-71.

Tan, Y., Xu, M., Wang, W., Zhang, F., Li, D., Xu, X., Gu, J., and Hoffman, R. M. (1996): IL-2 gene therapy of advanced lung cancer patients. *Anticancer Res* 16, pp. 1993-8.

Townsend, S. E., and Allison, J. P. (1993): Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7- transfected melanoma cells. *Science* 259, pp. 368-70.

Tsuchida, T., Kijima, H., Oshika, Y., Tokunaga, T., Abe, Y., Yamazaki, H., Tamaoki, N., Ueyama, Y., Scanlon, K. J., and Nakamura, M. (1998): Hammerhead ribozyme specifically inhibits mutant K-ras mRNA of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 253, pp. 368-73.

Tzeng, E., Shears, L. L., 2nd, Lotze, M. T., and Billiar, T. R. (1996): Gene therapy. *Curr Probl Surg* 33, pp. 961-1041.

Uchida, N., Sutton, R. E., Frieria, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Veres, G., Scollay, R., and Weissman, I. L. (1998): HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, pp. 11939-44.

Uckert, W., and Walther, W. (1994): Retrovirus-mediated gene transfer in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 63, pp. 323-47.

Ueda, N., and Shah, S. V. (1994): Apoptosis. *J Lab Clin Med* 124, pp. 169-77.

Ungefroren, H., Voss, M., Bernstorff, W. V., Schmid, A., Kremer, B., and Kalthoff, H. (1999): Immunological escape mechanisms in pancreatic carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 880, pp. 243-51.

Vanderzant, C., and Splittstoesser, D. F. (1996): . Compendium of methods for the microbiological examination of foods (Washington, DC: American Public Health Association), pp. 34-43.

Varmus, H. E. (1983): Using retroviruses as insertional mutagens to identify cellular oncogenes. *Prog Clin Biol Res* 119, pp. 23-35.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, pp. 39-51.

Vile, R. G., and Russell, S. J. (1995): Retroviruses as vectors. *Br Med Bull* 51, pp. 12-30.

Vinyals, A., Peinado, M. A., Gonzalez-Garrigues, M., Monzo, M., Bonfil, R. D., and Fabra, A. (1999): Failure of wild-type p53 gene therapy in human cancer cells expressing a mutant p53 protein. *Gene Ther* 6, pp. 22-33.

von Kalle, C., Glimm, H., Schulz, G., Mertelsmann, R., and Henschler, R. (1998): New developments in hematopoietic stem cell expansion. *Curr Opin Hematol* 5, pp. 79-86.

Wagner, T. (1994): Ifosfamide clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 26, pp. 439-456.

Walker, D., Filinios, J. P., Moonkman, S. C., Beloc, C., Boddy, A. V., Cholerton, S., Daly, A. K., Lind, M. J., Pearcon, A. D. J., Beaune, P. H., and Idle, J. R. (1994): Identification of the major human hepatic cytochrome P450 involved in activation and N-dechloroethylation of ifosfamide. *Biochem Pharmacol* 47, pp. 1157-1163.

Waxman, D. J., Chen, L., Hecht, J. E., and Jounaidi, Y. (1999): Cytochrome P450-based cancer gene therapy: recent advances and future prospects. *Drug Metab Rev* 31, pp. 503-22.

Weber, G. F., and Waxman, D. J. (1993): Activation of the anti-cancer drug ifosfamide by rat liver microsomal P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* 45, pp. 1685-1694.

Webster, R., and Granoff, A. (1994): Encyclopedia of Virology, 1 Edition, Volume 1-3, (San Diego: Encyclopedia of Virology).

Wei, M. X., Tamiya, T., Chase, M., Boviatsis, E. J., Chang, T. K., Kowall, N. W., Hochberg, F. H., Waxman, D. J., Breakefield, X. O., and Chiocca, E. A. (1994): Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene. *Hum Gene Ther* 5, pp. 969-978.

Wei, S. J., Chao, Y., Shih, Y. L., Yang, D. M., Hung, Y. M., and Yang, W. K. (1999): Involvement of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in apoptosis induced by ganciclovir treatment of tumor cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther* 6, pp. 420-31.

Weller, M. (1998): Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res* 292, pp. 435-45.

White, S. A., and Nicholson, M. L. (1999): Xenotransplantation. *Br J Surg* 86, pp. 1499-514.

Wilkinson, G. W., and Akrigg, A. (1992): Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector. *Nucleic Acids Res* 20, pp. 2233-9.

Williams, D. A., and Moritz, T. (1994): Genetic manipulation of hematopoietic stem cells in adenosine deaminase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 370, pp. 395-400.

Wong-Staal, F., Poeschla, E. M., and Looney, D. J. (1998): A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum Gene Ther* 9, pp. 2407-25.

Wright, J., Tretyakov, O., Ayash, L., Elias, A., Rosowsky, A., and Frei, E. I. (1995): Analysis of 4-Hydroxycyclophosphamide in Human Blood. *Anal Biochem* 224, pp. 154-158.

Yanez, R. J., and Porter, A. C. (1998): Therapeutic gene targeting. *Gene Ther* 5, pp. 149-59.

Yang, L., Chiang, Y., Lenz, H. J., Danenberg, K. D., Spears, C. P., Gordon, E. M., Anderson, W. F., and Parekh, D. (1998): Intercellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Hum Gene Ther* 9, pp. 719-28.

Yasuda, M., Umemura, S., Osamura, R. Y., Kenjo, T., and Tsutsumi, Y. (1995): Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 58, pp. 185-90.

Yee, J. K., Friedmann, T., and Burns, J. C. (1994): Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43, pp. 99-112.

Yu, L., and Waxman, D. (1996): Role of Cytochrome P450 in Oxazaphosphorine Metabolism. *Drug Metab Dispos* 24, pp. 1254-1262.

Yu, L. J., Drewes, P., Gustafsson, K., Brain, E. G., Hecht, J. E., and Waxman, D. J. (1999): In vivo modulation of alternative pathways of P-450-catalyzed cyclophosphamide metabolism: impact on pharmacokinetics and antitumor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 288, pp. 928-37.

