

Zelltod unter Suizidgenherapie
Analyse der induzierten Signaltransduktionswege

Vergleichende Untersuchung der Suizidgentherapiensysteme
HSV-*tk*/GCV und E.coli-*cd*/5-FC
in wt- und mt-p53-exprimierenden Hirntumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ute Fischer
aus Epe, jetzt Gronau (Westfalen)

Düsseldorf, 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Mehlhorn
Prof. Dr. U. Göbel

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 10. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Gliome	1
2. Suizidgentherapie	2
2.1 Das HSV- <i>tk</i> /GCV-System	2
2.2 Das E.coli- <i>cd</i> /5-FC-System	3
2.3 Der Bystander-Effekt	3
3. Apoptose	4
3.1 Der Tumorsuppressor p53	5
3.2 Das Bcl-2-assoziierte X-Protein Bax	5
3.3 Der Todesrezeptor CD95 ^{Fas/APO-1}	6
3.4 Der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21 ^{cip1, waf 1, sdi1}	7
3.5 Das Proto-Onkogen MDM2	7
4. Ziel der Arbeit	8

II. Material und Methoden

A. Material

1. Chemikalien	9
2. Verzeichnis der Bezugfirmen	10
3. Zelllinien und Plasmide	11
4. Geräte und Software	13

B. Methoden

1. Transfektion und Selektion von Zellklonen mit stabiler Transgenexpression	14
1.1 Transfektion	14
1.2 Zytotoxische Selektion	14
2. Probenvorbereitung	14
2.1 Vorbereitung der Zellzählungen	14
2.2 Vorbereitung der Analysen	14
3. Zellzahlbestimmungen	16
3.1 Proliferation	16
3.2 Zytotoxizitätsbestimmungen	16
3.2.1 Prodrug-Zytotoxizität	16

3.2.2 Prodrug-Zytotoxizität in Kombination mit TNF α oder anti-CD95-Antikörper (CH11)	17
3.2.3 Bystander-Effekt in Kokulturen.....	17
3.2.4 Bystander-Effekt nach räumlicher Separierung	17
3.2.5 Bystander-Effekt in xenogenen Zellmischungen	18
4. Durchflußzytometrische Analysen	18
4.1 Morphologische Analysen mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht	18
4.2 Zellzyklusanalysen und Bestimmung des Anteils subdiploider Zellen einer Population.....	18
4.3 Analyse der PS-Externalisierung.....	19
4.4 Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP, $\Delta\Psi_m$)	20
4.5 Expression der Todes-Rezeptoren CD95 und TNF-RI.....	21
4.6 FACS-Analysen von Bystander-Zellen.....	21
4.6.1 Direkte Untersuchung von Zellmischungen.....	21
4.6.2 Räumliche Separierung von Bystander-Zellen mittels Einsätzen (Inlays).....	22
4.6.3 Identifizierung von Bystander Zellen durch Fluoreszenzmarkierung	22
5. Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	22
5.1 Qualitative Überprüfung und Dokumentation der FACS-Analysen	22
5.2 Nachweis spezifischer Antigene	22
6. Immunhistochemie	23
7. TUNEL-Test.....	23
8. Detektion des DNA-„Ladderings“	24
9. Colorimetrische Detektion der Caspase 3 Enzymaktivität	24
10. Western Blot.....	25
10.1 Zellyse und Proteinextraktion	25
10.2 Konzentrationsbestimmung.....	25
10.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
10.4 Tank-Blotting	27
10.5 Unspezifische Gesamtproteinfärbung: Ponceau S.....	27
10.6 Immunologischer Nachweis	27
10.6.1 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	27
10.6.2 Inkubation mit primären Antikörpern	27
10.6.3 Detektion.....	28
11. Semiquantitative Analyse zur mRNA-Expression von CD95/CD95L und TNF-RI/TNF α	28
11.1 RNA-Isolierung.....	29
11.2 cDNA-Synthese.....	29
11.3 Semiquantitative PCR	29
11.4 Gelelektrophorese.....	30
11.5 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	30
12. Untersuchung der TNF α -Sekretion mittels ultrasensitivem ELISA.....	31

III. Ergebnisse

1. Transfektion und Selektion von Zellklonen mit stabiler Transgenexpression.....	32
2. Untersuchung der Zellmorphologie nach Zelltodinduktion.....	32
3. Durchflußzytometrische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen	34
3.1 Analyse der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichtes	34
3.2 Analyse der Phosphatidylserinexposition.....	36
3.3 Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials.....	40
3.4 Bestimmung des Anteils subdiploider Zellen.....	45
4. Untersuchungen zur DNA-Degradierung	55
4.1 Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Test.....	55
4.2 „DNA-Laddering“	56
5. Zellzyklusanalysen	58
6. Analyse von Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswegen: CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α	68
7. Proteinexpression	70
7.1 Immunhistochemie	70
7.2 Western Blot.....	72
7.2.1 Tumorsuppressor p53.....	72
7.2.2 Proto-Onkogen mdm2.....	72
7.2.3 Bcl-2-Proteinfamilie	73
7.2.4 p21 ^{waf1, cip1, sdi1} , Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen	74
8. Colorimetrische Detektion der Caspase 3-Enzymaktivität	80
9. Ergebnisse der Untersuchungen zum Bystander-Effekt	85
9.1 Zytotoxizitätstests	85
9.2 Durchflußzytometrische und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen	92
9.2.1 Analyse apoptotischer Merkmale beim Bystander-Effekt im HSV- <i>tk</i> /GCV-System	92
9.2.2 Analyse apoptotischer Merkmale beim Bystander-Effekt im E.coli- <i>cd</i> /5-FC-System	106
9.3 Colorimetrische Detektion der Caspase 3-Aktivität	118

IV. Diskussion

1. Zelltodinduktion nach Suizidgentherapie: Apoptose oder Nekrose?.....	120
2. Auswirkung der Suizidgentherapie auf Bystander-Zellen	123
3. Die Expression des Tumorsuppressors p53 in 9L- und U87-Zellen	125
4. Analyse der Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswege CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α	127
5. Proteinexpression von p53- und dem p53-Zielgen p21 ^{cip1,waf1,sdi1} (Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen) im Verlauf der Suizidgentherapie und nach Actinomycin D-Behandlung	129

6. p53-Zielgen bax, Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie	135
7. p53-Zielgen: Proto-Onkogen mdm2.....	139
8. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach HSV- <i>tk</i> /GCV-Gentherapie	143
9. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach E.coli- <i>cd/5</i> -FC-Gentherapie	145
10. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach ActinomycinD-Behandlung...	147

V. Zusammenfassung	149
---------------------------------	------------

VI. Literatur.....	152
---------------------------	------------

VII. Lebenslauf

VIII. Erklärung

IX. Danksagung

Abkürzungen

A	Adenin
AA	„amino acid“, Aminosäure
Ab	„antibody“, Antikörper
ActoD	Actinomycin D
AIF	„apoptosis inducing factor“
amp	Ampicillinresistenzgen (β -Lactamasegen)
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor-1“
Apo-1	„apoptosis antigen 1“, Synonym für Fas, CD95
ARF	„ADP-ribosylation factor“
ATCC	„american type culture collection“
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated protein“
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bax	„Bcl-2 associated X-protein“
Bcl-2	„B-cell leukemia oncogene-2“
Bcl-X _L	„Bcl-2 related protein, long isoform“
Bcl-X _S	„Bcl-2 related protein, short isoform“
Boc-D-fmk	tertiäres-Butoxycarbonyl-Asp(OMe)-fluoromethylketon (Aspartatrest verestert)
bp	„base pair“, Basenpaar
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
Caspase	„Cysteine-containing aspartate-specific protease“
cd	E.coli Cytosindeaminase
CD	„clusters of differentiation“
CD95	Synonym für Fas, Apo-1
CD95L	CD95-Ligand, Synonym für Fas-Ligand
Cdc2	„cell division cycle 2“, Synonym für Cdk1
Cdk	„cyclin-dependent kinase“
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
Cip-1	„Cdk-interacting protein“ (Synonym für p21)
JNKs	„Jun-aminoterminal kinases“
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrien-Transmembranpotential
DEVD	Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat (Caspase 3-Schnittstelle)
DEVD-fmk	Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketon (Caspaseinhibitor)
DEVD-pNA	Asp-Glu-Val-Asp-para-Nitroanilid (Caspasesubstrat)
DiIC ₁₈	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DiOC ₆	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	„deoxyribonuclease“, Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR-4, DR-5	„death receptor-4, -5“
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E2F</i>	„transcription factor essential for E1A-dependent activation of the adenovirus E2-promoter“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, Enzym-gekoppelter Immunosorbent Assay
FACS	„fluorescence activated cell sorter“, Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
<i>FADD</i>	„Fas-associating protein with a death domain“
<i>Fas</i>	„FS7-associated cell surface antigen“
5-FC	5-Fluorocytosin, Flucytosin, 4-Amino-5-fluoro-2(1H)-pyrimidinon
FdUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FdUTP	5-Fluorodesoxyuridintriphosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1, FL-2	Fluoreszenzkanal 1 bzw. 2
fmk	Fluoromethylketon
FSC	„forward scatter“, Vorwärtsstreulicht
5-FU	5-Fluoruracil
5-FdUTP	5-Fluorodesoxyuridintriphosphat
5-FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
g	Gravitationsbeschleunigung an der Erdoberfläche
G	Guanin
G418	Sustrat für Aminoglykosid-Phosphotransferase (neo)
GCV	Ganciclovir (9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin)
GCV-TP	Ganciclovir-Triphosphat
G ₁ -Phase	„gap-1-phase“
G ₂ -Phase	„gap-2-phase“
Gy	Gray
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethylsulfonsäure
HRP	„horse radish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
hygro	Hygromycinresistenzgen (Hygromycinphosphotransferasegen)
I	Stromstärke
IC ₅₀	„50%-inhibiting concentration“, 50%-inhibierende Konzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>INK4a</i>	„inhibitor of kinases“ (Genlocus, codiert für p16INK4a und p14 ^{ARF})
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid
kD	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
LM-PCR	„ligase-mediated PCR“, Ligase-vermittelte PCR
5' bzw. 3' LTR	„5' bzw. 3' long terminal repeat“, 5' bzw. 3' lange terminale Sequenzwiederholung
MACS	magnetisch aktivierter Zellsortierer
mClCCP	m-Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon
<i>MDM2</i>	„mouse double minute 2“

MGH	Massachusetts General Hospital
MoMLV	„Moloney murine leukemia-virus“
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	„messenger-RNA“, Boten-RNA
mt	mutiert
MTP	mitochondriales Transmembranpotential
MTP _{red.}	reduziertes MTP
n	Generationszahl
N	Zellzahl
2N	diploider DNA-Gehalt
4N	tetraploider DNA-Gehalt
na	nicht auswertbar
<i>NGF</i>	„nerve growth factor“
<i>neo</i>	Neomycinresistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferasegen)
NIH	„national institute of health“
ori	Replikationsstartpunkt („origin of replication“)
p	Protein (z.B p53, Protein von 53 kD)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBABE	retroviraler Transfektionsvektor
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
pBS	„Bluescript“-Plasmid
<i>PCNA</i>	„proliferating cell nuclear antigen“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
p16INK4A	Cyclin D-abhängiger Kinase-Inhibitor p16
p38 MAP-Kinase	„mitogen-activated protein kinase“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	para-Nitroanilid
PS	Phosphatidylserin
R	Widerstand
Rb	Retinoblastom
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RNase	„ribonuclease“, Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
<i>SAPKs</i>	„stress activated protein kinases“ (syn. JNKs)
SD	Standardabweichung
<i>Sdi-1</i>	„senescent cell-derived inhibitor“ (Synonym für p21)
SDS	„sodium dodecylsulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
<i>Sp1</i>	Transkriptionsfaktor, interagiert mit GC-Boxen-enthaltenden Promotoren
S-Phase	(DNA-) Synthesephase
SSC	„sideward scatter“ (Seitwärtsstreulicht)
SV40	Simianvirus 40
t	Zeit
t _{1/2}	Halbwertszeit

Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
t_g	Generationszeit
<i>tk</i>	HSV-Typ I Thymidinkinase
<i>TNFα</i>	„tumor necrosis factor α “
<i>TNF-RI</i>	„tumor necrosis factor receptor I“
<i>TRADD</i>	„TNF-RI associated death domain protein“
<i>TRAIL</i>	„TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (Synonym für APO2-Ligand)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thymidylatsynthetase
TUNEL	„TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“
U	Spannung
unbeh.	unbehandelt
UV	ultraviolettes Licht
V	Verhältnis
Vol	Volumen
<i>Waf-1</i>	„wild-type p53 activated fragment“ (Synonym für p21)
WHO	Weltgesundheitsorganisation („world health organisation“)
wt	Wildtyp

Spezifische Aminosäuren wurden im Ein- und Dreibuchstabencode abgekürzt.

I. Einleitung

1. Gliome

In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 8000 Menschen, davon 400 Kinder neu an Hirntumoren. Dieser Häufigkeitsgipfel im Kindesalter (Michaelis et al. 2000), der einer jährlichen Inzidenz von Hirntumoren von 2-2,5 pro 100.000 Kinder (unter 15 Jahren) entspricht, ist mit geringen Schwankungen weltweit festzustellen (Tait et al. 1992).

Im Kindesalter sind Hirntumore damit die verbreitetste Form solider Tumore, nur Leukämien treten häufiger auf. Etwa 75% der pädiatrischen Hirntumore sind der Formengruppe der Gliome zuzurechnen, bei Erwachsenen sind es etwa 45%. Gliome leiten sich von den verschiedenen glialen Zellen des Gehirns ab, die hauptsächlich Nähr- und Stützfunktionen erfüllen und funktionell sowie auch morphologisch eindeutig von den verschiedenen Nervenzelltypen des Gehirns abgegrenzt werden. Astrocytome leiten sich von den sternförmigen Astrocyten ab, Oligodendrogliome dagegen von den Markscheiden-bildenden Oligodendrocyten, Mischgliome enthalten Elemente beider Zelltypen. Bei Kindern überwiegen der Häufigkeit nach Astrocytome, die nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Kleihues 1993) in die folgenden Grade eingeteilt werden: Grad I (gutartig, meist pilocytisches Astrocytom), Grad II (noch gutartig), Grad III (bereits bösartig, anaplastisches Astrocytom), Grad IV (hoch maligne, Glioblastom multiforme). Im Kindesalter sind vorwiegend die histologisch gutartigen Grad I Astrocytome anzutreffen. Eine vollständige chirurgische Entfernung ist jedoch aufgrund der zumeist ungünstigen Lokalisation dieser Tumore im Kleinhirn und kaudalen Hirnstamm häufig nicht möglich. Bei Erwachsenen finden sich dagegen überwiegend prognostisch schlechtere, höher maligne Formen, die jedoch häufig die operativ besser zugänglichen Großhirnhemisphären betreffen.

Die etablierten Behandlungsmaßnahmen für Hirntumore sind neurochirurgische Operation, Bestrahlung und Polichemotherapie, die aber in Abhängigkeit von Tumorlokalisierung, Tumorausdehnung und Histologie bzw. Sensitivität gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie unterschiedlich effektiv sind (Kühl 1987, 1988, Wolff et al. 1996, Kühl et al. 1998, Wolff und Egeler 1999, Gnekow et al. 2000, Kortmann et al. 2000).

Trotz Verbesserungen dieser Therapieformen konnte jedoch die Mortalität bei hochmalignen Gliomen nicht entscheidend gesenkt werden (Marchese und Chang 1990, Wolff et al. 1999). Das Glioblastom multiforme weist leider immer noch mediane Überlebenszeiten von nur etwa 8 Monaten auf (Loeffler 1992, Kyritsis 1993, Malkin 1995, De Crevoisier et al. 1996). Weniger als 5% der Kinder mit hochgradigen Astrocytomen überleben länger als 5 Jahre (Marchese und Chang, 1990). Aber auch weniger bösartige Tumore in ungünstiger Lokalisation wie dem Hirnstamm haben nur eine 5-Jahres-Überlebensrate von 15-20% (Grigsby et al. 1988).

Hinzu kommen Belastungen in Folge von Nebenwirkungen der hochtoxischen Tumorbehandlung. Hier sind vor allem Organschädigungen und kognitive Defizite zu nennen (Danoff et al. 1982, Donahue 1992, Pollack 1994, Radcliffe et al. 1994, Beck et al. 1995, Schagerl et al. 2000). Zusätzlich zum Auftreten von Rezidiven am Ort des Primärtumors ist die Bildung sekundärer Tumore 5-10 Jahre nach Strahlentherapie im Kindesalter mit einer Inzidenz von immerhin 3-12% zu verzeichnen (Danoff et al. 1982, Duffner et al. 1985, Tsang et al. 1993), diese treten zumeist im früheren Bestrahlungsfeld auf (Li et al. 1984).

Aufgrund der unzufriedenstellenden Behandlungssituation vieler maligner Hirntumorerkrankungen sind alternative Strategien, insbesondere zur Behandlung von hochmalignen Neoplasien, von Tumoren an chirurgisch nicht zugänglichen Situationen, sowie zur Verbesserung der Lebensqualität unter Therapie und zur Verringerung von Spätfolgen wünschenswert und Gegenstand aktueller Forschung.

2. Suizidgentherapie

Für die Behandlung von Hirntumoren erscheint in diesem Sinne vor allem die Suizid-Gentherapie als besonders geeignet. Prinzipiell beruht diese Therapieform auf der Aktivierung von gering oder nicht toxischen Substanzen zu hoch-toxischen Metaboliten innerhalb der Tumorzelle, bedingt durch die Expression eines in diese Zelle eingebrachten therapeutischen Gens. Durch die Behandlung wird spezifisch die genetisch veränderte Zelle zerstört.

Im Bereich des Gehirns proliferieren fast ausschließlich die Tumorzellen. Umgebendes Normalgewebe, bestehend aus Neuronen und Gliazellen, ist in der Regel nicht teilungsaktiv. Da Retroviren nur mitotisch aktive Zellen infizieren können, werden bei der Verwendung retroviraler Vektoren in der Gentherapie selektiv die malignen Zellen erreicht (Ram et al. 1993).

Hochmaligne Gliome wachsen meist fokal und metastasieren erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium. Rezidive treten zumeist an der Stelle des Primärtumors auf. Deswegen und wegen der Möglichkeit des tumorselektiven Gentransfers erscheint die in erster Linie lokal wirksame Suizidgentherapie für diese Tumorentität besonders geeignet.

Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen befassen sich mit den beiden bekanntesten Suizidgentherapie-Systemen, dem HSV-*tk*/GCV- und dem E.coli-*cd*/5-FC-System.

2.1 Das HSV-*tk*/GCV-System

Obwohl bereits eine Reihe von Suizidgentherapiesystemen entwickelt wurden (Übersicht: Moolten 1994, Kramm et al. 1995, Aghi et al. 2000), bezieht sich die Mehrzahl der erhobenen präklinischen und klinischen Daten zur Suizidgentherapie auf das 1986 von Frederic Moolten entwickelte Herpes Simplex Virus Typ I Thymidinkinasegen/Ganciclovir-System (HSV-*tk*/GCV). Außer für die Behandlung von lokal begrenzten Malignomen hat dieses System auch in Kombination mit Radio-, Chemo- oder Immuntherapien sowie als biologisches Sicherungssystem beim Gentransfer ein weitreichendes Einsatzgebiet erlangt.

Thymidinkinasen sind Bestandteil eines Recycling-Stoffwechselweges für Thymidin und andere Pyrimidine. Sie katalysieren die Phosphorylierung ihres jeweiligen Substrates, wodurch Pyrimidinmonophosphate entstehen. Diese Monophosphate werden durch zelluläre Kinasen weiter zu Di- bzw. Triphosphaten umgewandelt und anschließend während Replikations- und Reparationsprozessen in die wachsenden DNA-Stränge integriert. Kinasen der Mammalia haben eine geringe Affinität zu dem Antimetaboliten GCV (einem Guanosinderivat), wohingegen das Isoenzym des Herpes Simplex Virus Typ I GCV um den Faktor 1000 effizienter umsetzt. In HSV-*tk*-transduzierten Tumorzellen führt die Inkorporation von GCV-Triphosphaten anstelle von Guanosin-5'-triphosphat zu einem vorzeitigen DNA-Syntheseabbruch mit konsekutivem Zelltod (Elion 1983, Faulds und Heel 1990). GCV-Triphosphat wirkt außerdem als DNA-Polymerase-Inhibitor. Durch die Beschränkung der Zytotoxizität des Gesamtsystems auf die DNA-Synthese werden die Nebenwirkungen für nicht proliferierende Zellen allgemein als gering angesehen.

Eine spezifische Abtötung von Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* nach retroviralem HSV-*tk*-Gentransfer und nachfolgender Ganciclovir-Behandlung konnte zuerst von Ezzedine et al. (1991) gezeigt werden.

Phase I klinische Versuche mit dem HSV-*tk*/GCV-System wurden sowohl bei Erwachsenen (Oldfield et al. 1993, 1995) als auch bei Kindern (Raffel et al. 1994) mit malignen Hirntumoren bereits durchgeführt. Diese ersten klinischen Studien mit Glioblastom-Rezidivpatienten unter Verwendung Retrovirus-mediertem HSV-*tk*-Gentransfer zeigten Regressionen der Tumoren bei einigen Patienten, konnten jedoch insgesamt keinen objektiven Vorteil dieser Therapieform gegenüber den konventionellen Behandlungsmethoden erbringen. Allerdings bestätigten diese Studien die geringe Toxizität dieser neuen Therapieform, welche bereits im Tierversuch gezeigt wurde (Ram et al. 1993). Weiterführende kooperative Phase II und III-Untersuchungen in den USA, Kanada und Europa zur Behandlung auch von Patienten mit einem neudiagnostizierten Glioblastom bestätigten die gute Verträglichkeit der Therapie, konnten jedoch

bisher keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit zeigen (Klatzmann et al. 1998, Shand et al. 1999, Rainov 2000). Die nicht vollständig befriedigenden Therapieergebnisse dieser klinischen Studien wurden in erster Linie auf die unzureichende in vivo-Transduktionseffizienz der eingesetzten Vektorsysteme und Gentransferverfahren zurückgeführt (Rainov 2000).

2.2 Das E.coli-cd/5-FC-System

Der zytotoxische Antimetabolit 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein häufig zur Behandlung von Darm-, Brust- und Pankreastumoren eingesetztes Chemotherapeutikum. 5-FU wurde auch zur Behandlung rezidivierender Hirnstammtumore bei Kindern eingesetzt (Cohen und Duffner 1994). Die systemische Applikation von 5-FU wird jedoch durch dessen Toxizität begrenzt; in vivo hat 5-FU zudem aufgrund intrahepatischer Metabolisierung (Lu et al. 1992) nur eine kurze Halbwertszeit: 8-14 Minuten (Van Groeningen et al. 1988). Lokale intraarterielle und intratumorale Administration verringern die Toxizität und verlängern die wirksame Zeitspanne.