Yunis, A. A., Arimura, G. K., and Russin, D. J. (1977): Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19, pp. 218-35.

Z'Graggen, K., Fernandez-del Castillo, C., Rattner, D. W., Sigala, H., and Warshaw, A. L. (1998): Metastases to the pancreas and their surgical extirpation. *Arch Surg* 133, pp. 413-7; discussion 418-9.

Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1997): Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, pp. 203-11.

Zucker, R. M., Elstein, K. H., Easterling, R. E., and Massaro, E. J. (1988): Flow cytometric discrimination of mitotic nuclei by right-angle light scatter. *Cytometry* 9, pp. 226-31.L

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellen

7.1.1 Einleitung

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Suizidsysteme

7.1.2 Material und Methoden

Tabelle 2: Zusammensetzung der gemischten Population von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen (C8III-1) oder CrFKwt-Zellen und egfp positiven pankreatischen Tumorzellen

7.1.3 Ergebnisse

Tabelle 3: IC_{50} der getesteten CrFK-Klone

Tabelle 4: Zusammensetzung der gemischten Population von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen und egfp-positiven PANC1-Zellen (PANCgfp1)

Tabelle 5: IC_{50} von PANC1-Zellen bei intrazellulärer IFO-Aktivierung, *bystander effect* oder bei Kombination von beidem

Tabelle 6: Übersicht zu den getesteten Tiermodellen

Tabelle 7: Tumorwachstum von PAN02, PAN1xsnI und PANcypI-Tumoren nach PBS- und IFO/MESNA-Behandlung

7.1.4 Diskussion

Tabelle 8: Charakteristika einer IFO- bzw. CPA-Anwendung

Tabelle 9: Charakteristika des apoptotischen und des nekrotischen Zelltod

7.2 Abbildungen

7.2.1 Einleitung

Abbildung 1: Lage und Funktion des Pankreas

Abbildung 2: Häufig mutierte Gene in Pankreaskarzinomen

Abbildung 3: Gentherapie mittels *antisense*-Nukleinsäuren und Ribozymen

Abbildung 4: Mechanismen der T-Zell-Stimulierung

Abbildung 5: Funktionsweise eines Suizidsystems

Abbildung 6: Funktionsweise von CYP2B1 und Phosphoramidmustard.

Abbildung 7: Struktur eines retroviralen Virions

Abbildung 8: Struktur und Proteinsynthese von MLV

Abbildung 9: Grundtypen verwendeter retroviraler Vektoren (RVs)

Abbildung 10: Entwicklung der Verpackungszelllinien für Retrovirale Vektoren (RV)

7.2.2 Material und Methoden

Abbildung 11: Prinzip der HAT-Selektion

Abbildung 12: Prinzip der HMX-Selektion

Abbildung 13: Prinzip des Resorufintest

Abbildung 14: Pipettierschema für den Kokultivierungsversuch mit PANCgfp1-Zellen

Abbildung 15: Prinzip des *Transwell System*

Abbildung 16: Nachweis einer IFO-Aktivierung durch verkapselte 22P1G-Zellen

Abbildung 17: Aufbau eines Westernblots

Abbildung 18: Prinzip des Annexin V-Bindens

Abbildung 19: Übersicht zur Annexin V/Propidiumiodid-Anfärbbarkeit von Zellen

7.2.3 Ergebnisse

Abbildung 20: Konstruktion von Plasmid pc3/2B1

Abbildung 21: Nachweis der Kontinuität der CYP2B1-Expressionskassette in CrFK-Zellklonen

Abbildung 22: CYP2B1-Nachweis in zwei stabil transfizierten CrFK-Klonen.

Abbildung 23: Prinzip des Resorufintests

Abbildung 24: Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität von CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellklonen

Abbildung 25: Aktivierung von Oxazaphosphorinen durch CYP2B1

Abbildung 26: Zytotoxizitätseffekte auf pc3/2B1 transfizierte Zellen nach IFO- oder CPA-Behandlung

- Abbildung 27: Zytotoxische Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende (C8III-1) und parentale Katzennierenzellen (CrFKwt)
- Abbildung 28: Zytotoxische Wirkung von IFO auf CYP2B1-exprimierende (C8III-1) und parentale Katzennierenzellen (CrFKwt)
- Abbildung 29: *Bystander Effect* auf β -Galaktosidase exprimierende CrFK-Reporterzellen (Cklx2)
- Abbildung 30: *Bystander Effect* auf β -Galaktosidase exprimierende RIN5-Reporterzellen
- Abbildung 31: Kokultivierung von pankreatischen Tumorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen mit CYP2B1-exprimierenden CrFK-Zellen
- Abbildung 32: Toxische Wirkung von IFO auf Einzelpopulationen oder eine Mischkultur bestehend aus CrFKwt, C8III-1 und PANCGfp1-Zellen.
- Abbildung 33: Bystander Effekt auf A20-Suspensionszellen bei unterschiedlichen IFO-Konzentrationen
- Abbildung 34: Nachweis von frei diffundierbaren Metaboliten mittels eines *Transwell System*
- Abbildung 35: Konfokale Lasermikroskopie Staurosporin behandelter und Annexin V/Propidiumiodid gefärbter Vero-Zellen
- Abbildung 36: FACS-Analyse Annexin V/Propidiumiodid gefärbter CrFK-Zellen
- Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CrFK-Zellen
- Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen
- Abbildung 39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von C8III-1-Zellen nach endogener IFO-Aktivierung
- Abbildung 40: Verkapselung von Zellen
- Abbildung 41: Behandlung von Nacktmäusen mit enkapsulierten Zellen
- Abbildung 42: Übersicht über die verwendeten Gruppen
- Abbildung 43: Behandlung von pankreatischen Tumoren mit CYP2B1-Kapseln
- Abbildung 44: Nachweis der CYP2B1-Kassette in 293-Zellklonen mittels PCR
- Abbildung 45: Alkoxyresorufin-O-Dealkylase-Aktivität von CYP2B1-exprimierenden 293-Zellklonen
- Abbildung 46: Western Blot Analyse von 22P1G und C8III-1-Zellen
- Abbildung 47: Bestimmung der Anzahl integrierter pc3/2B1-Kopien mittels Southern Blot Analyse
- Abbildung 48: Wachstumsverlauf von 22P1G-Zellen bei verschiedenen IFO-Konzentrationen
- Abbildung 49: Nachweis von toxischen Metaboliten nach Aktivierung durch verkapselte CYP2B1- exprimierende Zellen
- Abbildung 50: Instillation von Kapseln in das porcine Pankreas
- Abbildung 51: Virus vermittelte CYP2B1-Aktivierung nach Implantation einer Verpackungszelle
- Abbildung 52: Infizierbarkeit von pankreatische Tumorzellen
- Abbildung 53: Herstellung des Vektors LCSN
- Abbildung 54: Virusproduktion verschiedener Verpackungszelllinien
- Abbildung 55: Titer einzelner LCSN produzierender 2GP19Talf8P-Zellklone
- Abbildung 56: Verstärkung der IFO-Toxizität durch endogene CYP2B1-Expression
- Abbildung 57: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) LXSNeGfp infizierter Zelllinien
- Abbildung 58: Western Blot Analyse von CYP2B1 in LCSN infizierten Zelllinien
- Abbildung 59: Additiver therapeutischer Effekt nach retroviralem Gentransfer
- Abbildung 60: Tumorwachstum in C57Black/6-Mäusen nach Injektion von PAN02-Zellen

Abbildung 61: Wachstumskinetik CYP2B1-exprimierender PAN02-Tumoren nach IFO-Therapie

7.2.4 Diskussion

Abbildung 62: Metabolismus von IFO und CPA in der Leber

Abbildung 63: Verhalten einer Tumorzelle ohne und mit IFO-Behandlung

Abbildung 64: Schematische Darstellung des Protokolls zur Behandlungsphase I/II

Abbildung 65: Resistenzmechanismen gegenüber einer IFO-Behandlung

Abbildung 66: Modellberechnungen zur Bestimmung der theoretischen Tumorgröße nach dem Tod einer Maus

7.2.5 Anhang

Abbildung 67: Klonierung von pc3/2B1

Abbildung 68: Klonierung von pLCSN

Abbildung 69: Struktur von pLXlacZ

Abbildung 70: Struktur von pLXSN

Abbildung 71: Struktur von pCMVegfp

8 Abkürzungsverzeichnis

x g	Relative Erdbeschleunigung in 9,81 N/kg
AAV	Adenoassoziiertes Virus
ADA	Adenosindeaminase
ADV	Adenovirus
ATCC	<i>American tissue culture collection</i>
bGH	<i>bovine growth hormone</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cdk	<i>cyclin dependent kinase</i>
CEA	<i>carcino-embryogenic antigen</i>
CPA	Cyclophosphamid
cfu	<i>colony forming units</i>
CYP2B1	Cytochrom P450 2B1
dER	dilatiertes Endoplasmatisches Retikulum
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DOTMA	N-[1(2,3-dioleoyoxy)propyl]-n,n,n-trimethyl- ammoniumchlorid
DOPE	Dioleoy phosphatidylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPC4	<i>deleted in pancreatic carcinomas locus 4</i> siehe auch SMAD4
DTT	1,4-Dithio-L-threitol
EBV	Ebstein-Barr Virus
ECF	<i>enhanced chemifluorescence</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm

G418	Geniticindisulfat
GCV	Ganciclovir
Giemsa	Azureosin-Methylenblaulösung
gpt	Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HBV	Hepatitis B Virus
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethansulfonäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMX	Hypoxanthin-Mycophenolsäure-Xanthin
HSV	Herpes Simplex Virus
HSV tk	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
IFO	Ifosfamid
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
LD ₅₀	letale Dosis, bei der 50 % der Tiere bzw. /Zellen überleben
LTR	lange terminale Repetition
MAGE	<i>melanoma antigen encoding gene</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MLV	Murines Leukämie Virus
MMTV	Maus-Mammatumor Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MUC1	<i>mucin 1</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
Polybren	Hexadimethrinbromid
µg	Microgramm
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Newton
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PO	Propylenoxid

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkription
SEM	standard error of the mean
SDS	<i>sodiumdodecyl sulfate</i>
SMAD4	<i>small mother against decapentaplegic</i> Typ 4 (siehe auch DPC4)
SSC	<i>sodium citrate-sodium chloride solution</i>
SV40	<i>simian virus</i> (Klon) 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF β	<i>transforming growth factor</i> β
TILs	<i>tumor infiltrating lymphocytes</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor</i> α
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS bufferd saline with Tween</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vh	Voltstunden
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

9 Anhang

9.1 Klonierung von CYP2B1 in Expressionsvektoren

9.1.1 Konstruktion von pc3/2B1

Um das Gen für das Cytochrom 2B1 (CYP2B1) in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) zu klonieren, wurde dieser mit XhoI und XbaI geschnitten. Das Fragment mit dem Gen für CYP2B1 (1598 bp) wurde mit XhoI und XbaI aus dem Vektor pSW1 (zur Verfügung gestellt von Jim Halpert) entfernt und mit dem geschnittenen, dephosphorilierten Vektor (5434 bp) ligiert. Die ligierte DNA in DH10B (Elektromax) Bakterien elektroporiert und auf Ampizillin selektiert. Die neue klonierte DNA wurde mit Testverdaus überprüft und Klonierungsübergänge sequenziert. Das entstandene Plasmid pc3/2B1 enthält die CYP2B1-cDNA, welche stromaufwärts vom konstitutiven CMV-Promotor und stromabwärts vom bGH-Polyadenylierungssignal flankiert wird. Das Plasmid enthält weiterhin eine Neomycinresistenzkassette zur Selektion von eukaryonten Zellen und zur Vermehrung in Prokaryonten den bakteriellen Replikationsursprung des Plasmids pUC19 sowie ein Ampizillinresistenzgen.