Die E.coli-cd/5-FC-Gentherapie ist eine Fortführung der Bemühungen, toxische Nebeneffekte zu reduzieren und die Wirksamkeit von 5-FU zu erhöhen. Dazu wird das Gen für das bakterielle Enzym Cytosindeaminase (*cd*) aus *Escherichia coli* (Danielsen et al. 1992) in neoplastische Zellen transferiert und diese anschließend mit 5-Fluorocytosin (5-FC) behandelt. *cd* deaminiert das nicht-toxische 5-FC zum toxischen Antimetaboliten 5-FU. Diese Aktivierung findet ausschließlich in transduzierten Tumorzellen statt, da es kein äquivalentes Enzym bei Säugern gibt (Nishiyama et al. 1985, Mullen et al. 1992, Huber et al. 1993, Harris et al. 1994). Die Effektivität dieses Ansatzes unter Verwendung von lokal applizierten Cytosindeaminase-Kapseln und anschließender 5-FC-Behandlung konnten zuerst Nishiyama et al. (1985) bei Ratten zeigen. In Form eines gentherapeutischen Konzeptes wurde die Wirksamkeit zuerst von Huber et al. (1993) an colorectalen Karzinomzelllinien demonstriert (Austin und Huber 1993, Huber et al. 1993). Phase I klinische Studien wurden auch hier bereits unternommen (Chrystal et al. 1997).

Die letale Wirkung von 5-FU beruht auf dessen enzymatischer Umsetzung zu 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), einem starken Inhibitor der Thymidylatsynthetase (TS). Die TS ist ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese und katalysiert die Umsetzung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP). Dies stellt die einzige de novo Synthesemöglichkeit für dTTP dar, das nach Phosphorylierung zu dTTP für die DNA-Synthese verwendet wird. TS-Inhibition führt zu einem Mangel an dTTP. Dies begünstigt den fälschlichen Einbau von 5-Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP), 5-Fluorouridintriphosphat (FUTP) sowie weiteren Umsetzungsprodukten von 5-FU in die DNA. Diese Einbaufehler können aufgrund des dTTP-Mangels nicht von Uracil-N-Glykosylasen repariert werden. Es treten unreparierte DNA-Strangbrüche auf, mit letalen Folgen für die betroffenen Zellen. Auch die RNA-Synthese wird durch den Einbau falscher Nukleotide gestört (Polak 1990). Außerdem werden RNA-Polyadenylierung, Methylierung von Transfer-RNA und die Prozessierung ribosomaler RNA inhibiert (Grem 1996).

2.3 Der Bystander-Effekt

Die Transduktionseffizienzen, die mit den heute verfügbaren Vektorsystemen in vivo erreicht werden, sind noch deutlich begrenzt. Nicht jede Zelle in einem Tumor kann heute durch die Gentherapie erreicht werden. Dies wäre allerdings für eine erfolgreiche Tumorthherapie von entscheidender Bedeutung.

Es wurde jedoch beobachtet, daß auch nicht transduzierte Tumorzellen durch GCV getötet wurden, wenn sie sich in der Nachbarschaft von *tk*-transduzierten Zellen befanden (Moolten und Wells 1990, Culver et al. 1992, Freeman et al. 1993, Takamiya et al. 1993, Wu et al. 1994, Samejima und Meruelo 1995, Hamel et al. 1996, Hoganson et al. 1996).

Dieser Effekt wurde als „Bystander“-Effekt bezeichnet (Moolten und Wells 1990). In vitro-Untersuchungen haben gezeigt, daß kultivierte Tumorzellen vollständig durch GCV-Behandlung ausgelöscht

werden konnten, obwohl tatsächlich nur 3-10% dieser Zellen erfolgreich mit HSV-*tk* transduziert waren (Freeman et al. 1993, Takamiya et al. 1993, Wu et al. 1994, Samejima und Meruelo 1995). In vivo Studien haben einen Bystander-Effekt auch im Tiermodell nachgewiesen (Culver et al. 1992, Freeman et al. 1993, Samejima und Meruelo 1995). Bis heute sind die Ursachen für den Bystander-Effekt letztendlich noch weitestgehend im Unklaren. Klar scheint, daß ein enger Zell-Zell-Kontakt im Falle des HSV-*tk*-Systems für einen Bystander-Effekt benötigt wird. Diskutiert wird hier u.a. eine direkte Passage von toxischen Metaboliten (phosphoryliertes GCV) von *tk*-transduzierten zu nicht transduzierten Zellen über Zell-Zell-Kanäle, den „Gap-Junctions“ (Bi et al. 1993, Kaneko und Tsukamoto 1995, Wallace et al. 1996).

Der zytotoxische Effekt der E.coli-*cd/5-FC*-Therapie scheint stärker zu sein als der des HSV-*tk*/GCV-Systems, und zwar in vitro als auch in vivo (Trinh et al. 1995, Hoganson et al. 1996). Dies könnte auf einen effektiveren Bystander Effekt zurückzuführen sein. Allgemein wird angenommen, daß der Bystander-Effekt des E.coli-*cd/5-FC*-Systems im Wesentlichen auf der Diffusion des in den transduzierten Zellen gebildeten toxischen Metaboliten 5-FU beruht. 5-FU kann dann von den umgebenden Bystander-Zellen aus dem Medium aufgenommen werden. Dieser Effekt ist also primär unabhängig von Zell-Zell-Kontakten und wird als sehr ausgeprägt beschrieben (Huber et al. 1994, Trinh et al. 1995, Hoganson et al. 1996, Lawrence et al. 1998). Zusätzliche Zellkontakt-abhängige Mechanismen werden diskutiert (Mesnil et al. 1998).

Bei Bystander-Effekten scheinen in vitro auch Phagozytose/Endozytose-Prozesse eine Rolle zu spielen (Bi et al. 1993, Freeman et al. 1993). In vivo können zusätzlich Aktivierung des Immunsystems oder Inhibition von Neovaskularisierung mitwirken (Ram et al. 1993, Barba et al. 1994).

Was man heute jedoch über den zytotoxischen Effekt von Suizidtherapiesystemen auf transduzierte und Bystander-Zellen weiß, ist, daß vielfach der Zelltod in Form des programmierten Selbstmordes der Zelle, der sogenannten Apoptose, erfolgt.

3. Apoptose

Bereits im 19. Jh. befaßten sich eine Reihe von Forschern mit den verschiedenen morphologischen und physiologischen Formen des Zelltodes (Übersicht: Clarke und Clarke 1996). Die moderne Definition der Apoptose als eigenständige Form des Zelltodes, v.a. in Abgrenzung zur Nekrose, wird aber heute Kerr, Currie und Wyllie (1972) zugesprochen. Hatte Kerr (1971) diese besondere Art des Zelltodes zunächst als „shrinkage necrosis“ (Schrumpfnekrose) bezeichnet, etablierten er und seine Mitarbeiter 1972 den Begriff „Apoptose“. Dieser dem Griechischen entlehnte Begriff bezeichnet das Herabfallen des Laubes im Herbst.

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Prozess der sterbenden Zelle, der zu typischen, morphologischen Veränderungen wie der Kontraktion des Cytoplasmas, der Kondensation des Nukleus sowie dem „Blebbing“ der Plasmamembran (Ausstülpung vesikelartiger Fortsätze) führt. Biochemisch ist die Degradation der DNA in 180-200bp-große Fragmente (bzw. Vielfachen hiervon) charakteristisch. Letztendlich kulminieren diese Veränderungen in der vollständigen Auflösung der Zelle in kleine Vesikel, die dann von umgebenden Zellen oder flottierenden Makrophagen endocytotisch aufgenommen und wiederverwertet werden können. Da hierbei keine Zellinhaltsstoffe freigesetzt werden, unterbleiben Schädigungen des umgebenden Gewebes durch Entzündungen. Bei nekrotischem Zelltod mit plötzlicher Zellschwellung und -berstung treten dagegen Entzündungsreaktionen auf (Tomei und Cope 1991). Im Gegensatz zur Nekrose bleiben außerdem bei der Apoptose Zellorganellen und Membranen lange Zeit erhalten, verlieren ihre Integrität erst in späten Stadien (Übersicht: Kerr et al. 1972, Ellis et al. 1991).

Zunächst wurde angenommen, Apoptose benötige generell de novo Gen- und Proteinexpression und würde sich auch hierdurch von der Nekrose abgrenzen. Diese Annahme wurde u.a. durch die Analyse der CD95-vermittelten Apoptose (Kap. 3.3), die nicht durch Inhibierung von Protein- oder RNA-Synthese unterdrückt werden kann, widerlegt (Nagata 1994).

Apoptotischer oder „programmierter“ Zelltod spielt eine wichtige Rolle in der Ontogenese eines Individuums. Hier wird der Tod bestimmter Zellen gemäß einem zeitlich und räumlich determinierten Muster induziert. Im weiteren Verlauf des Lebens ist eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose wiederum maßgeblich für die normale Gewebshomöostase. Ebenso wie ein Übermaß an Proliferation scheint dabei auch ein zu geringes Ausmaß an Apoptose zur Tumorbildung zu führen (Übersicht: Wylie 1992).

Apoptose kann durch eine Vielzahl externer Stimuli wie z.B. UV- oder ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika und Mangel an Wachstumsfaktoren induziert werden. Die verantwortlichen Signaltransduktionsprozesse sind noch nicht genau geklärt. Bisher sind eine Reihe von beteiligten Genen und möglichen Transduktionswegen identifiziert worden. Diese sind in Tumoren häufig inaktiviert (Übersicht: Cline 1996). Radio- und Chemotherapie bewirken vielfach Zelltod durch die Induktion von Apoptose (Übersicht: Brown und Wouters 1999). Die häufig festgestellten Therapieresistenzen von Tumoren beruhen zumindest teilweise auf dem Verlust der Fähigkeit, auf einen bestimmten Stimulus hin Apoptose auszulösen. Es sind auch Resistenzen gegen Suizidgentherapie beobachtet worden. Der Status von Genen (z.B. p53, Kap. 3.1), die an der Apoptose-Kontrolle beteiligt sind, könnte auch hier eine Rolle spielen (Matsubara et al. 1999).

3.1 Der Tumorsuppressor p53

Ein wichtiger Apoptose-Kontrollpunkt ist der Tumorsuppressor p53 (Vogelstein und Kinzler 1992). p53 ist notwendig für Strahlungs-induzierte Apoptose und moduliert die Zytotoxizität einiger DNA-schädigender Chemotherapeutika (Lowe et al. 1993a,b). Als Reaktion nach DNA-Schädigung akkumuliert p53-Protein im Nukleus der Zelle, bedingt durch erhöhte Translation der p53-mRNA und posttranslationale Stabilisierung (Maltzman und Czyzyk 1984, Kastan et al. 1991). Dies führt entweder zu reguliertem Zelltod (Yonish-Rouach et al. 1991, Shaw et al. 1992) oder aber zu einem Wachstumsstopp, der vermutlich Zeit für Reparaturvorgänge einräumen soll (Michalovitz et al. 1990, Martinez et al. 1991, Kuerbitz et al. 1992, Cox et al. 1995).

Eine neue Therapieform wie die Suizidgentherapie wäre durch eine Abhängigkeit von funktionellem p53 in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt, da mehr als 50% aller menschlichen Tumore p53-Mutationen aufweisen (Nigro et al. 1989, Hollstein et al. 1991). Diese Mutationen bewirken in den meisten Fällen eine Resistenz gegenüber p53-abhängiger Apoptoseinduktion. p53-Mutationen werden häufig auch in Hirntumoren wie Gliomen und Astrozytomen gefunden (Frankel et al. 1992, Fults et al. 1992, Porter et al. 1992, von Deimling et al. 1992, Kraus et al. 1994, Louis 1994) und zu einem geringeren Ausmaß in Oligodendrogliomen (Oghaki et al. 1991) oder Primitiven Neuroektodermalen Tumoren (Saylor et al. 1991).

p53 ist ein Transkriptionsfaktor und seine Apoptose-induzierende und Zellzyklus-arretierende Aktivität ist mit der direkten Transkriptionsaktivierung von Genen assoziiert worden (Sabbatini et al. 1995, Attardi et al. 1996). Aber auch Transkriptions-unabhängige Mechanismen können beteiligt sein (Caelles et al. 1994, Haupt et al. 1995, 1997, Chen et al. 1996, Marchenko et al. 2000). Es sind bereits einige der Gene, die durch p53 transkriptionell aktiviert werden, identifiziert worden:

3.2 Das Bcl-2-assoziierte X-Protein Bax

Zu diesen transkriptionell durch p53 aktivierbaren Genen gehört Bax, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie (Oltvai et al. 1993, Miyashita et al. 1994, Miyashita und Reed 1995). Aktives Bax-Protein bewirkt in einem noch nicht geklärten Mechanismus den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials. Der Zusammenbruch dieses Potentials stellt häufig ein zentrales Element im Verlauf der Apoptose-Signaltransduktion dar, so daß hier ein direkter Zusammenhang zwischen p53-Aktivierung nach DNA-Schädigung und Apoptose-Induktion besteht (Übersicht: Korsmeyer 1999). Die Wirkung einiger Chemotherapeutika, die Zelltod über p53-Aktivierung induzieren, ist in Bax-defizienten Mäusen

blockiert (McCurrach et al. 1997). Maligne Entartungen treten hier häufiger auf (Yin et al. 1997). Craperi et al. zeigten Bax-Induktion im Verlauf der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie in einer Gliomzelllinie (1999). Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie finden sich häufig in enger räumlicher Nachbarschaft zu Porenbildenden Proteinen der inneren Mitochondrienmembran (Reed et al. 1998), die als „Megachannels“ oder „Permeability Transition Pores“ bezeichnet werden (Zoratti und Szabò 1995). Öffnung dieser Poren erlaubt die freie Diffusion von löslichen Substanzen bis zu einem ungefähren Molekulargewicht von <1500 Da und verursacht vermutlich das Absinken des Transmembranpotentials (Zoratti und Szabò 1995, Zamzami et al. 1996), das Anschwellen des Organells, das Aufbrechen der äußeren Membran und die Freisetzung von apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c, Apaf-1 (Liu et al. 1996) und AIF (Susin et al. 1996) aus dem Intermembranraum. Cytochrom c bindet Apaf-1, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase 9 ermöglicht wird (Li et al. 1997). AIF scheint ein direkter Aktivator von Procaspasen zu sein (Susin et al. 1996, Übersicht: Green und Reed 1998). Caspasen wiederum stellen zentrale Effektoren der Apoptose dar: Es sind Cystein-Proteasen, die über verschiedene Apoptose-Signaltransduktionswege aktivierbar sind und nach Aktivierung (durch Spaltung nicht aktiver Procaspasen zu aktiven Caspasen) durch das gezielte Zerschneiden einer Reihe von strukturellen und funktionellen Proteinen den Zelltod unwiderruflich einleiten (Übersicht: Hengartner 2000).

Eine der pro- oder antiapoptotischen Funktionen der Bcl-2-Protein-Familie könnte daher die Kontrolle der Freisetzung solcher apoptogener Substanzen aus den Mitochondrien darstellen, die Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt. Von Bedeutung ist vermutlich das Konzentrationsverhältnis von pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern dieser Familie, die sich durch Bildung von Heterodimeren gegenseitig in ihrer Wirkung neutralisieren. Nach Konzentrationsverschiebung, z.B. durch p53-induzierte, höhere Bax-Produktion, können sich Bax-Homodimere bilden, die Apoptose einleiten (Reed et al. 1998).

Das Absinken des mitochondrialen Transmembranpotentials ist jedoch mitunter reversibel und nicht ausreichend, um unwiderruflich Apoptose einzuleiten (Minamikawa et al. 1999, Salvioli et al. 2000). Außerdem wurden auch Formen apoptotischen Zelltodes beschrieben, die ohne eine Veränderung des Potentials ablaufen (Kluck et al. 1997, Yang et al. 1997).

3.3 Der Todesrezeptor CD95^{Fas/APO-1}

CD95 (syn. Fas oder APO-1), ebenfalls ein potentielles p53-Zielgen (Owen-Schaub et al. 1995, Reinke und Lozano 1997), gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)/Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptorfamilie (Itoh et al. 1991). CD95 wurde isoliert und kloniert (Itoh et al. 1991, Oehm et al. 1992, Watanabe-Fukunaga et al. 1992) nachdem 1989 beobachtet wurde, daß monoklonale Antikörper gegen diesen Rezeptor in menschlichen Tumor-Zellen Apoptose auslösen können (Trauth et al. 1989, Yonehara et al. 1989). Inzwischen stellen die über CD95 und TNF-Rezeptor I induzierten Apoptose-Signaltransduktionswege die zur Zeit am besten verstandenen dar: Die Bindung von CD95-Ligand an CD95 bzw. von TNF α an TNF-RI führt zur Bildung membrangebundener Aggregate. Diese rekrutieren intrazellulär über Adaptorproteine (FADD bzw. TRADD) Procaspase 8- (Muzio et al. 1996) bzw. Procaspase 10-Moleküle (Wang et al. 2001, Kirschkel et al. 2001). Diese Initiator-Caspasen werden aktiviert (eventuell durch autokatalytische Spaltung induziert durch hohe lokale Procaspase-Konzentration) und können dann ihrerseits Effektor-Caspasen aktivieren, was zur tatsächlichen Ausführung des apoptotischen Signals führt (Übersicht: Hengartner 2000, Krammer 2000).

CD95/CD95L spielen eine wesentliche Rolle bei apoptotischen Vorgängen im Immunsystem (Übersicht: Krammer 2000). Sie scheinen zumindest bei leukämischen und hepatozellulären Karzinomzelllinien häufig an der durch einige Chemotherapeutika induzierten Apoptose beteiligt zu sein (Friesen et al. 1996, Fulda et al. 1997, Müller et al. 1997) und auch im Zusammenhang mit der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie wurde eine Beteiligung vermutet (Beltinger et al. 1999, Wei et al. 1999). Im Zusammenhang mit p53 wird nicht nur die Transkriptionsaktivierung von CD95 durch p53 nach DNA-Schädigung, sondern auch ein p53-induzierter

Transport von CD95 auf die Zelloberfläche (Bennett et al. 1998, Müller et al. 1998) kontrovers diskutiert (Strasser et al. 1995, Fuchs et al. 1997). In Zellen mit mutiertem p53 sollte demnach der Transport von neugebildetem CD95 durch das Endoplasmatische Retikulum/Golgi-System an die Zelloberfläche ausbleiben, und die Zelle resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sein.

3.4 Der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21^{cip1, waf 1, sdi1}

p21, ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (cdk), gehört ebenfalls zu den p53-Zielgenen. Nach DNA-Schädigung kann p21 durch p53 induziert werden und bewirkt einen G₁-Arrest (El-Deiry et al. 1993, Xiong et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, daß p21 der p53-vermittelten Apoptose-Induktion entgegen wirken kann (Gorospe et al. 1996, Lu et al. 1998, Wang et al. 1999, Tian et al. 2000). p21-Überexprimierung erhöht die Resistenz von Gliomzelllinien gegenüber DNA-schädigenden Agenzien (Ruan et al. 1998), und p21-Verlust scheint in einer erhöhten Apoptoserate nach eben solcher Behandlung zu resultieren (Waldmann et al. 1996).

p21 kann die Cyclin-Cdk-Komplexe, die das Fortschreiten des Zellzyklus an den regulatorisch wichtigen Übergängen von der G₁- zur S-Phase sowie von der G₂- zur Mitose-Phase bewirken, binden und inhibieren (LaBaer et al. 1997, Bates et al. 1998, Dulic et al. 1998, Nicolescu et al. 1998, Cheng et al. 1999, Sherr und Roberts 1999). Der Zellzyklus wird dadurch an diesen speziellen Kontrollpunkten negativ reguliert. Der G₁-Arrest wird durch die infolge der Cyklinkinasen-Inhibition ausbleibende Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) herbeigeführt. Rb hält dann den E2-Transkriptionsfaktor komplexiert, wodurch die Transition von der G₁- zur S-Phase unterbleibt (Harper et al. 1993, 1995). Die Aktivität der G₂M-Kinase CyclinB/Cdc2 wird von p21 schwächer inhibiert (Gu et al. 1993, Harper et al. 1993, 1995). p21 bindet außerdem PCNA, einen Hilfsfaktor der DNA-Polymerase δ (Fairman 1990, Goubin und Ducommun 1995, Nakanishi et al. 1995, Fotadar et al. 1996). p21 kann durch Interaktion mit PCNA dessen Funktion in DNA-Replikation und -Reparatur unterbinden und auf diese Weise zusätzlich wachstumshemmend wirken (Waga et al. 1994, Sherr und Roberts 1995). Zelllinien mit p21-Deletionen und p21-Null-Mäuse zeigen eine Defizienz in der Ausprägung des p53-induzierten G₁-Phasenarrests nach DNA-Schädigung (Deng et al. 1995, Waldmann et al. 1995). p21 ist allerdings auch p53-unabhängig aktivierbar (Michieli et al. 1994, Akashi et al. 1995, Zeng und El-Deiry 1996).

3.5 Das Proto-Onkogen MDM2

Die Expression des mdm2 („mouse double minute“-Gens kann ebenfalls durch p53 induziert werden (Barak et al. 1993, Wu et al. 1993). MDM2 komplexiert p53 und inhibiert dadurch die p53-abhängige Transkriptionsaktivierung (Momand et al. 1992). Die Komplexierung von p53 mit MDM2 scheint einen ersten Schritt des Ubiquitin-vermittelten p53-Abbaus darzustellen (Haupt et al. 1997, Kubbutat et al. 1997). Die transkriptionelle Aktivierung des p53-„Gegenspielers“ mdm2 durch p53 bildet vermutlich eine negative Rückkopplungsschleife, die für die Regulation der p53-Konzentration wichtig ist. MDM2-Überexprimierung stellt somit einen weiteren Mechanismus zur funktionellen p53-Inaktivierung dar. Dies ist bei Tumoren und Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft gezeigt worden (Übersicht: Momand et al. 1998). Auch bei Gliomen und Astrozytomen tritt MDM2-Überexprimierung auf (Reifenberger et al. 1993, He et al. 1994, Biernat et al. 1997), wobei p53 dann meist in seiner wt-Form vorliegt (Reifenberger et al. 1993, Biernat et al. 1997).

4. Ziel der Arbeit

Das Ziel einer Tumor-Gentherapie mit den Wirksystemen HSV-*tk*/GCV bzw. E.coli-*cd*/5-FC ist die effektive spezifische Abtötung der entarteten Zellen. Zur Zeit sind allerdings die zu Grunde liegenden zellulären Signaltransduktionswege, die unter Suizidgentherapie den Tod der Zelle bewirken, noch weitestgehend unbekannt.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, zunächst die Art des gentherapeutisch verursachten Zelltodes zu charakterisieren und dann hiervon ausgehend die beteiligten Signaltransduktionswege zu identifizieren. Dabei wurde die Expression verschiedener Proteine, die Schlüsselfaktoren der Zelltodkontrolle darstellen, untersucht.

Einer dieser Schlüsselfaktoren ist das Tumorsuppressorprotein p53. Die untersuchten Zellmodelle U87 (humane Gliomzelllinie) und 9L (Rattengliosarkomzelllinie) wurden deshalb unter besonderer Berücksichtigung ihres p53-Genstatus ausgewählt: U87 exprimiert Wildtyp-p53, bei 9L ist p53 mutiert. Mutationen dieses Tumorsuppressorgens werden bei ca. 50% menschlicher Tumore gefunden. Eine zentrale Frage ist deshalb, ob p53 eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Induktion durch HSV-*tk*/GCV- oder E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie spielt, und ob p53-unabhängige Signalwege ebenfalls beteiligt sein können.