9.1.2 Konstruktion von pLCSN

Zum Einklonieren von CYP2B1 in den retroviralen Expressionsvektor pLXSN wurde pLXSNegfp mit EcoRI und HpaI geschnitten (5866 bp) und damit das egfp-Gen entfernt. Das CYP2B1-Fragment (1561 bp) wurde mit EcoRI und SmaI herausgeschnitten und mit dem Vektor (5866 bp) ligiert. Die flankierenden Bereiche um die beiden Ligationstellen wurden zusätzlich sequenziert. Das resultierende Plasmid pLCSN enthält den auf MLV basierenden retroviralen Vektor LCSN, in dem die CYP2B1-cDNA durch den Promotor im 5'-LTR reguliert wird. Stromabwärts vom CYP2B1-Gen sitzt proximal eine Neomycinresistenzkassette und distal der 3'-LTR. Neben dem retroviralen Vektor besitzt das Plasmid pLCSN den prokaryonten Replikationsursprung des pBR322-Plasmids und ein Ampizillinresistenzgen mit Bereichen von Transposon Tn5.

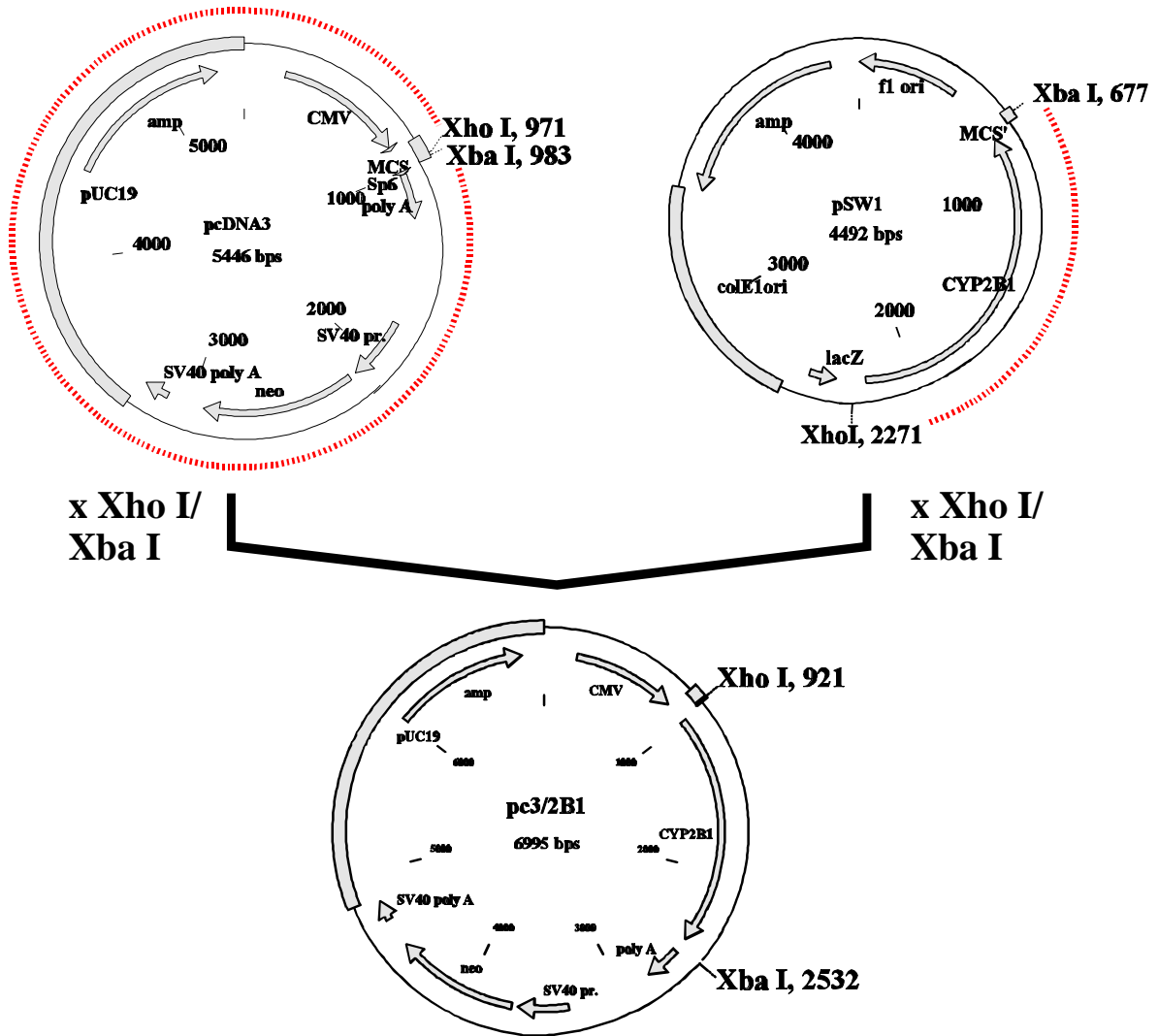


Abbildung 67: Klonierung von pc3/2B1

Zur Klonierung von pc3/2B1 wurde das Plasmid pcDNA3 mit XhoI/XbaI (5434 bp) und das Plasmid pSW1 mit den gleichen Enzymen (1598 bp) geschnitten. Beide Fragmente wurden ligiert und die Richtigkeit mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Das entstandene Plasmid pc3/2B1 enthält die CYP2B1-cDNA (CYP2B1), welche stromaufwärts vom konstitutiven CMV-Promotor (CMV) und stromabwärts vom bGH-Polyadenylierungssignal (poly A) flankiert wird. Das Plasmid enthält weiterhin eine Neomycinresistenzkassette (SV40pr + neo) zur Selektion von eukaryonten Zellen auf Neomycin und zur Vermehrung in Prokaryonten den bakteriellen Replikationsursprung des Plasmid pUC19 (pUC19) sowie ein Ampizillinresistenzgen (amp).