Die untersuchten Therapiesysteme weisen darüber hinaus Bystander-Effekte auf, d.h. auch nicht transduzierte Zellen werden von der zytotoxischen Wirkung transduzierter Zellen erfaßt. Die genauen Ursachen dieser Bystander-Effekte sind noch nicht genau geklärt. Ein weiteres Hauptanliegen der Arbeit ist deshalb zu klären, ob der Bystander-Zelltod nach ähnlichen Mechanismen abläuft wie der durch die direkte zytotoxische Wirkung der Suizidgentherapie induzierte Zelltod der transduzierten Zellen. Insgesamt ist die detaillierte Aufklärung der Signaltransduktionswege, die zum Gentherapie-vermittelten Zelltod führen, von allergrößter Bedeutung für die Identifizierung von Resistenzmechanismen. Nur durch die Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen kann man Angriffspunkte für mögliche Resistenzen definieren und eingrenzen. Außerdem weiß man von konventionellen Chemotherapeutika, daß Resistenzen vielfach auf der Inaktivierung von apoptotischen Signaltransduktionswegen beruhen. Dies ist für die HSV-*tk*/GCV-Gentherapie ebenfalls bereits vermutet worden (Matsubara et al. 1999). Eine genaue Kenntnis der ablaufenden zellulären Prozesse könnte also zur Entwicklung effektiverer Therapiestrategien und zur Verringerung von Resistenzen gleichermaßen führen. Ein besseres Verständnis der Art der Bystander Effekte könnte außerdem eine gezieltere Anwendung und vielleicht sogar Beeinflussung dieses Effektes zu therapeutischen Zwecken ermöglichen.

II. Material und Methoden

A. Material

1. Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden bei Sigma-Aldrich (Deisenhofen) in p.A. Qualität bezogen. Zusammengesetzte Lösungen oder Puffer wurden aus Chemikalien der Firma Sigma-Aldrich hergestellt, sofern nicht anders vermerkt.

Aceton	(Merck KGaA)
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	(Bio-Rad Laboratories GmbH)
AmpliTaq (Taq-Polymerase)	(Perkin Elmer)
Annexin V-FITC	(PharMingen)
ApoAlert Caspase-3 Assay	(Clontech)
ApoAlert LM-PCR Ladder Assay Kit	(Clontech)
Biomax MR-1 Röntgenfilme	(Kodak GmbH)
Boc-D-fmk	(Calbiochem)
Blotto	(Santa Cruz)
Ciprobay	(Bayer Diagnostika)
DC-Protein Assay	(Bio-Rad Laboratories GmbH)
DiIC ₁₈ (3)	(MoBiTec)
DiOC ₆ (3)	(MoBiTec)
DNase I, RNase-frei	(Roche Diagnostics)
Doxorubicin	(Pharmacia GmbH)
Ethanol	(Merck KGaA)
Etoposid	(Bristol Arzneimittel)
Fixogum	(Marabuwerke GmbH & Co)
Fötale Kälberserum	(Gibco-BRL)
FuGENE™ 6	(Roche Diagnostics)
Ganciclovir	(Syntex GmbH)
Geneticin	(Gibco-BRL)
L-Glutamin	(Gibco-BRL)
Glyceringelatine	(Merck KGaA)
Hybond Nitrocellulose-Membran	(Amersham Life Science)
In Situ Cell Death Detection Kit, AP	(Roche Diagnostics)
Isoton II	(Coulter Company)
100bp Ladder	(Pharmacia GmbH)
Lumi-Light ^{Plus}	(Roche Diagnostics)
Maus anti human CD95-PE IgG ₁	(Immunotech)
Maus anti human Dansyl anti IgG ₁	(PharMingen)
Maus anti human/Ratte p53 IgG _{2b} (Klon PAB122)	(PharMingen)
Maus anti human/Ratte Bcl-2 IgG ₁ (Klon C-2)	(Santa Cruz)
Maus anti human/Ratte Bcl-X _L IgG _{2a} (Klon 2H12)	(PharMingen)
Maus anti human/Ratte Bax IgG ₁ (Klon 6A7)	(PharMingen)
Maus anti human/Ratte CD95 (Klon CH11)	(Immunotech)
Maus anti human/Ratte p21 ^{cip1} IgG _{2b} (Klon F-5)	(Santa Cruz)
Maus anti human/Ratte MDM2 IgG ₁ (Klon SMP14)	(PharMingen)

Maus anti human/Ratte TNF-RI IgG ₁	(R&D-Systems)
Maus IgG ₁	(BDIS /Immunotech)
Maus IgG ₁ -PE	(BDIS/Immunotech)
Methanol	(Merck KGaA)
Mitosensor	(Clontech)
3MM-Papier	(Whatman)
Mycoplasmen-PCR-ELISA	(Roche Diagnostics)
Natriumpyruvat	(Gibco-BRL)
Nitrocellulosemembran Hybond	(Amersham Life Science)
PBS	(Serag-Wiesner GmbH & CoKG)
pMACS 4	(Miltenyi Biotech)
Penicillin/Streptomycin	(Gibco-BRL)
2-Propanol	(Merck KGaA)
Propidiumiodid	(MoBiTec)
RNaseA	(QIAGEN GmbH)
RNAzol	(WAK-Chemie)
RPMI 1640	(Biochrom KG, Seromed)
Salzsäure	(Merck KGaA)
Seren: Ziege-, Esel-, Pferde-Serum	(Santa Cruz)
Streptavidin-FITC/-PE	(PharMingen)
Temed	(Merck KGaA)
Ultrasensitiver Ratten-TNF α -ELISA	(Laboserv)
Vectastain ABC	(Vector Laboratories Inc.)
Vincristin	(Pharmacia & Upjohn)
Ziege anti-Maus Ig-PE	(Serva)
Ziege anti Maus-IgG, Biotin-gekoppelt	(PharMingen)
Ziege anti Maus-IgG, HRP-gekoppelt	(Santa Cruz)

2. Verzeichnis der Bezugsfirmen

Alexis Deutschland GmbH, Grünberg	Immunotech, s. Coulter
Amersham Life Science, Braunschweig	Kodak GmbH, Stuttgart
Bayer Diagnostika, Leverkusen	Laboserv, Giessen, Deutschland
Becton Dickinson, BDIS, Heidelberg	Marabuwerke GmbH & Co, Hamburg
Biochrom KG, Seromed, Berlin	Merck KGaA, Darmstadt
Biometra – biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	MoBiTec, Göttingen
Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics)	Molecular Probes, Eugene OR/Leiden NL (Bezug über MoBiTec)
Bristol Arzneimittel, München	MWG Biotech AG, Ebersberg
Calbiochem (Merck)	Perkin Elmer, Vaterstetten (Roche Diagnostics)
Clontech, BDIS, Heidelberg	Pharmacia Biotech, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Corning Costar GmbH, Bodenheim	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Coulter Company, Krefeld	PharMingen, BDIS, Heidelberg
Dako Diagnostika GmbH, Hamburg	QIAGEN GmbH, Hilden
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
GibcoBRL, Eggenstein	

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
 Santa Cruz, Heidelberg
 Serag-Wiesner GmbH & CoKG, Naila
 Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
 (Invitrogen)
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 Syntex GmbH, Roche Diagnostika, Aachen

Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
 (Bezug über Alexis Deutschland GmbH)
 WAK-Chemie, Bad Homburg
 Whatman Biometra, s. Biometra
 Whatman Scientific Limited (Bezug über Bender
 & Hobein, Bruchsal)

3. Zelllinien und Plasmide

Sämtliche Zelllinien wurden in einem Zellinkubator bei 37°C, 98% Luftfeuchte, in einer auf 5% CO₂-angereicherten Atmosphäre kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI-1640, supplementiert mit 10% (vol/vol) Hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, und 1 mM Natriumpyruvat eingesetzt. Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf Mycoplasmenkontamination getestet (Mycoplasmen-PCR-ELISA). Nach initialer Behandlung der Zelllinien mit Ciprofloxacin („Ciprobay“, 25 µg/ml, zwei Wochen lang als Kulturzusatz) blieben diese frei von erneuter Mycoplasmeninfektion. Sämtliche Versuche wurden mit Mycoplasmen-freien Zellen durchgeführt.

Nicht transduzierte (parentale) Zelllinien:

U-87 MG	humanes Mischgliom WHO Grad III; ATCC [HTB 14]; Ponten et al., Acta Path. Microbiol. Scand 74: 465-486, 1968; Hum Hered 21: 238, 1971
9L	Gliosarkom der Ratte (Weizsaecker et al. 1981)
Jurkat T-Zellen	humane T-Zelllinie (akute T-Zell-Leukämie; Schneider et al. 1977)
3T3	Mausembryo-Fibroblastenzelllinie (Todaro und Green 1963)

Stabil transduzierte Zelllinien:

Parentale Zelllinie	Derivat	Transfiziertes Plasmid	Referenz
U87	U87- <i>tk</i>	pBABE <i>hygro/tk</i>	
	U87- <i>tk/CD4</i>	pBABE <i>hygro/tk</i> // pMACS 4*	
	U87- <i>cd</i>	pCD2	
9L	9L- <i>tk</i>		Zimmer et al. 1997
	9L- <i>cd</i>	pCD2	Aghi et al. 1998
	9L- <i>tk/cd</i>		Aghi et al. 1998
3T3	3T3- <i>tk</i>	pBABE <i>hygro/tk</i>	

Tab. 1: Übersicht der im Folgenden verwendeten Zelllinien. Aufgeführte Zelllinien, die nicht mit Referenzen versehen wurden, sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch stabile Transfektion generiert worden.

(*pMACS 4: Das Plasmid pMACS 4 (Miltenyi Biotech) codiert einen humanen CD4-Rezeptor mit trunkierter cytoplasmatischer Domäne. Es findet keine Signaltransduktion durch den Rezeptor statt. Zellen, die nach Transfektion mit diesem Plasmid den Marker auf ihrer Oberfläche exprimieren, können mittels anti-CD4-paramagnetischen Partikeln und MACS-Sortierung angereichert werden.)

Plasmide:

Abb. 1: pBABE-hygro/tk

Zur Generierung des pBABE-hygro/tk-Plasmids wurde das HSV-Typ I-Thymidinkinasegen aus pBluescript-tk (freundlicherweise von M. Sena-Estevés, MGH, Boston, USA, zur Verfügung gestellt) isoliert und in die singuläre EcoRI-Schnittstelle des pBABE-hygro-Vektors (Morgenstern und Land 1990) inseriert. Der resultierende Vektor codiert das HSV-tk-Gen sowie die Gene für die Ampicillin- und Hygromycinresistenz zur Selektion in Pro- bzw. Eukaryoten. tk = HSV Typ I tk-Gen; hygro = Hygromycinresistenzgen (Hygromycinphosphotransferasegen); amp = Ampicillinresistenzgen (β -Lactamasegen); 5' bzw. 3' LTR-Promotor = 5' bzw. 3' LTR-Promotor des murinen Moloney Leukämie-Virus; pBS Ori = Replikationsstartpunkt von pBluescript; SV40 early promotor = SV40-Promotor

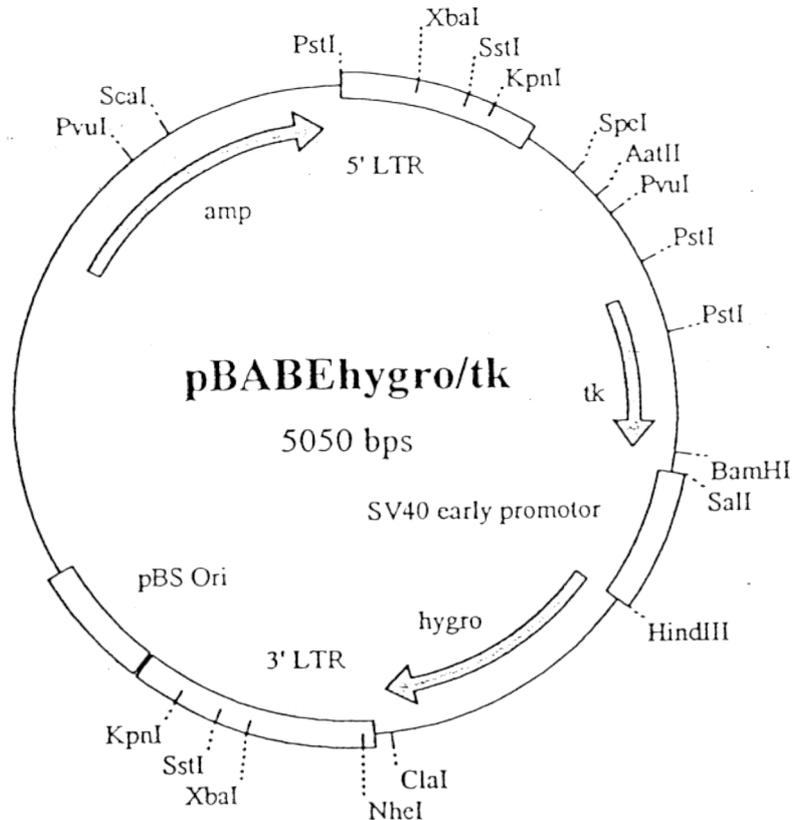
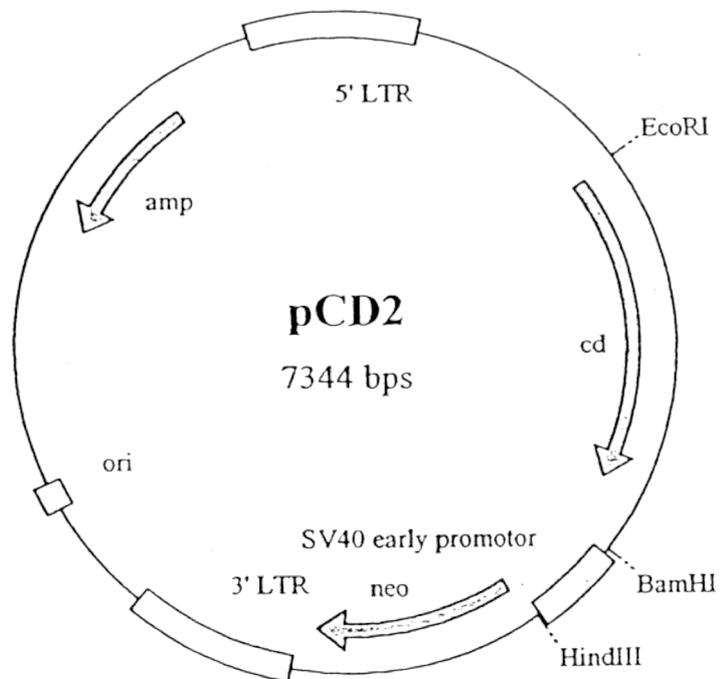


Abb. 2: pCD2

Der Vektor wurde freundlicherweise von M. Blaese, NIH, Bethesda, USA zur Verfügung gestellt. Er codiert das Cytosindeaminasegen von E.coli unter Kontrolle des 5'-MoMLV-LTR-Promotors sowie die Gene für die Neomycin- und Ampicillinresistenz zur Selektion in Eu- bzw. Prokaryoten (Mullen et al. 1992). cd = E.coli Cytosindeaminasegen; neo = Neomycinresistenzgen (Aminoglykosid-Phosphotransferasegen); ori = Replikationsstartpunkt (Erläuterung weiterer Abkürzungen: Abb. 1)



4. Geräte und Software

Verwendete Geräte und Software über die Basis-Laboraausstattung hinaus:

PCR-Cycler:	TRIO-Thermoblock (Biometra)
Durchflußzytometer:	FACScan, FACScalibur (BDIS)
Durchflußzytometer-Software:	CellQuest (BDIS) ModFit LT 2.0 (Verity Software House, Inc.; BDIS) WinMDI (2.8), Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA, USA
Magnetischer Zellsortierer:	MACS-Mini-Separator mit zugehörigen MACS MS+/RS+-Säulen (Miltenyi Biotec)
Fluoreszenzmikroskop:	(Zeiss, Jena) ausgestattet mit Zeiss-Filtern (450-490/FT 510/LP 520 und BP485/FT 510/515-565), digitaler Kamera CF 15/4 MCC (Kappa) und Image-Pro PLUS, Version 3.0.00.00 Software für Windows 95/NT (Media Cybernetics, Leiden, NL)
Automatisches Zellzählgerät:	Z1-Coulter Counter (Coulter Company)

B. Methoden

1. Transfektion und Selektion von Zellklonen mit stabiler Transgenexpression

1.1 Transfektion

Zur Etablierung eines Suizidgentherapie-Modellsystems für humane Gliome wurde die humane Gliomzelllinie U87 mit den Suizidgenvektoren pBABE*hygro/tk* bzw. pCD2 (Kap. II. A 3.) stabil transfiziert. Zur Transfektion wurde das Reagens FuGENE™ 6 entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Aufnahme der FuGENE-DNA-Komplexe in die Zellen erfolgt durch Endocytose. 24 h vor der Transfektion wurden $3 \cdot 10^5$ parentale Zellen (pro Einzelschale) in 6er-Multischalen (Costar) ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion erreichten die Zellen 50% Konfluenz und befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase. 100 µl serumfreies RPMI 1640-Medium wurden in ein 1,5-ml- Reaktionsgefäß vorgelegt. 6 µl des Transfektionsreagenz wurden in das Medium pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 2 µg des zu transfizierenden Plasmides (pBABE-*hygro/tk*, pCD2 bzw. pMACS4 aufgereinigt mittels Qiagen-Maxi-Prep, QIAGEN) vorgelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das verdünnte Transfektionsreagenz tropfenweise zur Plasmid-DNA pipettiert, vorsichtig gemischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Inkubation mit dem FuGENE-DNA-Komplex wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml serumhaltigem RPMI 1640-Medium bedeckt. Die DNA-FuGENE-Lösung wurde tropfenweise ins Zellmedium gegeben. Die Zellen wurden über Nacht mit dem fertigen Transfektionskomplex bei 37°C inkubiert, anschließend für 48 h in erneuertem Medium kultiviert.

1.2 Zytotoxische Selektion

Die transduzierten Zellen wurden trypsiniert und in geringerer Dichte in Petrischalen erneut ausplattiert. Zur Selektion von Einzelzellklonen wurden die Zellen in Medium unter Zusatz von 0,1-0,2 mg/ml Hygromycin B (pBABE*hygro/tk*) bzw. 1-2 mg/ml G418 (pCD2) weitere 10 Tage kultiviert. Einzelne Klone wurden trypsiniert, isoliert und nach ausreichender Amplifikation hinsichtlich ihrer zytotoxischen Sensitivität gegenüber GCV bzw. 5-FC im Vergleich zu nicht transduzierten Zelllinien getestet (Kap. 3.2.1). Für die weiteren Untersuchungen wurde jeweils der Zellklon mit der größten Sensitivität gegenüber der jeweiligen Prodrug ausgewählt.

2. Probenvorbereitung

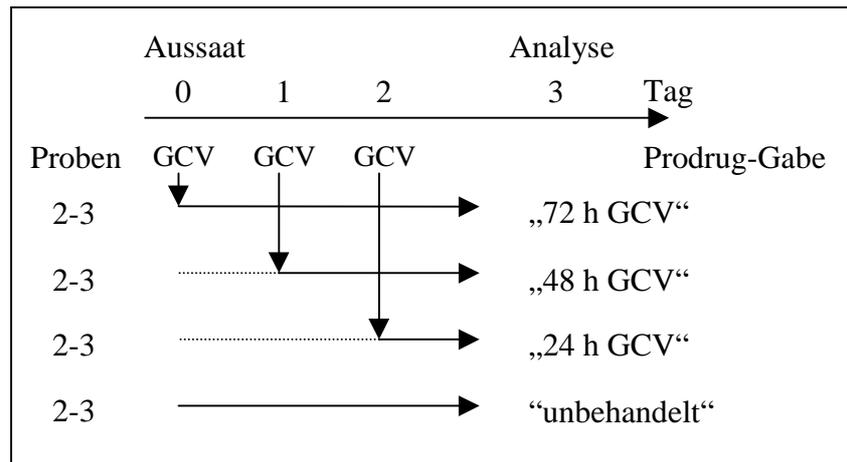
2.1 Vorbereitung der Zellzählungen

Die Probenvorbereitung für die Zellzählungen zur Ermittlung von Proliferation oder Zytotoxizität weicht ab von der für die Analysen in Kap. 2.2 geschilderten Verfahrensweise. Das Vorgehen ist in den Kapiteln 3.1. „Proliferation“ und 3.2. „Zytotoxizitätsbestimmung“ geschildert.

2.2 Vorbereitung der Analysen

Am Beispiel des HSV-*tk*/GCV-Systems veranschaulicht die Abb. 3 die Probenvorbereitung.

Abb. 3: An Tag 0 wurden die zu untersuchenden Zellen in einer Dichte von $4 \cdot 10^5$ in 10ml RPMI 1640-Medium in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät. 2 h nach der Aussaat wurden die „72 h GCV“-Proben („2-3“, bedeutet Duplikate bzw. Triplikate) mit 10µg/ml GCV als Mediumzusatz versetzt. An Tag 1 wurden die „48 h GCV“-Proben und an Tag 2 die „24h



GCV“-Proben mit GCV in der gleichen Dosierung versetzt. Ein Teil der Proben blieb unbehandelt, d.h. die Zellen erhielten keinen GCV-Mediumzusatz. An Tag 3 wurden die Proben den nachfolgenden Analysen unterzogen. Dieses Schema wurde für jede Zelllinie und auch für die Bystander-Zellmischungen eingehalten.

Bei der Untersuchung des *E.coli-cd/5-FC*-Systems wurde in gleicher Weise verfahren, jedoch wurde mit der ersten 5-FC-Inkubation („72 h 5-FC“) erst 24 h nach Aussaat begonnen. Die Proben wurden dann im Abstand von jeweils 24 h über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 100 µg/ml der Prodrug 5-FC behandelt bzw. unbehandelt belassen.

Actinomycin D wurde den Zellen in verschiedenen Konzentrationen (0,001-4 µg/ml) 24 h nach Aussaat zugesetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Proben prozessiert. Entsprechend wurde bei den Behandlungen mit Doxorubicin (20 µg/ml, 24 h), Etoposid (1 µg/ml, 24 h) oder Vincristin (0,1 µg/ml, 24 h) vorgegangen. Für die Untersuchungen zum Bystander-Effekt wurden in der Regel zwei Mischungsverhältnisse von nicht transduzierten und transduzierten Zellen untersucht: 4:1 und 1:1. Die ausgesäte Zellzahl setzte sich in diesen Fällen z.B. aus 80% 9L-Zellen und 20% 9L-*tk*-Zellen (entsprechend 4:1) bzw. 50% 9L- und 50% 9L-*tk*-Zellen (entsprechend 1:1) zusammen. Parallel dazu wurden jeweils auch die unvermischten Zelllinien analysiert.

Nach Abschluß der Inkubationsdauer wurden die adhärennten Zellen mit PBS/3mM EDTA vom Schalenuntergrund gelöst und in Suspension genommen, anschließend mit dem vorher isolierten Zellüberstand wieder vereinigt und schließlich zentrifugiert (5 Minuten, 300-g). Die resultierenden Zellpellets wurden dann in PBS resuspendiert und den jeweiligen Analyseverfahren unterzogen:

Für die FACS-Analysen wurden Aliquots von etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen für die Einzelmessung verwendet (Ausnahme: Mitochondrienpotentialmessungen, 10^6 Zellen). Pro untersuchtem Parameter wurden jeweils zwei Aliquots parallel prozessiert. Alle durchgeführten Untersuchungen wurden mindestens zweimal in unabhängigen Testreihen wiederholt. Jeder einzelnen FACS-Messung lagen 10.000 Analyse-Ereignisse zugrunde.

Für die Proteinextraktionen zur Analyse der Caspase-Aktivität wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Messung als Duplikate aliquotiert. Zur Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot sowie zur RNA- oder DNA-Isolierung wurden alle Zellen eines Versuchsansatzes zur Extraktion verwendet. Es wurden auch hier mindestens zwei unabhängige Testreihen durchgeführt.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden autoklavierte Objektgläser in 6er-Multischalen ausgelegt und mit jeweils 5 ml Kulturmedium bedeckt. Anschließend wurden 10^5 Zellen in diese Schalen (mit Objektgläsern) ausgesät und wie in Abb. 3 dargestellt behandelt. Nach Beendigung der Behandlungsphase wurden die mittlerweile Zell-beschichteten Objektgläser mit Aceton 10 min bei -20°C fixiert und mittels

eines handelsüblichen Klebemittels (Fixogum) auf Objektträgern (mit der Zellschicht nach oben) befestigt. Bis zur weiteren Analyse wurden diese Objektträger bei -70°C gelagert.

3. Zellzahlbestimmungen

Die Zellzahlen wurden durch elektronische Zellvolumenmessung nach Coulter (1956) bestimmt. Das Prinzip beruht auf der messbaren Absenkung einer Spannung (U) durch die Zelle. Ein konstanter Strom (I) wird an ein System (hier: Coulter Counter Z1), bestehend aus zwei Gefäßen gefüllt mit Salzlösung (Isoton II, Coulter), angelegt. Die beiden Gefäße kommunizieren dabei nur über eine kleine Apertur ($< 100 \mu\text{m}$) miteinander. Der Widerstand (R) des Stromkreises wird in der Hauptsache durch die Apertur bestimmt. Zellen haben eine geringere Leitfähigkeit als die Salzlösung. Passiert eine Zelle die Apertur, so erhöht sich der Widerstand, die Spannung fällt (nach Ohmschem Gesetz: $I = U/R$, mit I hier konstant). Das Ausmaß des Spannungsabfalls (Amplitude) korreliert mit dem Volumen der Zelle. Daher kann ein Schwellenwert der Zellgröße festgelegt werden ($> 6 \mu\text{m}$), ab dem ein Ereignis als „Zelle“ gewertet und gezählt wird. Eine Verfälschung der Meßergebnisse durch Vesikel u.a. Partikel $< 6 \mu\text{m}$ wird dadurch eingeschränkt. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen kann dabei allerdings nicht stattfinden. Deshalb wurden tote Zellen durch vorheriges Waschen der noch adhärennten Zellproben mit PBS entfernt. Mit dieser Methode konnte eine hohe Probenzahl prozessiert werden. Dem Ergebnis lag eine große Ereigniszahl zu Grunde. Vor jeder Zellzahlbestimmung wurden mikroskopische Kontrollen durchgeführt.

3.1. Proliferation

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität der einzelnen Zelllinien wurden jeweils 10^5 Zellen in Triplikaten (pro Tag und Zelllinie) in 6er-Multischalen ausgesät und mit 5 ml Medium bedeckt. Nach jeweils 24, 48 und 72 h wurde eine Zellzahlbestimmung als Dreifachwert mit Hilfe des Coulter Counters Z1 durchgeführt. Die Zellen einer Schale wurden nach zweifachem Waschen mit PBS mittels PBS/3mM EDTA vom Untergrund gelöst und dann in einem Probenvolumen von 10 ml gemessen. Mittelwerte und Standardabweichung wurden mittels Excel-Tabellenkalkulation bestimmt.

Die Generationszeit (t_g) wurde wie folgt bestimmt:
$$t_g = t / n$$

wobei t die Dauer der Kultur in Stunden zum Zeitpunkt der Bestimmung

und n die Generationszahl mit $n = \log 2 \cdot t / \log N - \log N_0$ ist.

N_0 gibt die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 (Ausgangszellzahl, hier 24 h nach Ausplattierung) und

N die Zellzahl zum Zeitpunkt der erneuten Bestimmung (Endzellzahl).

Bei den Zellzyklusanalysen (Kap. 4.2) kann mit Hilfe dieser Berechnung auf die zeitliche Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen (G_0/G_1 , S, G_2/M) anhand deren prozentuaalem Auftreten zurückgeschlossen werden. Bei einer Generationszeit von 20 h und einem Anteil von 10% der Zellen in der G_2/M -Phase ergibt sich beispielsweise eine Dauer dieser Phase von etwa 2 h.

3.2. Zytotoxizitätsbestimmungen

3.2.1 Prodrug-Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von GCV bzw. 5-FC auf transduzierte und nicht transduzierte Zelllinien wurden Zellen in einer Dichte von 10^5 /Schale in 6er-Multischalen (in 5 ml Medium) an Tag 0 als Triplikate ausgesät und mit steigenden Prodrug-Konzentrationen inkubiert. An Tag 4 wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS (zur Entfernung toter Zellen im Kulturüberstand) und nach Ablösung der Zellen mit PBS/3mM EDTA die Zellzahl im Z1-Zellzählgerät bestimmt.

3.2.2 Prodrug-Zytotoxizität in Kombination mit TNF α oder anti-CD95-Antikörper (CH11)

Zusätzlich zu den unter 3.2.1 beschriebenen Prodrug-Zytotoxizitätstests wurden parallel Ansätze mit 100 ng/ml TNF α bzw. 500 ng/ml anti-CD95-Antikörper (Klon CH11, Apoptose-stimulierend) in Kombination mit Prodrugs sowie ohne Prodrugzusatz behandelt und an Tag 4 ausgezählt.

3.2.3 Bystander-Effekt in Kokulturen

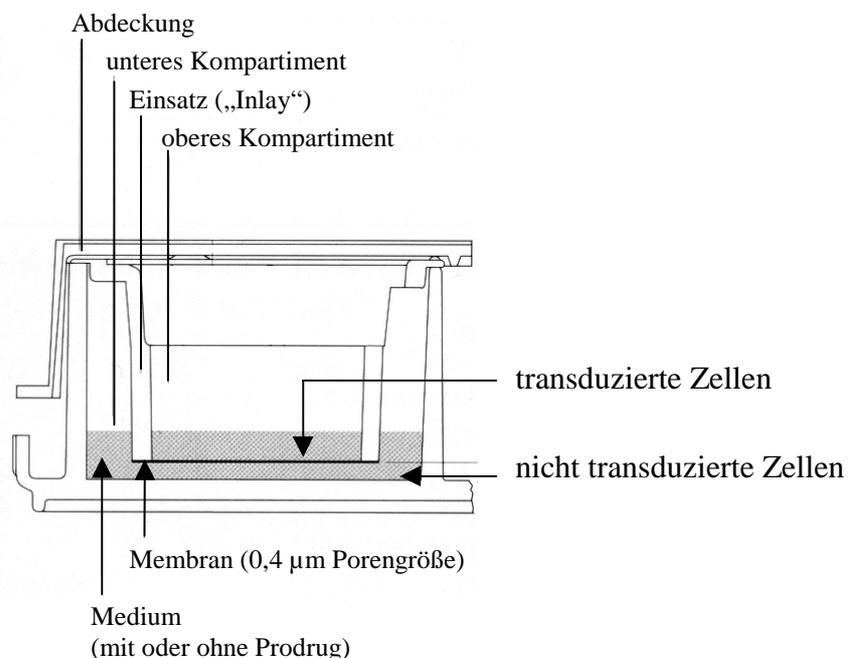
Zur Überprüfung, ob die transduzierten Zelllinien einen zytotoxischen Bystander-Effekt auf nicht-transduzierte Zellen in Kokulturen ausüben, wurde analog zu Kap. 3.2.1 vorgegangen. Zusätzlich wurden Zellmischungen ausgesät. An Tag 0 wurden ebenfalls 10^5 Zellen/Schale in 6er-Multischalen als Dreifachansätze übertragen. Neben den unvermischten Zelllinien wurden folgende Verhältnisse von nicht transduzierten zu transduzierten Zellen untersucht: 1:1 und 4:1. Das Kulturmedium wurde mit 10 μ g/ml GCV oder 100 μ g/ml 5-FC, für *tk*- bzw. *cd*-transfizierte Zellen, respektive, versetzt. Negative Kontrollen wurden in unversetztem Medium über denselben Untersuchungszeitraum kultiviert. Die Auswertung mittels Z1-Zellzählgerät wurde an Tag 4 durchgeführt.

3.2.4 Bystander-Effekt nach räumlicher Separierung

Zur Untersuchung der Zellkontaktabhängigkeit des Bystander-Effektes wurden parallel zu den oben geschilderten Bystander-Ansätzen identische Ansätze in „Transwell“-Multischalen (Costar) ausgesät. Der Corpus dieser Spezialschalen besteht aus gewöhnlichen 6er-Multischalen. In diese wurden die nicht transduzierten Zellen (in 2,6 ml Medium) ausgesät. In jede einzelne Schale wurde ein spezieller Einsatz („Transwell“ oder „Inlay“) eingesetzt, in den die transfizierten Zellen (in 1,5 ml Medium) ausplattiert wurden. Das Transwell ist über eine Membran mit dem unteren Kompartiment, in dem sich die nicht transduzierten Zellen befinden, verbunden. Es kommt zu einem Austausch von Medium und löslichen Substanzen zwischen den verschiedenen, räumlich getrennten Zellkompartimenten. Direkte Zellkontakte zwischen diesen Zellschichten können nicht auftreten (Abb. 4).

Abb. 4: Ausschnitt aus 6-Well-Platte mit herausnehmbaren Einsätzen. In das obere und untere Kompartiment können verschiedenen Zellpopulationen getrennt voneinander ausgesät werden. Die beiden Kompartimente sind voneinander durch eine Zell-undurchlässige Membran (0,4 μ m Porengröße) getrennt. Medium und darin gelöste Substanzen (< 0,4 μ m \varnothing) können zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden.

Die transduzierten Zellen wurden in den oberen Einsatz ausgesät und vor der Aufbereitung der nicht transduzierten Bystander-Zellen (im unteren Kompartiment) für Durchflußzytometrie oder Zellzählung zusammen mit dem Einsatz entnommen. (Abb. von Costar, Badhoevedorp, NL, modifiziert)



3.2.5 Bystander-Effekt in xenogenen Zellmischungen

Zur Überprüfung, ob ein Bystander-Effekt auch auftritt, wenn Zelllinien verschiedener Spezies kombiniert werden, wurden identische Ansätze wie in Kap. 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben auch in den folgenden Mischungen nicht transduzierter und transduzierter Zelllinien untersucht:

1. 9L und U87-*tk*, U87-*cd* oder 3T3-*tk*,
2. U87 und 9L-*tk*, 9L-*cd* oder 3T3-*tk* und
3. 3T3 und U87-*tk*, U87-*cd*, 9L-*tk* oder 9L-*cd*.

4. Durchflußzytometrische Analysen

Durchflußzytometer sind optische Meßsysteme zur Analyse von Fluoreszenz und Streulicht einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel oder Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Durchflußzytometer FACScan und FACSCalibur (BDIS) verwenden zur Anregung der Zellen einen Argonlaser (Emission bei 488 nm), analoge optische Signale vieler Einzelmessungen werden elektronisch digitalisiert und ausgewertet.

4.1 Morphologische Analysen mittels Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht

Mittels Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht lassen sich morphologische Parameter wie Zellgröße und Granularität beobachten. Die Intensität des gestreuten Lichtes ist unter bestimmten Voraussetzungen und mit bestimmten Einschränkungen proportional zum Zellvolumen (Mullaney et al. 1969). Da hier nur Proben identischer Ausgangszelllinien miteinander verglichen werden (Einfluß von Zellform, Zelloberfläche, Granularität, interner Struktur etc.) und die Versuchsbedingungen gleich gewählt werden (Probenprozessierung, Untersuchung identischer Ausgangszelllinien mittels gleicher Apparatur) ist diese qualitative Untersuchung hier anwendbar. Ein weiterer das Ergebnis beeinflussender Parameter ist der Refraktionsindex der Zellen im Vergleich zum Medium. Zellen mit beschädigten Membranen weisen einen geringeren Unterschied im Refraktionsindex im Vergleich zum Medium auf als unbeschädigte und zeigen daher eine geringere Intensität der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (Loken und Herzenberg 1975, Loken et al. 1979). Durch zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid (PI) lassen sich tote Zellen aus der Analyse ausschließen, da PI nur von Zellen mit beschädigten Membranen aufgenommen wird. Zur Analyse von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden die (wie in Kap. 2.2 beschrieben) gewonnenen Zellproben in PBS resuspendiert und anschließend ungefärbt sowie PI-gefärbt (5 µg PI/ml final in PBS, 10 min Inkubation unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur) mittels FACSCalibur analysiert.

4.2 Zellzyklusanalysen und Bestimmung des Anteils subdiploider Zellen einer Population

Die Analyse diploider Zellen mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung (nach Fixierung und RNA-Degradation) und anschließender FACS-Messung ergibt i.d.R. zwei Hauptpopulationen, d.h. in der Histogrammdarstellung zwei voneinander unterscheidbare Gipfel: G₀/G₁-Population (Ruhe- und „Gap 1“-Phase) und G₂/M-Population („Gap 2“- und Mitose-Phase) mit der dazwischen liegenden S-Phase (Phase der DNA-Replikation) von intermediärer Fluoreszenzintensität. Die „Gap“-Phasen bezeichnen Phasen erhöhter Biosyntheseaktivität, die zur Vorbereitung der folgenden S- bzw. M-Phase nötig sind. Ursache hierfür ist der (nahezu) konstante DNA-Gehalt, welcher bei diploiden Zellen in G₀/G₁ auch als 2N bezeichnet wird. In der Synthese- (S-) Phase des Zellzyklus nimmt der DNA-Gehalt zu, bis er nach Abschluß der Replikation 4N in der G₂/M-Phase erreicht. PI interkaliert allerdings auch in doppelsträngige RNA, die Fluoreszenz dieser RNA/PI-Partikel kann die DNA-Messung überlagern. Der Abbau von RNA vor der Analyse des DNA-Gehalts (Look et al. 1982) hat sich daher als Standard durchgesetzt. Bei Zellen, welche aus einem Arrest an der G₁/S-Grenze in Apoptose gehen, zeigt sich aufgrund fortschreitender Auflösung des Nukleus mit Abschnürung von DNA-haltigen Vesikeln und Auswaschung von degradierter DNA eine Fraktion von Zellen mit einer Fluoreszenz unterhalb des G₀/G₁-Peaks, welche in vielen Fällen aufgrund ihrer Gauß-

ähnlichen Verteilung auch quantitativ mittels entsprechender Software ausgewertet werden kann. Treten Zellen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (S- oder G₂/M-Phase) in Apoptose, so überlagert ihre Fluoreszenz die Bereiche der S- bzw. G₀/G₁-Phase, eine quantitative Auswertung ist hier eingeschränkt. Die durchgeführten Untersuchungen beschränken sich auf Vergleiche von Proben derselben Ausgangszelllinie miteinander, welche unterschiedlich vorbehandelt wurden (Kap. 2.2). Proben wurden nur dann direkt miteinander verglichen, wenn sie aus dem gleichen Experiment stammten. Unabhängige Experimente wurden separat ausgewertet und konnten dann qualitativ mit weiteren unabhängigen Experimenten verglichen werden. Variationen bedingt u.a. durch Unterschiede im absoluten DNA-Gehalt, unterschiedliche Färbbarkeit der DNA oder experimentell bedingte Variationen beeinträchtigten die Meßergebnisse daher nicht. Die (wie in Kap. 2.2 beschrieben) vorbereiteten Zellpellets wurden in 50 µl PBS resuspendiert und durch Versetzen mit 500 µl 80%-igem Ethanol (unter leichtem Vortexen) fixiert. Nach mindestens 1 h Fixierung auf Eis wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen, die Proben dabei intensiv gevortext, um degradierte DNA-Fragmente auszuwaschen. Anschließend wurde die zelluläre RNA durch 30-minütige Inkubation mit RNase A (DNase-frei, 50 µg/ml final) bei 37°C abgebaut und die DNA mit 5 µg/ml PI 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur, bei linearer FL-2-Einstellung. Zur Ausschließung von Dubletten (zusammenhängenden Zellen, welche als ein einziges Ereignis aufgezeichnet werden) wurde mittels des Parameters FL-2-„Width“ eingegrenzt und die Populationsverteilung über FL-2-„Area“ mittels ModFit (Vers. 2.0) ausgewertet.

4.3 Analyse der PS-Externalisierung

Ein häufig als früh bezeichnetes Ereignis im Verlauf des apoptotischen Zelltodes stellt die Umverteilung von Phosphatidylserin (PS), einem Phospholipid der Plasmamembran, dar. Normalerweise ist PS asymmetrisch hauptsächlich in der dem Cytoplasma zugewandten Oberfläche des Plasmalemmas vertreten (Op den Kamp 1979). Diese Asymmetrie geht oft bereits früh im Verlauf der Apoptose verloren, PS wird durch einen noch ungeklärten, eventuell aktiven Mechanismus in die äußere Phospholipidschicht gebracht (Fadok et al. 1992a, b). In Gegenwart von Ca²⁺-Ionen bindet AnnexinV PS mit hoher Affinität (Raynal and Pollard 1994). Externalisierung von PS wurde mittels FACS-Analyse unter Verwendung von FITC-konjugiertem AnnexinV gemessen. Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) wurde durchgeführt, um früh-apoptotische Zellen mit intakter Plasmamembran von spät apoptotischen oder nekrotischen Zellen, die in Folge zunehmender Membrandurchlässigkeit nicht mehr in der Lage sind, PI auszuschließen, zu unterscheiden (Koopman et al. 1994, Martin et al. 1995, Vermes et al. 1995).

Die (wie in Kap. 1.2 geschildert) gewonnenen Zellaliquots (2 · 10⁵ Zellen jeweils) wurden für die FACS-Analyse in 200 µl AnnexinV-Bindungspuffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) resuspendiert. Die Proben wurden versetzt mit 5 µl des gebrauchsfertigen AnnexinV-FITC-Reagenz (PharMingen) und mit 5 µg/ml PI unter Lichtausschluß 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt mit dem FACSCalibur (in Standardeinstellungen für FITC und PE) analysiert. Die Spezifität der AnnexinV-Bindung wurde mittels Konkurrenz mit löslichem o-Phospho-L-Serin, durch Verwendung nicht Ca²⁺-haltiger Puffer (PBS), durch Versetzen des Bindungspuffers mit EDTA (Chelatisierung Ca²⁺-Ionen) sowie durch zelluläre Kontrollen (Jurkat-T-Zellen mit und ohne Actinomycin D-Behandlung) überprüft.

Zusätzlich wurde PS-Exposition bei 9L und 9L-*tk*-Zellen nach Vorinkubation mit einem irreversiblen, zellpermeablen Caspase-Inhibitor (D’Mello et al. 1998; Boc-D-FMK, 10-100 µg/ml präinkubiert 1 h vor GCV-Applikation) gemessen. Nach 48 h GCV-Inkubation (10 µg/ml) wurde die PS-Exposition wie oben beschrieben untersucht. Zusätzlich wurden Zellaliquots zur Zellzählung (wie in Kap. 3 beschrieben) verwendet.

4.4 Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP, $\Delta\Psi_m$)

Das mitochondriale Transmembranpotential ist ein Parameter, welcher auf die Funktionalität der Mitochondrien einer Zelle und damit ihre Fähigkeit zur ATP-Synthese zurückschließen läßt. Der Verlust der selektiven Membranpermeabilität, welcher in einigen apoptotischen Signaltransduktionswegen eine initiale Rolle zu spielen scheint, kann mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung potentiometrischer Farbstoffe auf Einzelzellniveau demonstriert werden.

Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette speichert die aus Oxidationsreaktionen freiwerdende Energie in Form eines elektrochemischen Gradienten durch aktives Auspumpen von Protonen aus der Matrix in das Cytosol. Es entsteht ein elektrisches Transmembranpotential von etwa 180-200 mV (innen negativ) sowie ein Protonengradient von etwa einer log Stufe, einer pH-Einheit. Lipophile, kationische Farbstoffe wie Rhodamin-123 (Johnson et al. 1980) oder Carbocyanine (z.B. DiOC₆(3) (Terasaki 1998) oder JC-1 (Cossarizza et al. 1993)), dringen selektiv in Mitochondrien ein. Die Akkumulation des Farbstoffes in den Mitochondrien ist umso ausgeprägter, je höher das Transmembranpotential ist. Die Fluoreszenzintensität von DiOC₆(3) nimmt außerdem in lipophilem Milieu um das 6-fache zu (Sims et al. 1974), so daß ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz von Zellen mit aktiven und solchen mit depolarisierten Mitochondrien zu messen ist. DiOC₆(3) ist zwar nicht absolut spezifisch für Mitochondrien, es akkumuliert zu einem geringen Teil auch im Endoplasmatischen Retikulum (Terasaki et al. 1984) und reagiert sensitiv auf Plasmamembrandepolarisierung (Salvioli et al. 1997, Fricker et al. 1997). Diese unspezifischen Bindungen spielen jedoch bei Verwendung geringer Farbstoffkonzentrationen (wie hier geschehen) keine Rolle.

JC-1 hat zusätzlich die Eigenschaft, abhängig vom Transmembranpotential Aggregate in den Mitochondrien zu bilden, welche dann Licht einer geänderten Wellenlänge emittieren. Bei der üblichen Argonlaseranregung (488 nm) emittieren depolarisierte Mitochondrien (JC-1-Monomere) hauptsächlich Licht im Grünbereich (530 nm) und polarisierte Mitochondrien (JC-1-Aggregate) orangefarbenes Licht (590 nm). Der im Folgenden u.a. verwendete Farbstoff „MitoSensor“ der Firma Clontech besitzt ähnliche Eigenschaften. Im Unterschied zu JC-1 verbleiben jedoch die monomeren Farbstoffmoleküle im Cytosol der Zelle, so daß in der Fluoreszenzmikroskopie die Unterscheidung der Zellen mit verringertem Potential erleichtert wird, da die gesamte Zelle (außer der Bereich des Nukleus) deutlich grün erscheint. Farbstoffe wie DiOC₆(3) besitzen gegenüber JC-1-verwandten Farbstoffen den Vorteil, daß ein zweiter Parameter über Parallelfloreszenzmessungen gleichzeitig untersucht werden kann. So kann durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid eine Verwechslung von vitalen Zellen mit verringertem Potential mit toten Zellen ausgeschlossen werden. Bei JC-1 und MitoSensor kann eine solche Unterscheidung nur indirekt mittels Eingrenzung der Auswertung auf Zellen, die in Bezug auf Größe und Granularität im Vorwärts- und Seitwärtsscatter normal erscheinen, erzielt werden.

Allen genannten Farbstoffen ist die Einschränkung gemein, daß Zellen mit weniger Mitochondrien eine geringere Fluoreszenz zeigen, als solche mit einer höheren Anzahl dieser Organellen. Diese Variation ist jedoch deutlich geringer als die durch Depolarisation beobachtete Fluoreszenzabnahme. Durch Ausschließung extrem verkleinerter Zellen und apoptotischer Vesikel in der FACS-Analyse wurde dieser möglichen Fehlerquelle in der vorliegenden Arbeit entgegengewirkt. Zur Bestimmung des Einflusses von Mitochondrienzahl/Zelle auf die Fluoreszenzabnahme durch Mitochondriendepolarisierung werden gelegentlich Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. 10-Nonyl-Acridinorange, „MitoFluor Green“ oder „MitoTracker Green“ (MolecularProbes, MoBiTec) verwendet. Die Sensitivität dieser Verbindungen ist jedoch umstritten, zudem werden sie durch veränderte Mitochondrienmembranpotentiale beeinflusst (Keij et al. 2000), so daß hier auf eine solche Kontrolle verzichtet wurde.