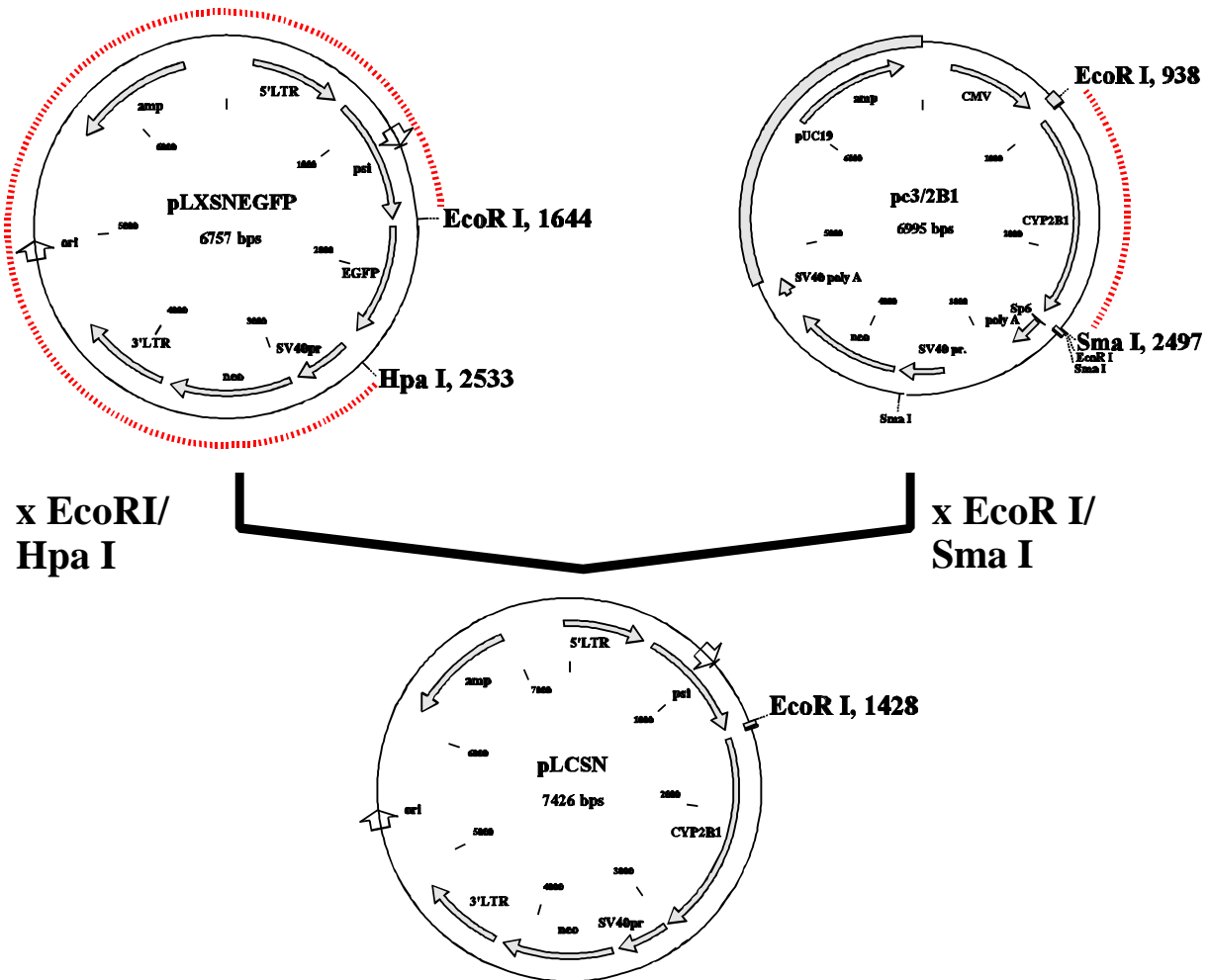


Abbildung 68: Klonierung von pLCSN

Das Plasmid pLCSN wurde kloniert indem pc3/2B1 mit EcoRI/SmaI (1561 bp) bzw. pLXSNEGfp mit EcoRI/HpaI (5866 bp) geschnitten wurden. Die beiden Fragmente wurden ligiert und die Richtigkeit der Klonierung mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Das resultierende Plasmid pLCSN enthält den auf MLV basierenden retroviralen Vektor LCSN, in dem die CYP2B1-cDNA (CYP2B1) durch den Promotor im 5'-LTR reguliert wird. Stromabwärts vom CYP2B1-Gen sitzt proximal eine Neomycinresistenzkassette (SV40 pr + neo) und distal der 3'-LTR. Neben dem retroviralen Vektor besitzt das Plasmid pLCSN noch den prokaryonten Replikationsursprung des Plasmid pBR322 und eine prokaryonte Ampizillinresistenzkassette (amp).

9.2 Weitere verwendete Plasmide

9.2.1 pLXlacZ

Das Plasmid pLXlacZ beinhaltet einen retroviralen Vektor mit β -Galaktosidasegen, das vom 5'-LTR aus reguliert wird, einer Neomycinresistenzkassette und dem Replikationsursprung des Plasmid pBR322. Im Plasmidrückgrat besitzt es ein Fragment des Polyomavirus. Es wurde zur Herstellung der Zelllinien CK1x2 und RIN1x2 (vgl. 2.2.3 C Methoden zum Nachweis von Zytochrom P450 2B1 (CYP2B1) Aktivität) verwendet.

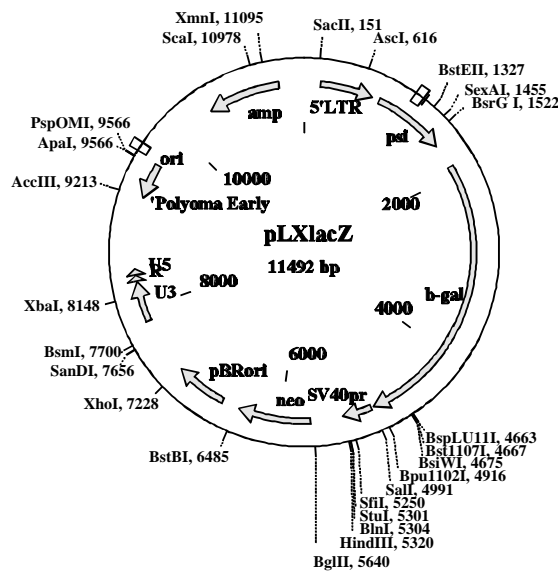


Abbildung 69: Struktur von pLXlacZ

pLXlacZ enthält den retroviralen Vektor LXlacZ mit zwei identischen LTRs (LTR), dem Verpackungssignal (psi) einer Neomycinresistenzkassette (SV40 pr + neo) und dem Replikationsursprung des pBR322-Plasmids. Im Vektorrückgrat ist ein Fragment des Polyomavirus, eine prokaryonte Ampizillinresistenzkassette (amp) und ein zweiter Replikationsursprung (ori) vorhanden.