Als funktionale Kontrolle sowie zur Einstellung von FL-1, FL-2 und der Kompensation im FACSCalibur wurden bei den Messungen jeweils Proben parallel mit Substanzen behandelt, die das Membranpotential kollabieren lassen. mCICCP (m-Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon) ist ein Entkoppler der oxidativen

Phosphorylierung. Werden Zellen vor der Zugabe von potentiometrischen Farbstoffen mit mCICCP behandelt, bleibt eine Konzentrierung des Farbstoffs in den Mitochondrien der Zelle aus, da das Transmembranpotential durch die Entkopplung sinkt. Schwache mitochondriale Hintergrundfluoreszenz ist dann ausschließlich durch unspezifische Bindung des Farbstoffes begründet. Die gemessene geringe zelluläre Fluoreszenz korreliert unter diesen Umständen mit den Parametern Zellgröße und dem Plasmamembranpotential.

10^6 Zellen/ml wurden mit 40 nM DiOC₆(3) in PBS bei 37°C für 30 min äquilibriert. Kontrollen wurden zur Depolarisierung zuvor 30 min bei 37°C in 200 µM mCICCP/PBS inkubiert (in Anlehnung an: Macho et al. 1995, Zamzami et al. 1995). Nach Gegenfärbung mit PI (5 µg/ml final) wurden die Proben direkt mittels FACSCalibur analysiert. Zellfärbungen mit dem MitoSensor-Farbstoff (Clontech) wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt: 10^6 Zellen/ml wurden mit 5 µg/ml Mitosensor in Inkubationspuffer (oder Serum-freiem Medium) 20 min bei 37°C (Brutschrank) inkubiert, mit Inkubationspuffer gewaschen und nach Zentrifugation (350-g) auch darin resuspendiert und schließlich direkt mittels FACSCalibur oder Fluoreszenzmikroskop analysiert. Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Färbungen in situ in 6er-Multischalen durchgeführt.

4.5 Expression der Todes-Rezeptoren CD95 und TNF-RI

Eines der am genauesten charakterisierten Systeme zur Induktion von Apoptose ist der Cytokin-medierte Signaltransduktionsweg, insbesondere über die Membranrezeptoren CD95 und TNF-RI (Nagata 1994, Smith et al. 1994). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte FACS-Analyse der jeweiligen Oberflächen-Rezeptor-Expression sollte zeigen, ob diese Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden und ob sich deren Expression im Verlauf der Gentherapie bzw. der Behandlung mit Actinomycin D verändert.

Hierzu wurden die (wie in Kap. 2.2 beschrieben) gewonnenen Zellpellets in PBS/5%BSA resuspendiert. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte bei sättigender Konzentration während einer 1 h Inkubation auf Eis (unter Lichtausschluß bei CD95-PE). Überschüssige Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Bei Verwendung des direkt konjugierten CD95-Antikörpers wurden die Zellen nach diesen Waschschritten direkt im Durchflußzytometer gemessen. Der unkonjugierte TNF-RI-Antikörper wurde mittels sekundärem, PE-gekoppeltem Antikörper detektiert (sättigende Konzentration, 30 min, auf Eis, unter Lichtausschluß) und nach erneuter Entfernung überschüssiger Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS mittels FACSCalibur gemessen. Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

Maus IgG₁ monoklonaler, PE-konjugierter anti-human CD95-Antikörper (kreuzreaktiv mit Ratten-CD95) sowie entsprechende Isotypkontrolle (Maus IgG₁-PE). Maus IgG₁ monoklonaler anti-human TNF-RI-Antikörper (kreuzreaktiv mit Ratten-TNF-RI) sowie korrespondierende Isotypkontrolle (Maus IgG₁). Als Detektionsantikörper wurde der Sekundärantikörper Ziege anti-Maus-Ig-PE eingesetzt.

4.6 FACS-Analysen von Bystander-Zellen

Zur Analyse apoptotischer Merkmale in Bystander-Zellen wurden die folgenden Strategien ausgetestet und die Ergebnisse miteinander verglichen:

4.6.1. Direkte Untersuchung von Zellmischungen

Wie in Kap. 2.2 beschrieben, wurden an Tag 0 zusätzlich zu unvermischten transduzierten und nicht transduzierten Zellen auch Mischungen dieser Zellen in den Verhältnissen 1:1 und 1:4 ausgesät und mit den jeweiligen Prodrugs behandelt bzw. unbehandelt gelassen. An diesen Proben wurden die in Kap. 4.1-4.5 beschriebenen FACS-Messungen durchgeführt.

4.6.2 Räumliche Separierung von Bystander-Zellen mittels Einsätzen („Inlays“)

In 6er-Multischalen („Transwells“, Abb. 4) wurden nicht transduzierte Zellen ausgesät und mit Medium bedeckt. In die eingesetzten Inlays wurden die transduzierten Zellen ausgesät (Kap. 3.2.3). Nach Abschluß der Inkubationsphase wurden die in den Inlays befindlichen transduzierten Zellen entnommen und die verbliebenen reinen Bystander-Zellen für die durchflußzytometrischen Messungen eingesetzt. Dieses Verfahren war nur auf *cd*-transfizierte Zellen anwendbar, da nur diese einen Bystander-Effekt aufweisen, der unabhängig von Zell-Zell-Kontakten funktioniert. Effekte, die auf Zell-Zell-Kontakten beruhen, werden dabei nicht erfaßt. Diese Versuche wurden parallel zu den in Kap. 4.6.1 beschriebenen durchgeführt.

4.6.3 Identifizierung von Bystander-Zellen durch Fluoreszenzmarkierung

Die Analyse von Bystander-Zellen wurde auch nach selektiver Anfärbung der transduzierten Zellen mittels des Membranfarbstoffs DiIC₁₈(3) durchgeführt. DiIC₁₈(3) gehört zu den langkettigen Dialkylindocarbocyaninen, welche als Markierungsfarbstoffe insbesondere bei vitalen oder fixierten neuronalen Zellen Verwendung finden. Der Farbstoff hat keinen unmittelbaren Einfluß auf die Vitalität oder andere physiologische Eigenschaften der Zellen. Der lipophile Farbstoff integriert sich in die Zellmembran und breitet sich dort durch laterale Diffusion aus (Honig und Hume, 1986). Im allgemeinen wird (z.B. während der Kolltivierung) kein Farbstoff von markierten auf unmarkierte Zellen übertragen, außer bei Freisetzung des Farbstoffes durch Aufbrechen der Membran bei nekrotischen oder spät apoptotischen Zellen. Diese mögliche artifizielle Färbung von Bystander-Zellen, welche z.B. auch durch Aufnahme apoptotischer Vesikel erfolgen kann, ist jedoch, wie hier dargestellt wurde, so gering, daß die Aussagen des Versuches dadurch nicht beeinträchtigt werden. DiIC₁₈(3) hat ein Absorptions- und Fluoreszenzspektrum, welches mit Rhodamineinstellungen kompatibel ist, kann also mittels Argonlaser angeregt werden und emittiert dann Fluoreszenzlicht von etwa 565 nm Wellenlänge, welches im FL-2-Kanal gemessen werden kann.

Zur Markierung wurden die transfizierten Zellen (*9L-tk* bzw. *U87-tk*) vor der unter Kap. 2.2 beschriebenen Probenvorbereitung 30 min bei 37°C im Zellinkubator in 10 µM DiIC₁₈ ($3 \cdot 10^6$ Zellen/6 ml 10 µM DiIC₁₈ in RPMI) inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen mit PBS entfernt, die Zellzahl bestimmt und mit der Probenvorbereitung, wie für gewöhnliche Bystander-Ansätze (Kap. 4.6.1) beschrieben, fortgefahren.

5. Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie dienten hier einerseits zur qualitativen Überprüfung der FACS-Analysen andererseits zum Nachweis spezifischer Antigene mittels Immunfluoreszenz. Bei diesen Antigenen handelte es sich um p53 sowie exprimierte p53-Zielgene (Kap. 9.) und weitere Apoptose-relevante Proteine.

5.1 Qualitative Überprüfung und Dokumentation der FACS-Analysen

Aliquots der für die FACS-Analysen aufbereiteten Zellsuspensionen wurden auf Objektträger übertragen und mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Dokumentation erfolgte mittels digitaler Kamera und Bildbearbeitungs-Software.

5.2 Nachweis spezifischer Antigene

Die Färbungen wurden an Aceton-fixierten Zellpräparaten (Kap. 2.2) durchgeführt. Bis zur Inkubation des Zweitantikörpers folgte das Prozedere dem Standard-ABC-Färbeprotokoll für Immunhistochemie (Kap. 6.2). Spezifische Antigene wurden nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegen-Serum mittels der auch für die Proteinexpressionsstudien verwendeten, unmarkierten Maus-IgG-Antikörper (5 µg/ml, Kap. 9.6.2) gebunden, anschließend indirekt mit biotinkoppelten sekundären Ziegen anti Maus-IgG-Antikörpern (5 µg/ml in Blockierungsserum; Inkubation in Feuchtkammer 30 Minuten 37°C,

anschließend Waschen in PBS) inkubiert und schließlich mit Streptavidin (PE- oder FITC-konjugiert) visualisiert (10 min Inkubation bei 37°C und Waschen in PBS).

6. Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Methodik wurde die Expression spezifischer Antigene im Verlauf verschiedener Behandlungen (Gentherapie, Actinomycin D, Doxorubicin, Etoposid und Vincristin) bei den Gliomzelllinien in situ untersucht. Desweiteren wurden morphologische, nukleäre Veränderungen sowie DNA-Degradierungen analysiert.

Spezifische Antigene wurden immunhistochemisch mittels Standard ABC-Färbereaktion (Camon, Vector Laboratories) in situ gefärbt. Aceton-fixierte Zellpräparate (Kap. 2.2) wurden in PBS äquilibriert, anschließend 20 min mit 1:50-verdünntem Normalserum blockiert. Dieser und alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei 37°C durchgeführt. Der Primäantikörper wurde in Normalserum verdünnt (5 µg/ml final) und nach Abtropfen überschüssigen Serums auf das Präparat aufgetragen. Die Präparate wurden mit dem Primäantikörper 1 h inkubiert. Nach Waschen der Präparate mit PBS wurde 30min mit dem verdünnten biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Währenddessen wurde das ABC-Reagenz bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase neu angesetzt und nach Waschen der Präparate aufgetragen (30 min Inkubation). In der Zwischenzeit wurde das Peroxidase-Substrat/Chromogengemisch angesetzt. Sigma Fast DAB (3,3'-Diaminobenzidin)- und Wasserstoffperoxid-Tabletten wurden im Verhältnis 1:1 (pro 5 ml H₂O) in destilliertem Wasser gelöst und zur Entfernung grober Farbpartikel gefiltert (0,4 µm Poren). Nach Abschluß der ABC-Inkubation und intensiven Waschens der Präparate mit PBS wurde die Entwicklung durch Inkubation mit dem Substrat/Chromogengemisch (5-8 min, bei Raumtemperatur) durchgeführt und im PBS-Bad gestoppt. Nach Eindecken der Präparate in Glyceringelatine wurden sie lichtmikroskopisch analysiert und dokumentiert (Kap. 6.1). Als Primäantikörper wurden die unter Kap. 9.6.2 aufgeführten Antikörper, insbesondere anti-Ratte/human p53 (PAB122), welcher sowohl mutiertes als auch Wildtyp-p53 erkennt, und zusätzlich Maus anti-Dansyl (IgG1-Negativ-Kontrolle) eingesetzt.

7. TUNEL-Test

Der TUNEL-Test („TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“) ermöglicht die Identifizierung apoptotischer Zellen in situ auf Einzelzellniveau. Im Verlauf der Apoptose kommt es zu DNA-Strangbrüchen, welche selektiv mittels terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TdT) markiert werden können. Dieses Enzym katalysiert die kovalente Bindung von dNTPs bzw. modifizierten dNTPs oder Analoga (hier: Fluorescein-markiertes dUTP) an freie 3'-OH-DNA-Enden. Hieraus resultiert eine Anfärbung apoptotischer Nuclei, welche mikroskopisch betrachtet und dokumentiert werden kann.

Aceton-fixierte Zellpräparate wurden in PBS (4°C) äquilibriert und anschließend 2 min auf Eis in Permeabilisierungslösung (0,1% Triton X-100; 0,1% Natrium-Citrat) inkubiert. Nach Waschen der Präparate in PBS wurden für die Markierungsreaktion 50 µl der gebrauchsfertigen „Tunel“-Reaktionsmischung (50 µl TdT-Lösung/450 µl Markierungslösung) auf die Zellen aufgetragen und 60 min inkubiert. Diese und die folgenden Inkubationsschritte wurden bei 37°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach Waschen der Präparate mit PBS konnte das Ergebnis der Reaktion mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Für die Signalkonvertierung zur lichtmikroskopischen Analyse wurden 50 µl Konverter-AP-Lösung (anti-Fluorescein-Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) je Präparat aufgebracht und 30 min mit Parafilm bedeckt inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurde die Detektion mit 50-100 µl Substratlösung (Fast Red, Inkubation 10 min bei Raumtemperatur) vorgenommen. Überschüssige Substratlösung wurde durch Waschen in PBS entfernt, die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt und mikroskopiert/dokumentiert (Kap. 6.1).

Als Negativ-Kontrolle dienten Zellpräparate, die unter Weglassung des Enzyms den gleichen Inkubationsschritten unterzogen wurden. Als positive Kontrolle wurden permeabilisierte Zellpräparate vor der Markierungsreaktion in DNase I-Lösung (10 µg/ml, 10 min bei Raumtemperatur) inkubiert. Sämtliche Reagenzien des Tests wurden von Roche Diagnostics (In Situ Cell Death Detection Kit, AP) bezogen.

8. Detektion des DNA-Laddering

Ein als typisch beschriebenes Merkmal für Apoptose ist die Spaltung chromosomaler DNA durch zelluläre Endonukleasen, wodurch Fragmente von 180-200 bp Länge sowie Vielfache dieser Fragmentgröße entstehen. Nach Auftrennung dieser Fragmente mittels Gelelektrophorese ergibt sich das Bild einer Leiter, wodurch der Begriff „DNA-Leiter“ („DNA laddering“) geprägt wurde (Wyllie 1980).

DNA-Degradation wurde zunächst nach Standard-Methodik mittels Zellyse, ProteinaseK-Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion, Isopropanol-Fällung der DNA, RNase-Verdau und Standard-Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) untersucht. Es war jedoch nicht möglich, für die Dokumentation ausreichend hochauflösende Bilder der DNA-Leiter zu gewinnen. Dieses Ziel wurde hier nach Anwendung des sensitiveren „ApoAlert™ LM-PCR Ladder Assay Kits“ gemäß den Angaben des Herstellers (Clontech) erreicht („PCR“, Kap. 10).

Prinzipiell wird hier eine Signalverstärkung durch Anwendung einer Ligase-medierte PCR erreicht. An freie 5'-Phosphatendungen der chromosomalen DNA werden 3'-OH-Enden eines dephosphorylierten Adaptoroligomers (bestehend aus einem gepaarten 12er- und einem 24er- Oligonukleotid) legiert. Durch die Dephosphorylierung des Adaptors kann nur das 24er-Oligonukleotid kovalent mit chromosomaler DNA verbunden werden, da nur dieses eine sterisch gut zugängliche 3'-OH-Gruppe besitzt (beim 12er Oligonukleotid durch den Überhang des längeren Oligonukleotids behindert). Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 72°C dissoziiert das 12er-Oligonukleotid und die überhängenden Enden werden durch Taq DNA-Polymerase aufgefüllt. In den folgenden PCR-Zyklen fungiert das 24er-Oligonukleotid nun als Primer der DNA-Synthese. Sequenzunabhängig können mit dieser Methode DNA-Fragmente amplifiziert werden, wobei kleinere Fragmente in der Synthese einen Vorteil gegenüber größeren haben und so zusätzlich verstärkt werden.

Aus den wie in Kap. 2.2 geschildert vorbereiteten Proben wurde DNA mittels QIAamp Blood Kit (QIAGEN) isoliert, die Ausbeute durch Spektrophotometrie bestimmt. 1 µg DNA je Probe wurde vermischt mit 70 µl Ligationsansatz 10 min bei 55°C inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 1 h graduell auf 10°C abgekühlt (Inkubation im Thermocycler). Nach 10 min Inkubation bei 10°C wurden 0,5 µl T₄-DNA-Ligase hinzupipettiert und der Ligationsansatz für weitere 12-16 h bei 16°C inkubiert.

Für die PCR wurden 150 ng Adaptor-legierter DNA eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben mit PCR-Puffer, sterilem Wasser, der 10x LM-PCR-Mischung und der KlenTaq-1 DNA-Polymerase/TaqStart-Antikörper-Mischung auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. KlenTaq-1 ist eine N-terminal deletierte Taq DNA-Polymerase, der die Exonukleaseaktivität fehlt. TaqStart™-Antikörper sorgt für automatischen Hot Start (Kellogg et al. 1994). Nach 8 min Inkubation bei 72°C wurden 25 Zyklen (1 min 94°C, 3 min 72°C) im Thermocycler durchlaufen, gefolgt von einer abschließenden Synthesephase von 15 min bei 72°C.

10 µl des PCR-Ansatzes wurden danach mittels Standard-Agarose-Gelelektrophorese (1,2% Agarosegel, 2,5 h Lauf bei 6 V/cm) und Sichtbarmachung mit Ethidiumbromid unter UV-Anregung (Sambrook et al. 1989) auf DNA-Laddering untersucht.

9. Colorimetrische Detektion der Caspase 3-Enzymaktivität

Die Aktivierung von Cystein-Proteasen, den „Caspasen“, ist von Bedeutung u.a. für die Effektor-Phase des apoptotischen Zelltodes (Übersicht: Thornberry und Lazebnik 1998). Hier wurde die Rolle der Effektor-Caspase 3 im Verlauf der Gentherapie bzw. der Actinomycin D-Behandlung untersucht.

Caspase 3-Enzymaktivität wurde mittels colorimetrischem Test entsprechend dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll (ApoAlert Caspase 3 Assay, Clontech) gemessen. Das Test-Prinzip beruht auf der Spaltung des artifiziellen Caspase 3-Substrats DEVD-pNA, die zur Bildung des spektrophotometrisch bei 405 nm detektierbaren Chromophors p-Nitroanilid (pNA) führt. Die pNA-Bildung pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Caspase 3-Aktivität im untersuchten Zellysat.

Zellpellets ($2 \cdot 10^6$ Zellen jeweils) wurden, wie in Kap. 2.2 beschrieben, angefertigt und bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Als Negativkontrolle wurden Zellpellets von unbehandelten Zellen angefertigt. Zellpellets der gleichen Behandlungssequenz wurden immer gemeinsam aufgearbeitet und in 96-Well-Platten gleichzeitig der Absorptionsmessung unterzogen. Zur Abgrenzung unspezifischer Enzymaktivität wurden parallel Proben mit irreversiblen Caspase 3-Inhibitor DEVD-fmk ($5 \mu\text{M}$ final) vorbehandelt (30 min bei 37°C) und erst danach mit Caspase 3-Substrat versetzt.

Zur Feststellung der Caspase 3-Aktivität in Bystander-Zellmischungen wurden an Tag 0 Zellmischungen 10:0, 9:1, 8:2, etc. bis 0:10 von nicht transduzierten und transduzierten Zellen ausgesät und behandelt (Kap. 2.2). Parallel dazu wurden die gleichen Zellen getrennt voneinander als reine Populationen in gleicher Weise behandelt und erst am Tag der Analyse in den gleichen Zellzahlverhältnissen nachträglich gemischt. Die Caspase 3 Aktivität wurde dann direkt gemessen.

10. Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden für einen nachfolgenden immunologischen Nachweis elektrophoretisch auf Membranen übertragen. Das Prinzip wurde 1979 von Towbin entwickelt, der Name „Western Blot“ für diese Methode von Burnette (1981) in Anlehnung an „Southern Blot“ (Southern 1975) und „Northern Blot“ (Alwine et al. 1977) für die entsprechende Übertragung von DNA bzw. RNA auf Membranen geprägt. Sollen im Anschluß spezifische Antigene mittels Immunglobulinen nachgewiesen werden, spricht man auch von einem „Immunoblot“ (Towbin und Gordon 1984).

Diese Methodik wurde hier zur Untersuchung der Protein-Expression von p53 und p53-Zielgenen (mdm2, bax, p21) sowie weiterer Apoptose-relevanter Proteine während der Gen- bzw. Actinomycin D-Therapie eingesetzt.

10.1 Zellyse und Proteinextraktion

Zur Zellyse und Proteinextraktion wurde ein detergenzhaltiger Puffer mit hoher Salzkonzentration gewählt, welcher neben den löslichen Proteinen des Cyto- und Karyosols auch Membranproteine (aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100) und z.B. Nukleinsäure-assoziierte Proteine (aufgrund der Störung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA/RNA durch die hohe Salzkonzentration) löst. Zur Inaktivierung gleichzeitig freigesetzter zellulärer Proteasen sind Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, inhibiert Serinproteasen) und EDTA (indirekte Inhibition von Metalloproteasen durch Bildung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Chelaten) beigegeben. Dithiothreitol verhindert die Oxidation von Thiolgruppen zu Cystin. Die gewonnenen Zellpellets (Kap. 2.2) wurden in 10-fachem Volumen Zellysepuffer (10 mM Tris (pH 7,5); 140 mM NaCl; 1,5 M KCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF; 1 mM DTT) vollständig resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen dreimal je 10 s mit Ultraschall behandelt (bei 4°C), der zelluläre Debris abzentrifugiert, und der wäßrige Überstand mit den darin gelösten Proteinen in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden diese Proben bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

10.2 Konzentrationsbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellysate wurde der „DC Protein Assay“ (BioRad) durchgeführt, der auf einer von Lowry et al. (1951) entwickelten Methode beruht. In alkalischer Lösung reagiert Kupferartrat mit Proteinen, die Kupfer-behandelten Proteine reduzieren anschließend

Folin. Die Farbentwicklung korreliert mit dem Gehalt an Tyrosin und Tryptophan und in geringerem Ausmaß auch mit dem Gehalt an Cystin, Cystein und Histidin. Bei der Reduktion verliert das Folinreagens 1-3 Sauerstoffatome und bekommt eine charakteristische blaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm (Peterson et al. 1979).

Von den zu analysierenden Zellysaten wurden Verdünnungen (1:50) in Zellysepuffer angefertigt. Als Proteinstandard wurde eine 10%-ige BSA-Lösung verwendet. Eine Verdünnungsreihe von 1 mg/ml bis zu 50 µg/ml BSA in Lysepuffer wurde angefertigt. Sowohl von den Proben als auch von den Standards wurden die Bestimmungsreaktionen als Duplikate angesetzt. 15 µl Probe bzw. Standard wurden in Polystyrenküvetten mit 75 µl Reagens A' (Reagens A (alkalische Kupferartratlösung) versetzt mit 20 µl/ml Reagens S) vermischt. Nach Zugabe von 600 µl Reagens B (verdünntes Folinreagenz) und Durchmischung wurde nach 15 min Farbentwicklung die Absorption mittels Spektrophotometer bei 750 nm gemessen. Aus den Mittelwerten der Extinktionen der Standardverdünnungen wurde eine Eichkurve erstellt. Die Proteinkonzentrationen der Proben konnten entsprechend ihrer Extinktionswerte aus dieser Standard Eichkurve genähert abgelesen werden.

10.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in einer porösen Gelmatrix nach ihrer Größe müssen sie vollständig denaturiert werden. Dies geschieht durch eine Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und einem Cystinspaltenden Thiolreagenz (hier: Dithiothreitol, DTT) unter Erhitzung. In wäßrigem Millieu binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen den aliphatischen Teil des SDS, während die negativ geladene Sulfatgruppe nach außen gerichtet ist. Die Eigenladung der Proteine wird überdeckt. Durch die Beladung von 1 g Protein mit etwa 1,4 g SDS entsteht ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis, die Retardierung eines Proteins im Gel ist dann linear abhängig vom Molekulargewicht.

Zur Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele verwendet (Lämmli 1970). 8-12%-ige Trenngele mit aufgelagerten 4%-igen Sammelgelen (0,75 mm dick) wurden entsprechend den Angaben von Sambrook et al. (1989) angefertigt. Diese sind geeignet für die Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 15 und 120 kD. Für die Elektrophorese wurde das Mini Protean II System (Bio-Rad) verwendet. Die Gele wurden mit Laufpuffer bedeckt (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Pro Spur wurden jeweils 80 bzw. 100 µg Protein 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt (100 mM Tris/Cl pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenol-Blau; 20% Glycerol), 3 min auf 100°C erhitzt und anschließend in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Nach Anlegung der Spannung (65 V, etwa 1 h) wandern Chloridionen als Leitonen mit höchster Geschwindigkeit vor der Proteinfraktion. Glycinionen, bei pH 6,8 hauptsächlich als in der Summe ungeladene Zwitterionen vorliegend, bleiben dahinter zurück. Die SDS-Proteinmizellen werden zwischen diesen Leit- und Folgeionen in einer Zone geringer Leitfähigkeit aufkonzentriert und erreichen fokussiert das Trenngel, wo sie dann ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden (95 V, 2-3 h). Durch den höheren pH-Wert hier erhält Glycin eine negative Nettoladung und wandert als Front vor der Proteinfraktion. Zur Molekulargewichtsbestimmung sowie zur visuellen Kontrolle von Gelelektrophorese und anschließendem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (SDS-7B) aufgetragen. Miteinander zu vergleichende Proben wurden nebeneinander auf dasselbe Gel aufgetragen, z. B. Proteinextrakte aus nicht transduzierten und *tk*-transduzierten Zellen (jeweils unbehandelt und nach 24 h, 48 h und 72 h GCV-Inkubation) sowie Extrakte *tk*-transduzierter Zellen nach 72 h 5-FC-Inkubation. Entsprechend wurde für die *cd*-transduzierten Zellen verfahren. Zusätzlich wurden Extrakte aller Zellen jeweils unbehandelt und nach 24 h Inkubation mit Actinomycin D (Kap. 2.2) miteinander verglichen.

10.4 Tank-Blotting

Die mit hoher Auflösung in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden für die nachfolgenden immunologischen Nachweismethoden elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen (Hybond) übertragen. Als Transferpuffer wurde der Tris-Glycin-Puffer der SDS-PAGE benutzt, dem jedoch weniger SDS (0,037%) und zusätzlich 20% (vol/vol) Methanol zugesetzt wird. Methanol erhöht die Bindungseffizienz der Proteine an Nitrozellulosemembranen. Als Bindungsursache werden hydrophobe Wechselwirkungen und schwache elektrostatische Kräfte angenommen. Die Bindungskapazität der Nitrozellulosemembranen beträgt 80-200 µg Protein/cm², was bei einer Auftrennung von 80 µg/Spur mehr als ausreichend ist (Nyholm und Ramlau 1988). Etwa 25 min vor Beendigung der Gelelektrophorese wurden die passend zugeschnittenen Membranen 5 min in destilliertem Wasser und anschließend für weitere 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele ebenfalls 5 min in Puffer äquilibriert. Die Transfer Einheit bestehend aus in Transferpuffer getränkten, passend zugeschnittenen 3MM-Papieren, dem Proteingel und der Membran, wurde, wie im Labormanual von Sambrook et al. (1989) geschildert, aufgebaut. Der Transfer wurde etwa 16 h bei konstanter Spannung (4 V/cm) mit vorgekühltem Puffer (4°C) durchgeführt.

10.5 Unspezifische Gesamtproteinfärbung: Ponceau S

Nach Abschluß des Blotverfahrens kann die Transfereffizienz visuell anhand der Vollständigkeit der Übertragung des vorgefärbten Proteinmarkers SDS-7B aus dem Gel auf die „Blotting“-Membran kontrolliert werden. Zur genaueren Überprüfung der Gleichmäßigkeit des Proteinmengenauftrags der Proben (80 µg/Spur) sowie deren Transfereffizienz wurden die Membranen einer unspezifischen Proteinfärbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S unterzogen. In saurer Lösung bilden die anionischen Natriumsulfonatgruppen des Azofarbstoffes feste Ionenbindungen mit den protonierten Aminosäurebausteinen der Proteine aus. Färbungen mit Ponceau S sind daher reversibel und interferieren nicht mit den nachfolgend angewendeten immunchemischen Detektionsverfahren (Salinowich und Montelaro 1986).

Zur Färbung wurden die „geblotteten“ Nitrozellulosemembranen kurz in PBS gespült und anschließend 3 min unter leichtem Schütteln in Ponceau S-Gebrauchslösung (0,1% Ponceau S in 5% (vol/vol) Ethansäure) inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger Farblösung mittels Waschen in PBS wurden die gebundenen Proteine als rosafarbene Banden sichtbar. Die Farbintensitäten der Spuren wurden visuell miteinander verglichen. Durch Überführung der Membranen in PBS (pH 7,4) wurde die Färbung anschließend wieder ausgewaschen.

10.6 Immunologischer Nachweis

10.6.1 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundreaktionen wurden unspezifische Bindungsstellen der Membranen vor der Inkubation mit den primären Antikörpern mittels dreistündiger Inkubation in einer frisch angesetzten 5%-igen Suspension von Magermilchpulver („Blotto“) in PBS unter konstantem, leichtem Schütteln bei Raumtemperatur abgesättigt.

10.6.2 Inkubation mit primären Antikörpern

Zur Detektion spezifischer Proteinbanden auf den Membranen wurden monoklonale Antikörper mit entsprechender Spezifität verwendet. Die Antikörper wurden so ausgewählt, daß das jeweilige zu detektierende Epitop bei den Spezies Ratte (9L-Zelllinie) und Mensch (U87-Zelllinie) gleichermaßen erkannt wird.

Die folgenden monoklonalen, primären Antikörper wurden für die Inkubation in 1%-iger Blotto/PBS-Suspension verdünnt und in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt:

p53	(0,2-1µg/ml,	Maus IgG _{2b} ,	Klon PAB122,)
Bcl-2	(1 µg/ml,	Maus IgG ₁ ,	Klon C-2)
Bcl-X _L	(1 µg/ml,	Maus IgG _{2a} ,	Klon 2H12)
Bax	(1 µg/ml,	Maus IgG ₁ ,	Klon 6A7)
p21	(1 µg/ml,	Maus IgG _{2b} ,	Klon F-5)
MDM2	(1 µg/ml,	Maus IgG ₁ ,	Klon SMP14)

Die Inkubationen wurden unter konstantem, leichtem Schütteln jeweils über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Nicht- oder unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden anschließend durch Waschen der Membranen unter konstantem Schütteln bei mehrfachem Pufferwechsel 1-6 h lang in PBS entfernt.

10.6.3 Detektion

Der Nachweis eines unmarkierten primären Antikörpers mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper dient der Erhöhung der Sensitivität der Methode. Die polyklonalen, sekundären Antikörper erkennen verschiedene antigene Determinanten der leichten und/oder schweren Kette des Immunglobulins, so daß pro primärem Antikörpermolekül mehrere sekundäre Antikörper mit daran gekoppeltem Enzym gebunden werden können. Der Substratumsatz in der Detektionsreaktion wird dadurch deutlich gesteigert. Der sekundäre Antikörper (polyklonaler anti-Maus IgG aus Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), Santa Cruz) wurde in 1%-iger Blotto/PBS-Suspension verdünnt (1 µg/ml), und die Inkubation unter stetem Schütteln bei Raumtemperatur 1 h durchgeführt. Er konnte zum Nachweis aller verwendeten primären IgG-Antikörper eingesetzt werden. Ungebundener oder unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch Waschen der Membranen mit PBS unter mehrfachem Pufferwechsel 1 h bei Raumtemperatur entfernt.

Die aus dem Meerrettich gewonnene Peroxidase enthält als Wirkgruppe ein Fe³⁺-Protoporphyrin. Sie katalysiert mit Wasserstoffperoxid als Co-Substrat Oxidationen. Bei den gewöhnlichen Chemilumineszenznachweisreaktionen katalysiert das Enzym im Alkalischen die Entstehung eines instabilen zyklischen Peroxids aus Luminol (3-Aminophthalhydrazid). Unter Ringaufspaltung zerfällt das Peroxid in die entsprechende Dicarbonylverbindung, dem 3-Aminophthalat-Dianion. Dabei wird Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert. Verstärkung und Verlängerung der Lichtemission wird durch den Einfluß von Substanzen, wie z.B. para-substituierten Phenolen auf die Reaktion erreicht (Roswell und White 1978, Thorpe und Kricka 1986). Bei dem verwendeten Substrat Lumi-Light^{PLUS} wird ein Licht der Wellenlänge 425 nm ausgesendet, welches zur Belichtung gewöhnlicher Röntgenfilme geeignet ist. Die Detektionsgrenze des Nachweises wird mit 1-5 pg Antigen angegeben. Licht wird über einen Zeitraum von bis zu neun Stunden emittiert, wodurch mehrere Expositionen durchgeführt werden konnten. Die Detektion mittels Lumi-Light^{Plus} wurde entsprechend den Hersteller-Empfehlungen durchgeführt. Verstärker- und Peroxidlösung wurden 1:1 gemischt, die Membran damit vollkommen bedeckt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien plaziert (Luftblasen und überschüssige Detektorflüssigkeit entfernt) und in einer Röntgenkassette fixiert. Nach Röntgenfilm-Exposition (1-3 min, Biomax MR-1) wurde automatisch entwickelt (Agfa SCOPIX LR 5200).

11. Semiquantitative Analyse zur mRNA-Expression von CD95/CD95L und TNF-RI/TNFα

Zur Untersuchung des Einflusses der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie auf die Transkription bzw. auf die Menge vorhandenen Transkriptes der Gene CD95, CD95L, TNF-RI und TNFα wurde eine semiquantitative RT-PCR mit dem Haushaltsgen β-Aktin als Vergleichsstandard durchgeführt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die spezifische, nahezu exponentielle Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit Hilfe zweier kurzer Oligonukleotide („Primer“), welche dieses Fragment flankieren und mit jeweils einem der beiden DNA-Stränge der Doppelhelix hybridisieren. Dabei sind diese Oligo-

nukleotide so orientiert, daß die DNA-Synthese in die von den Oligonukleotiden begrenzte Region hinein gerichtet ist. Die neu synthetisierte DNA steht in dem nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize zur Verfügung, so daß die Kopienzahl des betreffenden DNA-Fragments mit jedem Zyklus, bestehend aus den Schritten Primer-Hybridisierung, DNA-Synthese und Denaturierung der DNA, (nahezu) verdoppelt wird (Saiki et al. 1985, 1988, Mullis et al. 1986). Die RNA-(RT-)PCR dient allgemein der Untersuchung der Genexpression auf RNA-Niveau (Brenner et al. 1989). Bevor allerdings die RNA mittels PCR amplifiziert werden kann, muß sie zunächst in komplementäre DNA („cDNA“) durch eine Reverse Transkriptionsreaktion (RT) umgeschrieben werden.

11.1 RNA-Isolierung

Die Zellen (9L, 9L-*tk*) wurden wie in Kap. 2.2 beschrieben in Doppelansätzen in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und mit GCV behandelt bzw. unbehandelt gelassen. An den Tagen 1, 2 und 3 wurde RNA mittels RNAzolTM gemäß den Herstellerempfehlungen isoliert. Nach der Inkubationszeit (Kap. 2.2) wurden die Zellen mit 0,2 ml RNAzolTM/10⁶ Zellen lysiert und die Löslichkeit der RNA durch Einwirken von Scherkräften erhöht. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform/2 ml Homogenat wurden die Proben 15 s kräftig geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 12000-g) bilden sich zwei Phasen aus: die obere, wäßrige Phase mit der enthaltenen RNA sowie die untere, organische Phase. DNA und Proteine finden sich in der organischen sowie der Interphase, so daß durch Isopropanol-Präzipitation die RNA aus der wäßrigen Phase aufgereinigt werden kann (Sambrook et al. 1989). Die erhaltene Ausbeute und Nukleinsäurekonzentration wurde mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt.

11.2 cDNA-Synthese

5 µg RNA wurde jeweils zur cDNA-Synthese eingesetzt. Verbliebene mögliche DNA-Verunreinigungen wurden durch Inkubation mit RNase-freier DNase I (1 h, 1 u DNase/1 µg RNA, in 1x PCR-Puffer bei 37°C) abgebaut. Die DNase wurde anschließend thermisch inaktiviert (5 min bei 75°C).

Die RNA wurde zusammen mit 20 pmol Oligo-dT₁₆-Primer denaturiert und anschließend durch Zugabe von Superscript-Reverser Transkriptase bei 45°C 1 h revers transkribiert. Als Negativkontrollen wurden in der nachfolgenden PCR auch RNA-Proben ohne vorherige cDNA-Synthese (Test auf DNA-Kontamination) sowie ein cDNA-Synthese-Ansatz ohne Zugabe von RNA (Test auf Kontamination der cDNA-Synthesereagenzien) amplifiziert.

11.3 Semiquantitative PCR

Jeweils 1/15 Volumen des cDNA-Ansatzes wurde zur PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktionsgemische setzten sich folgendermaßen zusammen:

Reagenzien	CD95	CD95-L	TNF-RI	TNFα	β-Aktin
cDNA	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
Primer (10µM, jeder)	CD95-s	CD95-L-s	TNF-RI-s	TNFα-s	β-Aktin-s
	CD95-as	CD95-L-as	TNF-RI-as	TNFα-as	β-Aktin-as
KCl	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Tris-HCl (pH 8,3)	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM	2 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP	200 µM	300 µM	200 µM	200 µM	200 µM
H ₂ O _{dd}	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl
Taq-Polymerase	2,5 u	2,5 u	2,5 u	2,5 u	2,5 u

(Primer-Sequenzen, Kap. 10.5. dNTP: jedes Nukleotid (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 20mM in autoklaviertem, doppelt destilliertem Wasser.)

Die folgenden Programme wurden zur Amplifizierung verwendet. Initial wurde das PCR-Gemisch ohne Taq-Polymerase 3 min auf 95°C zur Denaturierung der cDNA und der Primer erhitzt. Nach Abkühlung auf die Primer-Hybridisierungstemperatur wurden 2,5 Einheiten Taq-Polymerase je Ansatz zupipettiert. Nach einer ersten Extension bei 72°C für 1 min setzten die aufgeführten Programme ein:

Programmschritt	CD95			CD95-L			β-Aktin		
	Temp.	Dauer	Schleife	Temp.	Dauer	Schleife	Temp.	Dauer	Schleife
0	95°C	80 s		95°C	80 s		95°C	80 s	
1	67°C	40 s		59°C	40 s		60°C	20 s	
2	72°C	20 s	an 0, x 33	72°C	20 s	an 0, x 38	72°C	20 s	an 0, x 28

Programmschritt	TNF-RI			TNFα		
	Temp.	Dauer	Schleife	Temp.	Dauer	Schleife
0	95°C	60 s		95°C	60 s	
1	66°C	30 s		60°C	40 s	
2	72°C	30 s	an 0, x 33	72°C	30 s	an 0, x 33

Die letzte Extensionsphase wurde auf 5 min verlängert. Als Kontrolle auf Kontamination der PCR-Reagenzien wurden bei jeder Amplifizierung Kontrollreaktionen ohne Zugabe von cDNA mitgeführt. Als Positivkontrolle sowie zur semiquantitativen Beurteilung des Amplifizierungsergebnisses diente die Amplifizierung des „House-keeping“-Gens β-Aktin (weitere Kontrollreaktionen, Kap. 10.2).

11.4 Gelelektrophorese

Mittels Standard-Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) wurden die amplifizierten DNA-Fragmente aufgetrennt und analysiert. Dazu wurden 8 µl jedes PCR-Ansatzes vermischt mit DNA-Ladepuffer (50% (vol/vol) Glycerin, 0,2% SDS, 0,05% Bromphenolblau in TBE) auf 1%-ige Agarosegele (in TBE) aufgetragen und 1 h bei 6 V/cm mit TBE (0,1 M Tris-Base, 85 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3) als Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine 100 Basen-Paar-Leiter verwendet.

11.5 Sequenzen der verwendeten Primer-Oligonukleotide

Amplifizierte Sequenz	Richtung	Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße
β-Actin	sense	CATGCCATCCTGCGTCTGGAC	500 bp
	anti-sense	CACAGAGTACTTGCGCTCAGGAGG	
CD95	sense	TGCTCGGCAGCACAAAGTCCCGGAAAGCA	306 bp
	anti-sense	CAGGCTCTCTCCTCTCTTCGTGGCTGGAAC	
CD95-L	sense	ACATATGGAAGTCTTTGATCTCTGGAGT	285 bp
	anti-sense	GACATATAAATGGTCAGCAACGGTAAG	
TNF-RI	sense	GCGATGCTGTATGCTGTGGTGGATGG	300 bp
	anti-sense	GCCTTATCGCGGGAGGTGGGTCGT	
TNFα	sense	AGTTCATGGCCCAGACCCTCACACTC	521 bp
	anti-sense	GAGAACGGATGAACACGCCAGTCGCCT	

(„sense“, „antisense“: Bezeichnung der DNA-Syntheserichtung. Bei Verlängerung eines Sense-Oligonukleotids entsteht eine Kopie des codierenden Sense-Strangs der DNA. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech synthetisiert.)

12. Untersuchung der TNF α -Sekretion mittels ultrasensitivem ELISA

Mittels eines ultrasensitiven ELISA („enzyme-linked-immunosorbent-assay“-Tests (Engvall und Perlmann 1971) wurde die Sekretion von TNF α ins Medium bei 9L- und 9L-*tk*-Zellen nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie untersucht. Dazu wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen im Abstand von 24 h beginnend nach Aussaat und Behandlung (10 μ g/ml GCV bzw. unbehandelt) 1 ml Aliquots aus dem Überstand der Zellkulturen ($4 \cdot 10^5$ Zellen/5ml Medium in 6-Well-Platten) entnommen und nach Zentrifugation der zellfreie Überstand bei -70°C bis zur späteren Messung aller gesammelten Proben gelagert. Die Zellproben wurden nach Entnahme der Überstand-Aliquots (wie in Kap.3 beschrieben) gezählt, um die mittels ELISA-gemesene TNF α -Produktion auf die jeweilige Zellzahl beziehen zu können. Die Durchführung des ELISAs erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Laboserv). Antikörper spezifisch für Ratten-TNF α sind gebunden an den Boden einer 96-Well-Platte. Während der Inkubation dieser Platte mit den gewonnenen Überstand-Aliquots wird TNF α , sofern vorhanden, von diesen Antikörpern gebunden und immobilisiert. TNF α wird dann in einer zweiten Inkubation mit einem biotinylierten anti-Ratten-TNF α -Antikörper von diesem spezifisch gebunden und kann mittels Streptavidin-konjugierter Peroxidase und entsprechendem Enzymsubstrat (Tetramethylbenzidin) detektiert werden. Die Umsetzung des Enzymsubstrats führt zur Produktion eines Farbstoffes, der colorimetrisch gemessen werden kann. Die Intensität der Farbreaktion ist dann proportional zur Menge des gebundenen TNF α s. Dieser Test wurde in zwei voneinander unabhängigen Testreihen durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Transfektion und Selektion von Zellklonen mit stabiler Transgenexpression

Die nicht transduzierten Ausgangszelllinien U87 und 9L besitzen gegenüber GCV (IC_{50} 25-50 $\mu\text{g/ml}$) bzw. 5-FC (IC_{50} 300-600 $\mu\text{g/ml}$) ähnliche Sensitivitäten (Tab. 5). Nach dem Transfer der Suizidgene und der anschließenden Selektion von Einzelzellklonen zeigten die transduzierten Zelllinien (U87-*tk*, U87-*cd*, 9L-*tk* und 9L-*cd*) eine gesteigerte Sensitivität gegenüber den zugehörigen Suizidenzym-Substraten, nicht jedoch gegenüber irrelevanten Prodrugs. So beträgt die IC_{50} von GCV nach Transfer des HSV-*tk*-Gens in U87 6 ng/ml, ist also um den Faktor 5000 reduziert. Bei der 9L-*tk*-Linie ist die IC_{50} für GCV 50 ng/ml (Faktor 600). Die mit dem E.coli-*cd*-Gen transduzierten Zelllinien U87-*cd* und 9L-*cd* sind um den Faktor 100 bzw. 500 sensitiver gegenüber 5-FC als die Ausgangszelllinien. Nach Suizidgentransfer ist also die Sensitivität der Zellen gegenüber den relevanten Prodrugs signifikant erhöht. Die transduzierten Zellen zeigten spezifische Sensitivitätsveränderungen, keine allgemein gesteigerte Empfindlichkeit, wie durch die innerhalb der verschiedenen transduzierten und nicht transduzierten Zelllinien gleichbleibende Actinomycin D-Zytotoxizität belegt wird.

Die Sensitivität der transduzierten Zelllinien gegenüber der jeweiligen Prodrug wurde nach vorhergehender 10-tägiger Antibiotikaselektion (Kap. II. B 1.2) getestet. Sie erwies sich als stabil über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr (spätere Zeitpunkte nicht getestet). Den im Folgenden dargestellten Ergebnissen liegen Zellproben zu Grunde, die im Abstand von 6-8 Wochen regelmäßig selektioniert wurden.

Zelllinie	IC_{50}			Sensitivitätsfaktor
	[GCV]	[5-FC]	[Actinomycin D]	
U87	30 $\mu\text{g/ml}$	600 $\mu\text{g/ml}$	0,001 $\mu\text{g/ml}$	
U87- <i>tk</i>	6 ng/ml	500 $\mu\text{g/ml}$	0,001 $\mu\text{g/ml}$	5000 x
U87- <i>cd</i>	25 $\mu\text{g/ml}$	6 $\mu\text{g/ml}$	0,001 $\mu\text{g/ml}$	100 x
9L	30 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	0,01 $\mu\text{g/ml}$	
9L- <i>tk</i>	0,05 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$	0,01 $\mu\text{g/ml}$	600 x
9L- <i>cd</i>	50 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,01 $\mu\text{g/ml}$	500 x

Tab. 5: Auswirkung des Suizidgentransfers auf die Sensitivität der Zellen gegenüber den Prodrugs GCV und 5-FC. Die IC_{50} gibt diejenige Konzentration von GCV, 5-FC bzw. Actinomycin D an, die zum Absterben von 50% der Zellen führt. Als „Sensitivitätsfaktor“ wird derjenige Faktor bezeichnet, um den die wirksame Prodrug-Konzentration (IC_{50}) der transduzierten Zelllinien gegenüber der nicht transduzierten erniedrigt ist. Zur Ermittlung dieser Werte wurden jeweils 10^5 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen der Prodrugs bzw. Actinomycin D versetzt. Nach vier Tagen wurde die Zellzahl mittels Z1-Coulter Counter bestimmt. Alle Werte wurden in Form von Triplikaten sowie in zwei voneinander unabhängigen Tests ermittelt.