9.2.2 pLXSN und pLXSNegfp

pLXSN (vgl. Abbildung 70) und pLXSNegfp (vgl. Abbildung 68) enthalten einen retroviralen Vektor mit zwei identischen LTRs von MLV. Das Plasmid pLXSNegfp besitzt zusätzlich noch ein egfp-Gen, das stromabwärts vom Verpackungssignal (psi) sitzt und vom 5'-LTR aus gesteuert wird. Beide Vektoren enthalten eine Neomycinresistenzkassette und im Plasmidrückgrat einen prokaryonten Replikationsursprung und eine Kassette für eine Ampizillinresistenz in

Prokaryonten.

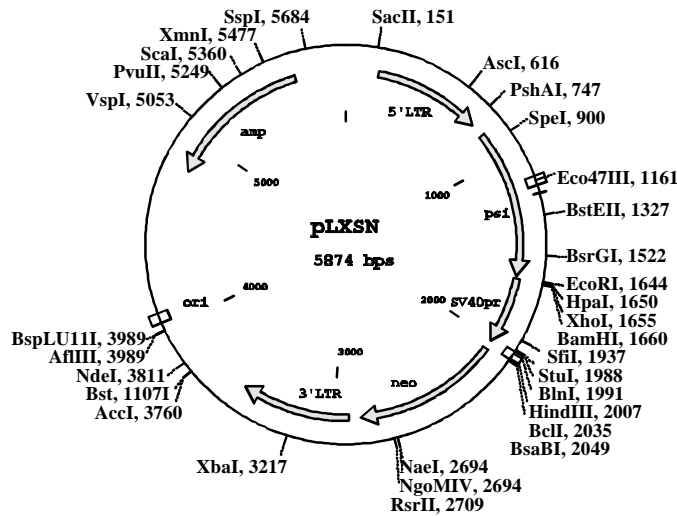


Abbildung 70: Struktur von pLXSN

Das Plasmid pLXSN enthält den retroviralen Vektor LXSN mit zwei identischen LTRs (LTR), dem Verpackungssignal (psi) und eine Neomycinresistenzkassette (SV40pr + neo). Im Plasmidrückgrat befindet sich weiterhin ein prokaryonter Replikationsursprung (ori) und eine prokaryonte Ampizillinresistenzkassette (amp).

9.2.3 pCMVegfp

Das Plasmid pCMVegfp ist ein eukaryonter Expressionsvektor für das egfp-Gen. Durch den konstitutiven CMV-Promotor wird das egfp-Gen in allen Zelltypen exprimiert. Es beinhaltet eine Neomycinresistenzkassette, sowie zur Vermehrung in Prokaryonten einen Replikationsursprung und ein Ampizillinresistenzgen. Diese Plasmids wurde zur Herstellung der stabil egfp-exprimierenden pankreatischen Zelllinien PANCgfp1 in PANC1-Zellen transfiziert.

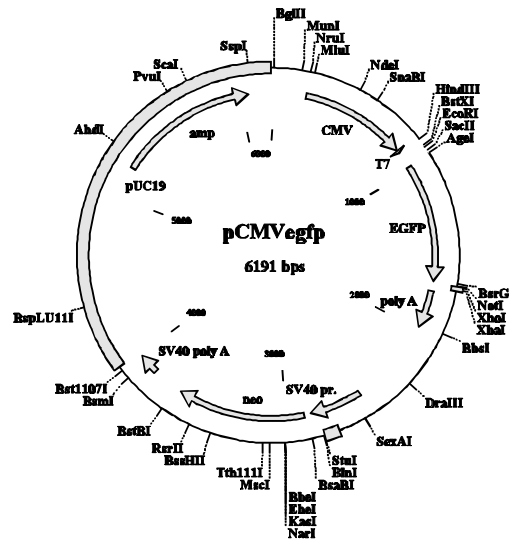


Abbildung 71: Struktur von pCMVegfp

Das Plasmid pCMVegfp enthält ein egf-Gen (egfp), das von einem CMV-Promotor (CMV) reguliert und von einem bGH-Polyadenylierungssignal (poly A) stromabwärts begrenzt wird. Zusätzlich befinden sich noch eine eukaryote Neomycinresistenzkassette (SV40pr + neo), eine prokaryote Ampizillinresistenzkassette (amp) sowie ein prokaryoter Replikationsursprung des pUC19-Plasmids (pUC19) auf dem Plasmid pCMVegfp.

10 Eigene Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Dautzenberg, H., Schuldt, U., Grasnich, G., Karle, P., Müller, P., Löhr, M., Pelegrin, M., Piechaczyk, M., Rombs, K. V., Günzburg, W. H., Salmons, B., and Saller, R. M. (1999). Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. *Ann N Y Acad Sci* 875, 46-63.

Günzburg, W. H., Karle, P., Mrochen, S., Sparmann, G., Uckert, W., Saller, R., Klein, D., and Salmons, B. (1997). Regulated gene expression after retroviral vector mediated delivery of cancer relevant therapeutic genes. *Recent Results in Cancer Res* 144, 116-26.

Günzburg, W. H., Karle, P., Renz, R., Salmons, B., and Renner, M. (1999). Characterization of a human cell clone expressing cytochrome P450 for safe use in human somatic cell therapy. *Ann N Y Acad Sci* 880, 326-36.

Kammertoens, T., Gelbmann, W., Karle, P., Alton, K., Saller, R., Salmons, B., Günzburg, W. H., and Uckert, W. (2000): Combined chemotherapy of murine mammary tumors by local activation of the prodrugs ifosfamide and 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 7, pp. 629-36.

Karle, P., Renner, M., Salmons, B. and W. H. Günzburg, (2000): Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450 activated ifosfamide, *submitted*

Kröger, J. C., Bergmeister, H., Hoffmeyer, A., Ceijna, M., Karle, P., Saller, R., Schwendenwein, I., von Rombs, K., Liebe, S., Günzburg, W. H., Salmons, B., Hauenstein, K., Losert, U., and Löhr, M. (1999). Intraarterial instillation of microencapsulated cells in the pancreatic arteries in pig. *Ann N Y Acad Sci* 880, 374-8.

Löhr, M., Bago, Z. T., Bergmeister, H., Ceijna, M., Freund, M., Gelbmann, W., Günzburg, W. H., Jesnowski, R., Hain, J., Hauenstein, K., Henninger, W., Hoffmeyer, A., Karle, P., Kroger, J. C., Kundt, G., Liebe, S., Losert, U., Müller, P., Probst, A., Puschel, K., Renner, M., Renz, R., Saller, R., Salmons, B., Walter, I., and et al. (1999). Cell therapy using microencapsulated 293 cells transfected with a gene construct expressing CYP2B1, an ifosfamide converting enzyme,

instilled intra-arterially in patients with advanced-stage pancreatic carcinoma: a phase I/II study. *J Mol Med* 77, 393-8.

Löhr, M., Müller, P., Karle, P., Stange, J., Mitzner, S., Jesnowski, R., Nizze, H., Nebe, B., Liebe, S., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1998). Targeted chemotherapy by intratumor injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450. *Gene Ther* 5, 1070-8.

Müller, P., Jesnowski, R., Karle, P., Renz, R., Saller, R., Stein, H., Puschel, K., von Rombs, K., Nizze, H., Liebe, S., Wagner, T., Günzburg, W. H., Salmons, B., and Löhr, M. (1999). Injection of encapsulated cells producing an ifosfamide-activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy to pancreatic tumors. *Ann N Y Acad Sci* 880, 337-51.

Löhr, M., Hoffmeyer, A., Kröger, J., Freund, M., Gianella-Borradori, A., Günzburg, Wh. H., Hain, J., Holle, A., Karle, P., Knöfel, W. T., Liebe, S., Müller, P., Nizze, H., Renner, M., Saller, R., Salmons, B., Wagner, T. and Hauenstein, K. H. (2000) Stable disease and tumor regressions after microencapsulated, cell mediated therapy of inoperable pancreatic carcinoma. submitted

10.2 Buchbeiträge

Karle, P., Müller, P., Renz, R., Jesnowski, R., Saller, R., von Rombs, K., Nizze, H., Liebe, S., Günzburg, W. H., Salmons, B., and Löhr, M. (1998). Intratumoral injection of encapsulated cells producing an oxazaphosphorine activating cytochrome P450 for targeted chemotherapy. In *Gene Therapy Of Cancer* (Berlin: Peter Walden), pp. 97-106.e

10.3 Vorträge

Karle, P., Löhr, M., Müller, P., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1997). Sensitization of feline kidney cells to the anticancer-prodrug ifosfamide by transfer of the cytochrome P450 2B1 gene (CYP2B1) and killing of pancreatic tumour cells by activated drug released from such transfected feline kidney cells. 3rd European Conference on Gene Therapy of Cancer (Berlin).

Karle, P., Günzburg, W. H., and Löhr, M. (1998). Behandlung des Pankreascarcinoms durch kombinierte Chemo- und Gentherapie. In *Diagnose und Therapie von Papillen- und Pankreastumoren* (Nürnberg).

Karle, P. (1999). Kombinierte Chemo- und Genterapie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms beim Menschen. Forschungstag Onkologie der VUW (Vienna).

Karle, P., Löhr, M., Müller, P., Saller, R., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1999). CYP2B1 dependent activation of the cytostatic prodrug ifosfamide for the treatment of pancreatic carcinomas. Keystone Symposia, Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy (Salt Lake City).

Karle, P., Tach, M., Renner, M., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1999). Retrovirale Vektoren zur Behandlung des Pankreaskarzinoms. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (Bremen).

Karle, P., Renner, M., Löhr, M., Müller, P., Salmons, B. and Günzburg, W. H. (2000). Kombinierte Chemo- und Zelltherapie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms beim Menschen, Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Hygiene (Goldegg).

10.4 Poster

Karle, P., Stubenrauch, F., Fuchs, P., and Pfister, H. (1994). Kartierung und Charakterisierung des Replikationsursprung des humanen Papillomvirus Typ 8 (Gießen).

Karle, P., Mrochen, S., Baumann, J., Saller, R., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1996). Delivery and expression targeted retrovirus vectors for eventual *in vivo* transfer of therapeutic genes (Lüneburg).

Karle, P., Löhr, M., Müller, P., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1997). Sensitization of feline kidney cells to the anticancer-prodrug ifosfamide by transfer of the cytochrome P450 2B1 gene (CYP2B1) and killing of pancreatic tumour cells by activated drug released from such transfected feline kidney cells. 3rd European Conference on Gene Therapie of Cancer (Berlin).

Karle, P., Gelbmann, W., Löhr, M., Saller, R., Salmons, B., and Günzburg, W. H. (1998). Encapsulated CYP2B1 dependent activation of ifosfamide treatment of solid tumours: mammary and pancreatic carcinomas. 4th European Conference On Gene Therapy of Cancer (Milan).

Karle, P., Urabl, M., Salmons, B., Günzburg, W. H., and Renner, M. (1999). Development of retroviral vectors for the treatment of pancreatic cancer. Gene Medicine (Munich: 7th Meeting of

The European Society of Gene Therapy), pp. 13S.

Karle, P., Walter, I., Salmons, B., Günzburg, W. H., and Renner, M. (1999). Mechanism of cytochrome P450/ifosfamide mediated cell killing in tumor gene therapy. In Gene Medicine (Munich: 7th Meeting of The European Society of Gene Therapy), pp. 48S.

Karle, P., Walter, I. Salmons, B., Günzburg, W.H.and Matthias Renner (2000), Mechanism of ifosfamide mediated cell killing after activation by CYP2B1, (Sagart: First European School of Hematology Cancer Center on Mechanisms of Cell Death and Disease: Advances in Therapeutic Intervention)

11 Danksagungen

Ich möchte mich bei Walter Günzburg für die Betreuung und die Unterstützung bei all meinen wissenschaftlichen Betätigungen während meiner Doktorarbeit bedanken. Brian Salmons danke ich dafür, dass er meine Doktorarbeit vor der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians Universität München vertritt. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit intensiv mit der Firma Bavarian Nordic zusammenzuarbeiten. Obwohl Walt und Brian durchaus jemanden energisch für die Arbeit motivieren können, schätzte ich doch sehr das fast familiäre Verhältnis, das sich nicht nur auf die Arbeit erstreckte.