2. Untersuchung der Zellmorphologie nach Zelltodinduktion

Mit Apoptose klassischerweise assoziierte morphologische Merkmale sind eine Abrundung der Zelle einhergehend mit Adhäsionsverlust, das Auftreten von charakteristischen Membranausstülpungen, die Kontraktion des Cytoplasmas, die Kondensation des Chromatins mit anschließender Auflösung des Nukleus kulminierend in der Auflösung der gesamten Zelle in Vesikel (Kerr et al. 1972, Wyllie 1980). Im Gegensatz dazu zeigen nekrotische Zellen typischerweise keines dieser Merkmale, sondern zeichnen sich durch Zellschwellung mit konsekutiver Zerstörung von zellulären Membransystemen und Organellen aus.

Nach Actinomycin D-Behandlung (1-2 $\mu\text{g/ml}$ 24 h), Behandlung mit HSV-*tk*/GCV bzw. E.coli-*cd*/5-FC oder Inkubation mit 5-10% (vol/vol, 1 h) Ethanol als Mediumzusatz zeigten alle untersuchten Zelllinien morphologische Merkmale, welche typisch für apoptotisches Zellsterben sind. Dies galt auch bei Behandlung der Zelllinien mit Doxorubicin, Vincristin und Etoposid (Kap. II. B 2.2). In Phasenkontrastaufnahmen liessen sich Membranausstülpungen und Vesikelabschnürungen, sowie zunehmende Auflösung der Zelle

beobachten (Abb. 5). Kondensation des Chromatins und Auflösung des Nukleus liessen sich nach Propidiumiodidfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigen (Abb. 6). Ausmaß und Ausprägung dieser Merkmale variierten von Zelle zu Zelle und traten auch zeitlich nicht synchron innerhalb einer gegebenen Zellpopulation auf. Früh zu beobachten war eine Abrundung der Zellen und der Verlust der Adhäsion an den Untergrund. Die Plasmamembran bekam ungleichmäßige Ausbuchtungen, Vesikel schnürten sich an der Oberfläche ab, das Cytoplasma kondensierte. Das Ausmaß der Vesikelausstülpungen nahm im weiteren zeitlichen Verlauf zu, wobei sich symmetrische Abknospung kleinerer Vesikel, aber auch ungleichmäßige Abschnürungen von großen Zellanteilen zeigten. Im allgemeinen war die Kondensation des Chromatins der behandelten Zellen früher zu beobachten als die Fragmentierung des Nukleus. Verglichen mit den anderen morphologischen Veränderungen waren die des Kerns eher spät auftretende apoptotische Merkmale. Die beschriebenen morphologischen Veränderungen waren bei unbehandelten Zellen oder bei Zellen, welche mit irrelevanten Prodrugs behandelt wurden, in keinem signifikanten Maße festzustellen. Nach Induktion von nekrotischem Zelltod durch Behandlung mit 20% (vol/vol) Ethanol zeigten sich die beschriebenen morphologischen Veränderungen nicht.

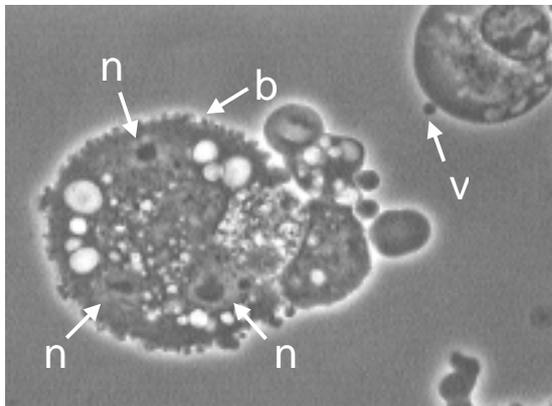


Abb. 5: Morphologische Veränderungen der Zellen nach gentherapeutischer Behandlung. Durchlichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme von GCV-behandelten 9L-tk-Zellen (48 h, 10 µg/ml) (400x Vergrößerung). Es zeigen sich Apoptose-typische zelluläre Veränderungen: Im Zentrum der Aufnahme ist eine fast vollständig in Vesikel aufgelöste Zelle zu sehen. Links davon ist eine abgerundete Zelle mit Membranausstülpungen und einer Fragmentierung des Kerns zu erkennen. (v = Vesikel, b = Membranausstülpungen, n = Nukleusfragment).

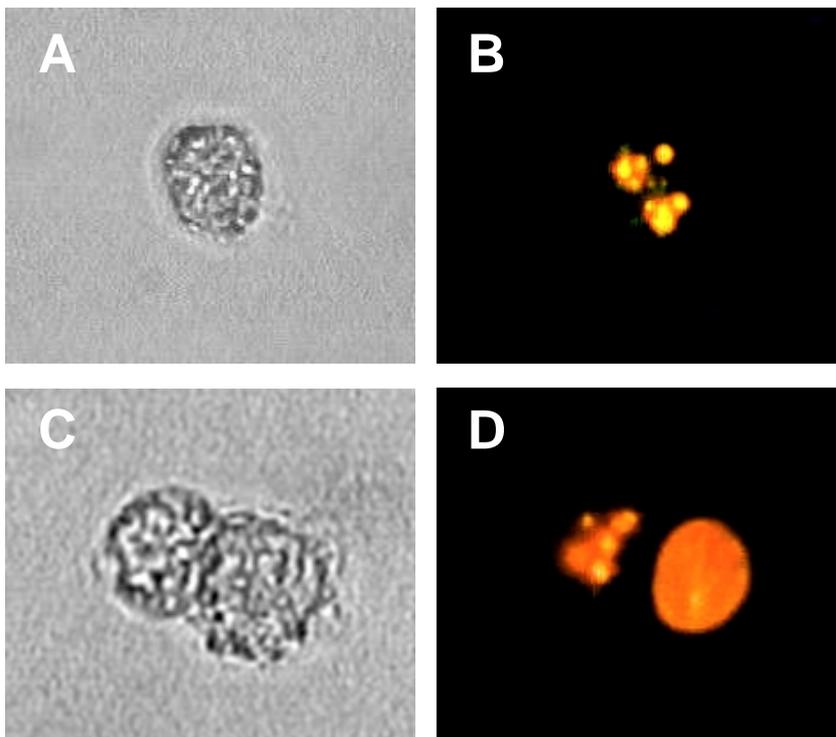


Abb. 6: Apoptotische Veränderungen des Zellkerns nach Gentherapie. (A, C) Durchlichtaufnahmen, (B, D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen derselben Zellen (U87-cd (A, B), U87-tk (C, D), 400x). U87-cd-Zellen wurden 72 h mit 100 µg/ml 5-FC behandelt, U87-tk-Zellen 72 h mit 10 µg/ml GCV. Propidiumiodid-Färbung der DNA nach Ethanol-Fixierung und RNase-Verdau zeigt die Auflösung der Nuklei in kleinere Fragmente. In C, D zum Vergleich eine Zelle mit noch unveränderter Kernmorphologie.

3. Durchflußzytometrische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Mittels durchflußzytometrischer Methodik und Immunfluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob Apoptose-assoziierte Parameter unter Gentherapie oder Behandlung mit Actinomycin D auftreten. Dabei wurde versucht, beteiligte Signaltransduktionswege zu identifizieren. Die untersuchten Parameter wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ wie folgt erfaßt:

Zelllinien:	FACS-Messungen:					
	1	2	3	4	5	6
9L/9L- <i>cd</i> *	AnnexinV-FITC/PI	DiOC ₆ (3)/PI	Mitosensor	PI (DNA)	CD95/CD95L	TNF-RI/TNF α
9L/9L- <i>tk</i> *						
U87/U87- <i>cd</i> *						
U87/U87- <i>tk</i> *						
Parameter:	PS-Exposition	MTP- $(\Delta\Psi_m)$ Reduktion	MTP- $(\Delta\Psi_m)$ Reduktion	Zellzyklus Sub-G ₁ -DNA (Karyorrhexis/Pyknosis)	Rezeptor-/Ligand-expression	Rezeptor-/Ligand-expression

Tab. 6: Durchgeführte durchflußzytometrische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Apoptose-assoziierten Parametern. Während der Gentherapie und der Behandlung der Zellen mit Actinomycin D (24 h, 0,001-4 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen mittels der FACS-Messungen 1-6 (z.B. 1 = Annexin V-FITC/PI) auf die entsprechenden Apoptose-Parameter (1 = PS-Exposition) hin untersucht. Jeder Parameter wurde in zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen und jeweils in Duplikaten gemessen (Kap. II. B 2.2).

*, „9L/9L-*cd*“: In der jeweiligen Versuchsreihe wurde sowohl die Ausgangszelllinie (hier: 9L) als auch die jeweils abgeleitete, transduzierte Zelllinie (hier: 9L-*cd*) unbehandelt (nach 72 h), sowie unter Prodrug-Behandlung (100-3000 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC bzw. 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ GCV nach 24 h, 48 h und 72 h) untersucht (Kap. II. B 2.2).

„PS-Exposition“: Phosphatidylserin-Exposition

„MTP ($\Delta\Psi_m$)-Reduktion“: Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP)

(Karyorrhexis/Pyknosis): Kondensation bzw. Fragmentierung der Nuclei. Diese Parameter wurden parallel zur FACS-Analyse des Zellzyklus und des Anteils von Zellen mit Sub-G₁-DNA-Gehalt mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 6).

3.1 Analyse der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichtes

Apoptose wurde zunächst als „Shrinkage Necrosis“ (Schrumpfnekrose) bezeichnet (Kerr 1971), da sich im Vergleich zur typischen Nekrose mit Zellschwellung und Berstung apoptotische Zellen abrunden, verkleinern und an Granularität zunehmen. Mittels durchflußzytometrischer Analyse von Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht lassen sich morphologische Parameter wie Zellgröße und Granularität untersuchen. Die Intensität der Lichtstreuung ist proportional zum Zellvolumen (Mullaney et al. 1969). Dementsprechend geht bei apoptotischen Zellen die Vorwärtsstreuung (FSC) des Laserlichtes zurück, und die Streuung im Seitwärtsscatter (SSC) nimmt aufgrund der gesteigerten Granularität der Zellen zu.

Außer apoptotischen Zellen weisen auch Zellen mit geschädigten Membranen eine geringere Intensität in der Vorwärtsstreuung und außerdem einen Rückgang der Seitwärtsstreuung (Loken und Herzenberg 1975, Loken et al. 1979) auf. Dies beruht auf dem Unterschied im Refraktionsindex der Zellen im Vergleich zum Medium: Dieser ist bei beschädigten Zellen geringer als bei unbeschädigten. Durch Analyse von Proben, welche parallel mit Propidiumiodid (PI) gefärbt wurden, lassen sich solche Zellen aus der Analyse ausschließen (Abb. 7 „9L-*tk* (B)“). PI wird nur von Zellen mit geschädigten Membranen aufgenommen. Hierbei bleibt zu bedenken, daß auch spät-apoptotische Zellen PI-positiv sind und somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Im Verlauf der gentherapeutischen sowie der Behandlung mit Actinomycin D kam es zu einem Rückgang in der Intensität der Vorwärtsstreuung bei gleichzeitiger Zunahme der Seitwärtsstreuung (Abb. 7). Diese Veränderung der Lichtstreuung wurde nicht bei unbehandelten oder bei Zellen entdeckt, welche mit irrelevanten Prodrugs behandelt wurden. Auch die genetisch nicht veränderten Ausgangszelllinien zeigten keine Änderung des FSC/SSCs nach Behandlung mit Prodrugs in Standardkonzentrationen. Wurde die GCV-

Konzentration um den Faktor 100 erhöht (auf 1000 µg/ml), so zeigten nach 48 h Inkubation jedoch auch die parentalen Zelllinien 9L und U87 Apoptose-typische Veränderungen der Lichtstreuung. Bei einer Behandlung mit 30-fach höheren 5-FC-Dosen (3 mg/ml) zeigten 9L-Zellen nach 48 h ebenfalls eine solche Veränderung, U87-Zellen jedoch nicht. Diese geringere Sensitivität der U87-Zellen gegenüber 5-FC unter den Versuchsbedingungen zeigte sich auch in den weiteren Analysen (Kap. 3.2-3.3). Höhere Konzentrationen von 5-FC wurden aufgrund der limitierenden Löslichkeit von 5-FC in wässriger Lösung (15 mg/ml maximal) nicht untersucht. In Analysen nach längerer Inkubation (72 h - 96 h), mit gleichbleibend erhöhter 5-FC-Konzentration (3 mg/ml) zeigten auch U87 Apoptose-typische Veränderungen im FSC/SSC. Bei den zum Vergleich getesteten Chemotherapeutika induzierte Doxorubicin (20 µg/ml) nach 24 h eine FSC/SSC-Veränderung ähnlich wie Actinomycin D. Vincristin (0,1 µg/ml) und Etoposid (1 µg/ml) bewirkten in den gewählten Konzentrationen nach 24 h keine deutliche Änderung des FSC. Lediglich die Granularität nahm leicht zu, obwohl ein zytotoxischer-Effekt (15-33% PI-positive Zellen) beobachtet wurde. Nach weiteren 24 h zeigten aber auch Etoposid- bzw. Vincristin-behandelte Zellen eine deutliche SSC-Zunahme und eine FSC-Abnahme. Diese Ergebnisse waren für U87- und 9L-Zellen ähnlich.

Gentherapie sowie Behandlung mit den ausgewählten Chemotherapeutika lösen demnach Apoptose-typische Veränderungen im Lichtstreuungsverhalten der Zellen aus. Nach Induktion von nekrotischem Zelltod (Behandlung mit 20% Ethanol) zeigten sich die beschriebenen Lichtstreuungsveränderungen nicht.

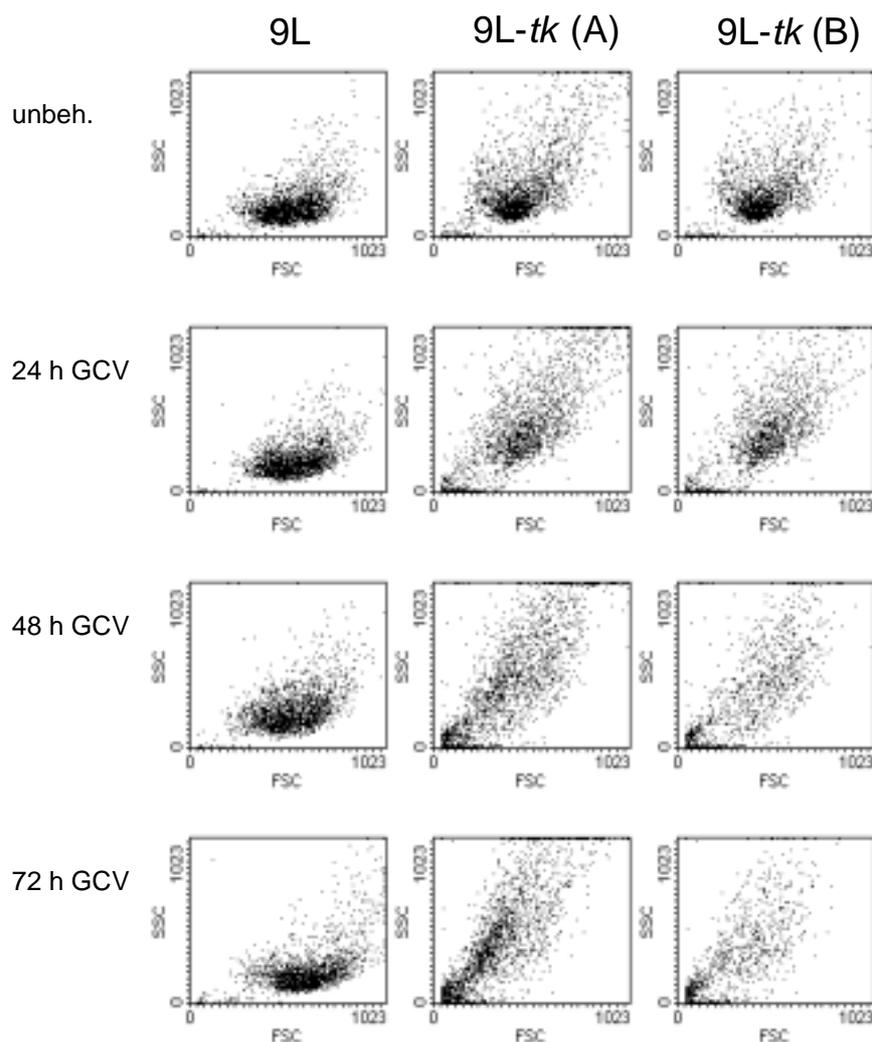


Abb. 7: Veränderung der Lichtstreuung im Verlauf der HSV-tk/GCV-Gentherapie. Die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (FSC/SSC) von unbehandelten und mit GCV-behandelten 9L- und 9L-tk-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, um eine Ausgrenzung von nicht vitalen (PI-positiven) Zellen zu ermöglichen. „9L“ und „9L-tk (A)“ zeigen die gesamte Zellpopulation. „9L-tk (B)“ zeigt die vitale Zellpopulation nach Ausgrenzung von PI-positiven (toten) Zellen. Im Verlauf der Behandlung nimmt bei 9L-tk-Zellen zunächst die Granularität zu (SSC erhöht), nach 48-72 h nimmt die Zellgröße (FSC erniedrigt) im Durchschnitt ab. Die Population der Zellen mit geringerer Größe enthält einen großen Anteil PI-positiver, toter Zellen.

3.2 Analyse der Phosphatidylserinexposition

Ein sehr früh nachzuweisendes Apoptose-Merkmal ist der Verlust der asymmetrischen Verteilung von Phosphatidylserin (PS) in der Plasmamembran der Zelle. Normalerweise befindet sich PS fast ausschließlich in der dem Cytoplasma zugewandten Phospholipidschicht und nicht auf der Außenseite der Zelle. Diese Asymmetrie wird unter Energieaufwand aufrechterhalten, die beteiligten Mechanismen sind noch nicht abschließend geklärt. Der durchflußzytometrische Nachweis von PS auf der Zelloberfläche mittels Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem AnnexinV hat sich in den letzten Jahren zu einem der gebräuchlichsten Apoptosenachweisverfahren entwickelt. Die überwiegende Zahl der Untersuchungen wurde bisher jedoch an Zellen der hämatopoetischen Linien durchgeführt. Wie in folgender Abbildung zu sehen ist, zeigte die verwendete Positivkontrolle (Jurkat-T-Zellen nach Apoptoseinduktion durch Actinomycin D (ActoD)) eine deutliche AnnexinV-Bindung:

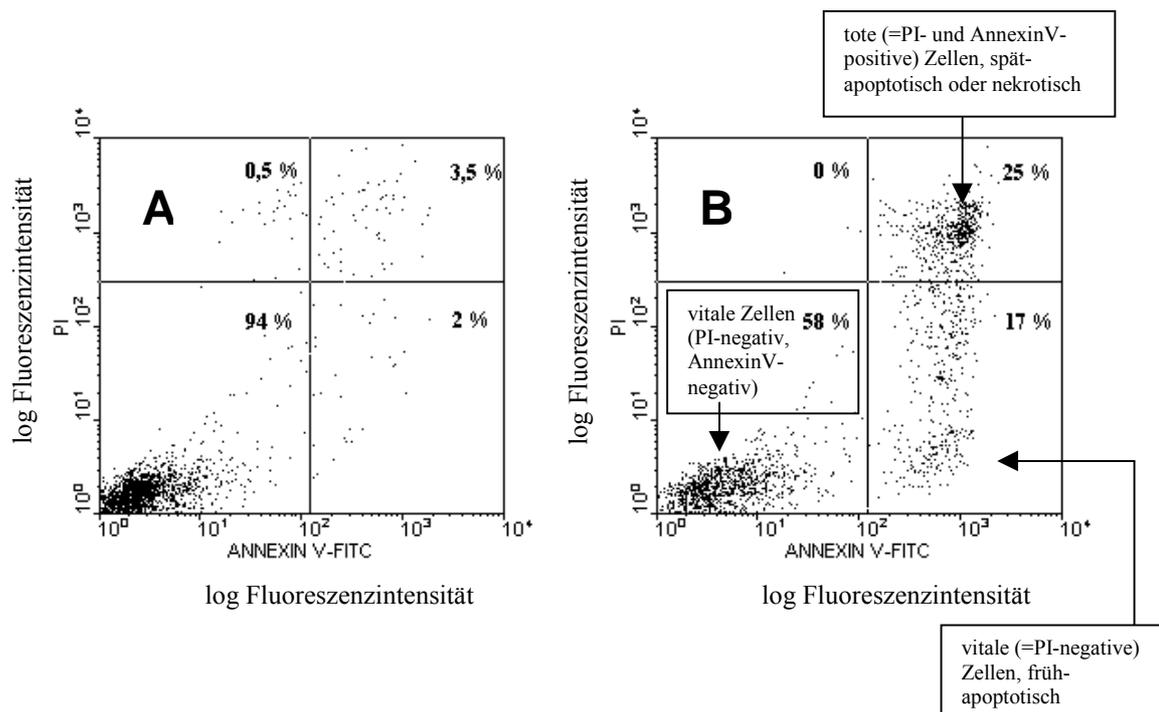


Abb. 8: 24 h-Inkubation mit 2 µg/ml ActoD induzierte bei Jurkat-T-Zellen eine Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche. In der durchflußzytometrischen Analyse zeigten Jurkat T-Zellen nach ActoD-Behandlung (B) im Vergleich zu unbehandelten Jurkat-T-Zellen (A) etwa 15% mehr vitale (PI-negativ) Zellen, die FITC-konjugiertes AnnexinV binden (FITC, Abk. Fluorescein-Isothiocyanat). AnnexinV weist eine hohe Affinität zu PS auf. PS ist normalerweise sequestriert, befindet sich asymmetrisch verteilt hauptsächlich in der dem Cytoplasma zugewandten Membranschicht und ist damit für Zelloberflächenfärbungen nicht zugänglich. Im Verlauf der Apoptose verliert sich diese Asymmetrie. Die vitalen, AnnexinV-bindenden Zellen sind früh-apoptotische Zellen. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen verlieren die Integrität ihrer Plasmamembran. Da das fluoreszierende AnnexinV-FITC dann in die Zellen eindringen kann, ist eine Unterscheidung zwischen exponiertem und cytoplasmatisch orientiertem PS nicht mehr möglich. Sämtliche PI-positiven Zellen binden in diesem Fall auch AnnexinV. Spät-apoptotische Zellen sind daher hier durchflußzytometrisch nicht von nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Im Folgenden wurde die Exposition von PS als Apoptosemarker bei Gliomzelllinien nach Behandlung mit Apoptose-auslösendem ActoD sowie den beiden Genterapiesystemen untersucht.

Zur Untersuchung der PS-Exposition nach ActoD-Behandlung wurden die Gliomzelllinien 9L und U87, sowie die davon abgeleiteten stabil transduzierten Zelllinien mit steigenden ActoD-Konzentrationen (0,001-2 µg/ml) 24 h-lang behandelt und die PS-Umverteilung durchflußzytometrisch bestimmt (Kap. II. B 4.3).