Bei Prof. Horst Schmieger möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er sich als Zweitgutachter für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Matthias Renner (Matze) unterstützte mich bei allen labortechnischen Problemen während meines Schaffens in Wien. Beim Zusammenschreiben meiner Doktorarbeit konnte ich mich stets auf seine kompetente Beratung verlassen. Dafür und für die interessanten (ausser-)wissenschaftlichen Diskussionen danke ich ihm (war echt cool).

I thank Jim Halpert for the CYP2B1-cDNA. His cloning of the CYP2B1-cDNA and the friendly offering of the plasmid pSW1 gave me such an interesting project to work on.

Bei Robert Saller (Robbi) bedanke ich mich für die wissenschaftliche Unterstützung während meiner Doktorandenzeit in München und später die super Kooperation als Hauptverantwortlicher für die Herstellung der Zellosulfatkapselfn bei Bavarian Nordic. Natürlich danke ich ihm auch für die tolle Zeit in den Bergen, die ich durch ihn erfahren konnte.

Wolfgang Gelbmann (Miroslav) danke ich für alles, was ich über Mäuse gelernt habe. Gerade während der Anfangszeit in Wien schätzte ich sehr unsere wissenschaftlichen und privaten Gespräche und Unternehmungen.

Helga Petznek und Angi Hanak-Hammerl danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung einiger meiner Tierexperimenten.

Bei Matthias Löhr und Petra Müller möchte ich mich für die tolle und sehr produktive Kooperation zur Durchführung einiger präklinischer Experimente und der klinischen Studie bedanken.

Alexander Probst danke ich für die sehr informativen Diskussionen zur Funktion und der Anatomie des menschlichen und porcinen Pankreas.

Ingrid Walter und Waltraud Tschulenk danke ich für die vielen Diskussionen über Apoptose und dafür, dass ich an Ihrem Institut arbeiten und dabei die Elektronenmikroskopie erlernen konnte.

Für die vielen aufschlussreichen Telefonate und Diskussionen über Ifosfamid und Cyclophosphamid möchte ich mich bei Jörg Pohl von der Firma Asta Medica bedanken. Mit unendlicher Geduld beantwortete er alle Fragen, die ich in den ersten Monaten meiner Doktorarbeit zum Oxazaphosphorinstoffwechsel hatte und sandte mir freundlicherweise die aktiven Derivate (4-Hydroperoxy-IFO bzw. -CPA).

Ich danke Wilfried Bursch für die Bereitschaft meine Annexin V-Daten und meine elektronenmikroskopischen Bilder mit mir zu diskutieren. Besonders angenehm fand ich sein persönliches Interesse an meiner Arbeit und das Angebot meine Daten auch mit anderen Kollegen zu diskutieren.

Anika Boris, Renate Renz und Marlies Tach danke ich für die labortechnische Unterstützung bei der Durchführung einiger meiner Experimente.

Natürlich möchte ich auch meine ehemaligen Kollegen in München erwähnen: Hombro und seine Babes, Kurt und unsere Diskussionen über „Independence Day“, Robbi und unsere gemeinsamen Skitouren, Frank mit seinen vergeblichen Versuchen mich für Fußball zu interessieren; genauso wie Joe, Pergerli, Andrea, Steffi, Uta und alle anderen, die ich jetzt vergessen habe.

Bei meinen neuen Kollegen am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität in Wien möchte ich mich für das super Arbeitsklima und die tolle Zusammenarbeit bedanken. Besonders hervorzuheben, von den noch nicht genannten Mitarbeitern sind Angelika, die mich mit ihren Kochkünsten schon so manches Mal verführt hat, Martina mit der ich später zusammen das Pankreasprojekt bearbeitete, Konstanze mit ihren jährlichen Büroumstellaktionen, Andi mit seinen crab-Proteinen, Renate mit ihrer sanften Telephonstimme und John mit seinen Videoclips. Natürlich danke ich auch allen anderen Mitarbeitern, mit denen ich über mein Projekt diskutieren konnte bzw. die mich unterstützt haben.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass Sie mit der Finanzierung meines Studiums und der psychischen Unterstützung mir auch die Gelegenheit gegeben haben, diese für mich sehr interessante Doktorarbeit anzufertigen.

Jessy danke ich für die Toleranz gegenüber meinen teilweise ausgedehnten Arbeitszeiten und dafür, dass ich trotzdem zu nächtllicher Stunde oft etwas warmes zu essen bekam. Auch danke ich ihr, dass sie mich manchmal von der Arbeit losgerissen hat und wir viele schöne und erholsame Stunden verbringen konnten.

12 Lebenslauf

- Name:** Peter Jürgen Karle
- geboren am:** 9. September 1968 in Nürnberg
- Familienstand:** ledig
- Schulbildung:** 1975-1979 Grundschule in Nürnberg
1979-1988 Labenwolfgynasium in Nürnberg
- Bundeswehrdienst:** Juli 1988 - September 1989 in Regensburg
- Hochschulausbildung:** Immatrikulation am 6. Oktober 1989
an der Friedrich-Alexander-Universität,
Erlangen-Nürnberg

Diplomprüfung am 17. Mai 1994

Diplomarbeit 1. Juli 1994 bis 30. Juni 1995: Kartierung und
Charakterisierung des Replikationsursprungs des humanen
Papillomvirus Typ 8
- Praktische Tätigkeit als Biologe:**

10. Juli 1995 bis 31. Dezember 1995 am Max-Planck-
Institut für Biochemie in Martinsried
- Promotion:** 1. Januar 1996 bis 31. Dezember 1996 am
Institut für Molekulare Virologie an der Forschungsanstalt
für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg

seit 1. Januar 1997 am Institut für Virologie der
Veterinärmedizinischen Universität Wien