Alle untersuchten Zelllinien reagierten auf ActoD-Behandlung (ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml) mit der Exposition von PS (Abb. 17 C, D; Tab. 7). Mit steigender Dosierung wurde auch der Anteil PS-exponierender Zellen in der Population größer. Die ActoD-Sensitivität der transduzierten und der entsprechenden nicht transduzierten Zellen unterschied sich dabei nicht signifikant. Unterschiede zeigten sich jedoch zwischen U87- und 9L-Zelllinien. Mit sinkender Vitalität zeigte sich sowohl bei U87- als auch bei 9L-Zelllinien ein Anstieg der PS-Exposition. U87-Zelllinien waren jedoch um den Faktor 10 (IC_{50}) sensitiver gegenüber der ActoD-Behandlung (Tab. 5) und wiesen einen größeren Anteil an PS-positiven Zellen auf: Während 9L-Zelllinien bei einer zytotoxischen ActoD-Dosierung zwischen 38 und 48% PS-positive Zellen zeigten, lag der Anteil dieser Zellen bei den U87-Zelllinien unter vergleichbarer ActoD-Dosierung bei 60-90% der Zellen.

Wie diese Experimente zeigten, reagierten die hier untersuchten Gliomzelllinien ähnlich wie Jurkat T-Zellen auf einen apoptotischen Stimulus mit der Umverteilung von PS. Diese Methode ist also prinzipiell als Apoptosenachweis für die hier verwendeten Gliomzelllinien anwendbar. Bei beiden Zelllinien kam es sowohl unter HSV-*tk*/GCV- als auch unter E.coli-*cd/5*-FC-Gentherapie zu einer PS-Exposition (Abb. 18, Tab. 8). In Abb. 9 (A, B) ist eine 9L-*tk*-Zelle nach 3-tägiger Behandlung mit GCV (10 µg/ml) und Färbung mit AnnexinV-FITC/PI dargestellt. In der Durchlichtaufnahme zeigt sich das typische Bild einer apoptotischen Zelle mit abgerundetem Zellkörper, kontrahiertem Cytoplasma und beginnender Ausstülpung von Vesikeln. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zeigt diese Zelle eine deutliche, grüne Fluoreszenz auf ihrer Oberfläche als Nachweis der PS-Umverteilung. Die Cytoplasmamembran ist noch unbeschädigt, da PI nicht in das Zellinnere eingedrungen ist. In derselben Abb. (C, D) ist eine spät-apoptotische 9L-*tk*-Zelle mit deutlicher apoptotischer Veränderung der Kernmorphologie zu sehen, welche aufgrund der PI-Durchlässigkeit der Membran im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. In der durchflußzytometrischen Analyse mittels AnnexinV-FITC/PI ist eine solche Zelle nicht von einer nekrotischen Zelle zu unterscheiden, da durchlässige Membranen auch den Influx von AnnexinV-FITC ermöglichen, welches dann intrazellulär PS binden kann.

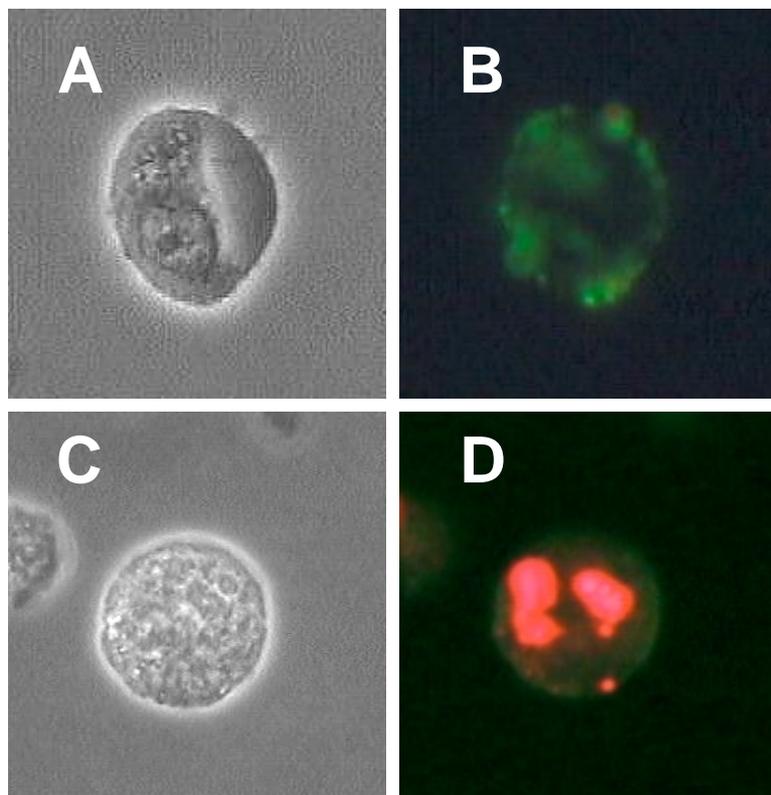


Abb. 9: Exposition von Phosphatidylserin (PS) nach Gentherapie. (A, C) Durchlicht-Aufnahmen, (B, D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen derselben Zellen (9L-*tk*, 400fache Vergrößerung). 9L-*tk*-Zellen wurden 72 h lang mit 10 µg/ml GCV behandelt. Auf der Zelloberfläche exponiertes PS wird durch Färbung mit FITC-konjugiertem AnnexinV (grüne Fluoreszenz) nachgewiesen. Gleichzeitige Färbung mit Propidiumiodid (rote Fluoreszenz) zeigt die Intaktheit der Zellmembran in (B) (früh-apoptotisch). (C, D) zeigen eine spät-apoptotische Zelle mit deutlichen apoptotischen Veränderungen der Kernmorphologie (Karyorrhexis), die aufgrund der PI-Durchlässigkeit der Membran in der

Fluoreszenzaufnahme sichtbar werden. Es ist nicht möglich, solche Zellen mittels AnnexinV-FITC/PI-Durchflußzytometrie von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, da die durchlässigen Membranen nekrotischer Zellen den passiven Influx von AnnexinV und die intrazelluläre Bindung ermöglichen. Aufgrund der höheren Fluoreszenzintensität von PI wurde in (D) eine kürzere Belichtung gewählt, wodurch die grüne AnnexinV-FITC-Fluoreszenz hier schwächer als in (B) erscheint.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie ließ sich die PS-Exposition bei den transfizierten Zelllinien (U87-*tk*, U87-*cd*, 9L-*tk*, 9L-*cd*) nach Behandlung mit den korrespondierenden Prodrugs qualitativ bestätigen. Parallel dazu konnte die Morphologie der PS-exponierenden Zellen als Apoptose-typisch beschrieben werden. AnnexinV-FITC-Bindung konnte bei unbehandelten Zellen, bei nicht transduzierten Ausgangszellen oder bei Zellen, die mit irrelevanten Prodrugs behandelt wurden, nicht in einem signifikantem Ausmaß beobachtet werden. Nach Actinomycin D-Behandlung (1-2 µg/ml 24 h) zeigten alle untersuchten Zelllinien PS-Exposition in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse. Dies war ebenso der Fall bei Behandlung mit 5-10% (vol/vol) Ethanol. Bei Erhöhung des Ethanol-Volumenanteils im Medium auf Nekrose-auslösende 20% (vol/vol) war dagegen keine AnnexinV-FITC-Bindung nachzuweisen (auch nicht mittels Durchflußzytometrie).

Im Vergleich zur qualitativen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Durchflußzytometrie eine quantitative Analyse der PS-Exposition der untersuchten Zelllinien.

Abb. 18 (C, D) fasst die Ergebnisse der Untersuchung der PS-Exposition bei den gentherapeutisch behandelten Gliomzelllinien über einen Zeitraum von 3 Tagen (Kap. II. B 2.2) zusammen. Als Standardkonzentrationen der Prodrugs wurden 10 µg/ml GCV und 100 µg/ml 5-FC gewählt. Diese Konzentrationen liegen über der IC₅₀-Konzentration (Tab. 5), die zum Absterben von 50% der entsprechend mit dem HSV-*tk*- bzw. dem E.coli-*cd*-Gen transfizierten Zellen nach einer 4-tägigen Inkubation führt. Die Vitalität der nicht transduzierten Ausgangszellen bleibt dabei unbeeinträchtigt.

Im beobachteten Behandlungszeitraum (3 Tage) ist der Rückgang der Vitalität der transfizierten Zellen außer bei 9L-*tk*-Zellen noch nicht sehr deutlich ausgeprägt, daher wurden diese Zellen über einen längeren Zeitpunkt beobachtet und die zytotoxische Wirkung der jeweiligen Prodrug kontrolliert. Außerdem wurde exemplarisch der Effekt höherer Prodrug-Konzentrationen (bis 1 mg/ml GCV und 3 mg/ml 5-FC) an Tag 2 der Behandlung untersucht (Abb. 19 (C, D), Tab. 9). Da die Pharmakogentherapie jedoch insbesondere auf möglichst geringe Prodrug-Dosierungen hinzielt, um Nebeneffekte für normales Gewebe so gering wie möglich zu halten, sind insbesondere die zellulären Vorgänge unter niedriger Dosierung von Interesse und stellen damit ein realitätsnäheres Modell dar als Hoch-Dosis-Behandlungen.

Die Zelllinien 9L-*tk* und U87-*tk* zeigten unter Standardbedingungen (10 µg/ml GCV) eine deutliche Zunahme an PS-positiven Zellen (Tab. 8). Diese waren bereits an Tag 1 (22% 9L-*tk*, 15% U87-*tk*) darstellbar und nahmen im Verlauf der Behandlung an Zahl zu (Tag 2-3: 36-38% bei 9L-*tk*; 37-42% bei U87-*tk*). Bei unbehandelten Zellen war nur eine unwesentliche PS-Exposition darzustellen (6% 9L-*tk*, 9% U87-*tk*). AnnexinV wurde lediglich von bis zu 5% der mit GCV- oder 5-FC-behandelten nicht transduzierten 9L bzw. bis zu 8% der U87-Zellen gebunden. Dieser Anteil muß als Hintergrund der PS-Exposition gesehen werden. Der Anteil der *cd*-transfizierten Zelllinien 9L-*cd* und U87-*cd*, die nach Behandlung mit 5-FC PS-Exposition zeigten, war wesentlich geringer als bei den *tk*-Zelllinien. Am deutlichsten war diese an Tag 2 zu messen (25% 9L-*cd*, 16% U87-*cd*) und nahm an Tag 3 eher ab statt zu. Unbehandelt oder nach Behandlung mit irrelevanten Prodrugs zeigten die Zellen keine signifikante Fluoreszenzzunahme.

Der Einfluß höherer Prodrug-Konzentrationen auf die PS-Exposition ist exemplarisch für U87 und U87-*tk* in Abb. 10 dargestellt. Die Zellen wurden 48 h mit verschiedenen Prodrug-Konzentrationen (bis zu 1 mg/ml GCV) inkubiert. Zur Identifizierung nicht vitaler Zellen wurde für die durchflußzytometrische Messung mit Propidiumiodid (PI) gegengefärbt. Die nicht transduzierte Zelllinie U87 zeigte selbst bei der höchsten Prodrug-Konzentration von 1 mg/ml eine nur geringe PS-Exposition: 14% der Zellen banden Anne-

xinV, das entsprach 17% der vitalen Zellpopulation. Unter vergleichbaren Bedingungen waren bereits 41% der U87-*tk*-Zellen AnnexinV-positiv, d.h. 55% der vitalen Zellen. Bei der gewöhnlich eingesetzten Standardkonzentration von 10 µg/ml GCV zeigten U87-Zellen keine signifikante PS-Exposition: 2% waren positiv (gegenüber 1% bei unbehandelten Zellen). U87-*tk* zeigten nach Inkubation mit der Standardkonzentration 20% AnnexinV-positive Zellen (24% der vitalen Zellen) verglichen mit 2% bei der unbehandelten Kontrolle. Bei Inkubation mit 100 µg/ml GCV zeigte sich eine leichte Erhöhung der positiven U87-Zellen (6%, d.h. 7% der vitalen Zellen), bei U87-*tk* war keine signifikante Zunahme gegenüber der Inkubation mit 10 µg/ml zu verzeichnen (20% positiv, d.h. 25% der vitalen Zellen). Die verwendete Standardkonzentration von 10 µg/ml GCV zeigte also bereits deutliche Effekte bei transduzierten Zellen, beeinflusste die nicht-transduzierte Zelllinie in Bezug auf den untersuchten Parameter jedoch nicht. Die Wirkung von GCV zeigte sich - wie auch in den Zytotoxizitätsstudien - als Dosis-abhängig: Hohe Konzentrationen führten nicht nur bei stabil transduzierten Zellen zu deutlichen Effekten, sondern begannen auch nicht transduzierte Zellen zu beeinflussen. Diese Ergebnisse wurden durch weitere unabhängige Tests (Tab. 9, Abb. 19 C) bestätigt.

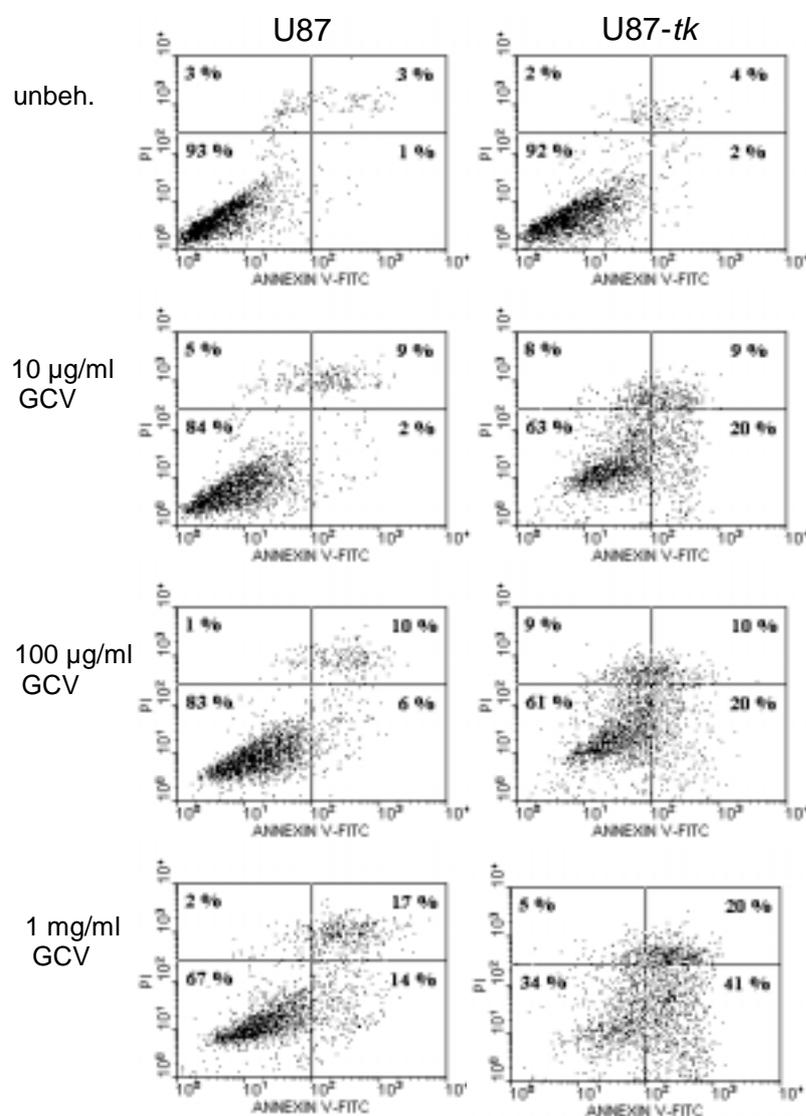


Abb. 10: Vergleich der Induktion von PS-Exposition (AnnexinV-Bindung) durch verschiedene Prodrug-Konzentrationen bei U87 und U87-*tk*-Zellen nach 48 h Inkubation. Zur Identifizierung nicht vitaler Zellen wurde für die FACS-Messung mit Propidiumiodid (PI) gegengefärbt. Die nicht transduzierte Zelllinie U87 zeigt eine geringe PS-Exposition selbst bei der höchsten GCV-Konzentration von 1mg/ml: 14% der Zellen binden AnnexinV, das entspricht 17% der vitalen Zellpopulation. Unter vergleichbaren Bedingungen sind bereits 41% der U87-*tk*-Zellen AnnexinV-positiv, d.h. 55% der vitalen Zellen. Bei der gewöhnlich eingesetzten Standardkonzentration von 10 µg/ml GCV zeigen U87 keine signifikante PS-Exposition: 2% sind positiv, gegenüber 1% bei unbehandelten Zellen. U87-*tk* zeigen nach Inkubation mit der Standardkonzentration 20% AnnexinV-positive Zellen (24% der vitalen Zellen) verglichen mit 2% bei der unbehandelten Kontrolle.

Bei Inkubation mit 100 µg/ml GCV zeigt sich eine leichte Erhöhung der positiven U87-Zellen (6%, d.h. 7% der vitalen Zellen), bei U87-*tk* ist keine signifikante Zunahme gegenüber der Inkubation mit 10 µg/ml zu verzeichnen (20% positiv, d.h. 25% der vitalen Zellen).

Bei höheren GCV-Konzentrationen ließ sich nach 48 h auch bei nicht transduzierten 9L-Zellen eine zunehmende PS-Exposition nachweisen (Tab. 9, Abb. 19 D). Diese trat jedoch im Gegensatz zu transduzierten 9L-*tk*-Zellen erst ab 1000 µg/ml GCV auf und betraf lediglich 18% der vitalen Zellen. 9L-*tk*-Zellen zeigten unter den gleichen Versuchsbedingungen bereits bei 10 µg/ml GCV 30%-PS-positive Zellen. Dieser Anteil stieg auf 43% bei Behandlung mit 1000 µg/ml GCV. Die Beeinträchtigung der Vitalität durch die Behandlung fällt entsprechend bei 9L-*tk*-Zellen deutlicher aus als bei 9L-Zellen: bei 1000 µg/ml GCV sind noch 81% der 9L-Zellen, jedoch nur noch 55% der 9L-*tk*-Zellen vital. Unbehandelte 9L- und 9L-*tk*-Zellen zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Vitalität und keine signifikante PS-Exposition.

Bei Behandlung der nicht transduzierten Zellen mit höheren 5-FC-Konzentrationen zeigte sich bei 3 mg/ml nach 48 h noch keine signifikante PS-Exposition oder Verringerung der Vitalität (Tab. 9, Abb. 19 C, D). Erst nach 72-96 h begannen auch 9L und U87-Zellen PS zu exponieren und die Vitalität ließ nach. Die transfizierten Derivate 9L-*cd* und U87-*cd* reagierten auf höhere Prodrug-Dosierungen mit gesteigerter PS-Exposition sowie verringerter Vitalität. Unbehandelte nicht transduzierte und transduzierte Zellen zeigten keine signifikante PS-Exposition oder Beeinflussung der Vitalität.

Die Chemotherapeutika Vincristin und Etoposid induzierten ebenfalls sowohl bei 9L- als auch bei U87-Zelllinien eine Exposition von PS, die nach 24 h noch gering war, nach weiteren 24 h deutlicher wurde (nicht gezeigt). 9L-Derivate waren zunächst etwas sensitiver gegen VP16 (21-25% der vitalen Zellen sind PS-positiv nach 24 h) als U87-abgeleitete Zelllinien (8-12% PS-positiv), nach 48 h glichen sich die Werte jedoch an (34-36% der 9L- bzw. U87-Zellen PS-positiv). Dies spiegelte sich auch in der Zytotoxizität wider: Nach 24 h waren noch ca. 88% der U87-Derivate, jedoch nur noch 54-67% der 9L- bzw. transduzierten 9L-Zellen vital. Nach weiteren 24 h VP-16-Behandlung waren sowohl bei U87- als auch bei 9L-Zellen noch etwa 28-32% der Zellen vital. PS-Exposition (bis zu 16%) und Vitalitätsrückgang (bis zu 62%) waren nach Vincristin-Behandlung insgesamt geringer. Auswirkungen von Doxorubicin konnten nicht durchflußzytometrisch untersucht werden, da die hohe Autofluoreszenz von Doxorubicin-behandelten mit der FACS-Messung interferierte.

3.3 Untersuchung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Depolarisation der Mitochondrien ist - ebenso wie die PS-Exposition - ein sehr frühes Merkmal der Apoptose. Hierunter versteht man den Verlust der selektiven Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, welche gemeinsam mit der Aktivität der Atmungskette am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt ist. Dieser Protonengradient führt zu einem elektrischen Transmembranpotential von etwa 180-200 mV, wobei die Mitochondrienmatrix negativ geladen ist gegenüber dem Cytosol. Zur Messung dieses mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) kann daher die selektive intramitochondriale Anreicherung von lipophilen, kationischen Farbstoffen wie z.B. DiOC₆(3) (3,3'-Dihexyl-oxacarbocyaniniodid) genutzt werden. Die Akkumulation solcher Farbstoffe ist umso ausgeprägter, je höher das Transmembranpotential ist. Zellen mit depolarisierten Mitochondrien, welche den fluoreszierenden Farbstoff nicht anreichern, sind daher mittels Durchflußzytometrie aufgrund ihrer geringen Fluoreszenz gut von Zellen mit polarisierten Mitochondrien (mit hoher Fluoreszenz) zu unterscheiden.

Die Untersuchung des MTPs ist, abgesehen von seiner Bedeutung als Apoptosemarker, auch in Bezug auf die der Apoptose zugrunde liegenden Signaltransduktionswege wichtig. Ein möglicher Apoptose-induzierender Signalweg bei Zellen, die das Tumorsuppressorgen p53 in seiner Wildtypsequenz (wt) exprimieren, verläuft nämlich über die Mitochondrien: DNA-Schädigungen induzieren eine p53-Akkumulation, die Transkription von Bax (einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2-Familie) wird durch p53 aktiviert. Bax-Homodimere treten aus dem Cytosol in die äußere Mitochondrienmembran ein und bewirken in einem noch nicht geklärten Prozess den Zusammenbruch des MTPs. In der Folge führt dies zu einem Austritt von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren und zur Aktivierung der Caspase 9, die dann die Effektorphase der Apoptose über eine Caspase 3-Aktivierung einleitet. Daher ist hier der direkte Vergleich

der wt-p53-exprimierenden U87-Zellen und der 9L-Zellen mit inaktiviertem, mutiertem (mt)-p53 von besonderem Interesse.

Zunächst wurde jedoch die Bedeutung des MTPs als Apoptosemarker in Jurkat-T-Zellen untersucht, da in diesen hämatopoetischen Zellen der Nachweis einer Mitochondriendepolarisation mittels des Farbstoffes DiOC₆(3) sehr gut charakterisiert ist.

Die Abb. 11 zeigt eine typische Messung des MTPs in Jurkat T-Zellen. Nach Behandlung mit dem Apoptose-Induktor Actinomycin D (1 µg/ml, 24 h) zeigen 13% der Zellen einen Rückgang der Fluoreszenz nach Färbung mit DiOC₆(3) ohne gleichzeitigen PI-Influx (das bedeutet, daß diese Zellen noch als vital zu betrachten sind; Abb. 11B). In der unbehandelten Kontrollpopulation sind dies nur 3% (Abb. 11A). D.h. etwa 10% der Zellen besitzen aufgrund der Actinomycin D-Behandlung depolarisierte Mitochondrien. Es weisen desweiteren nach der Behandlung mit Actinomycin D rund 10% mehr Zellen einen MTP-Rückgang bei gleichzeitigem PI-Influx auf. PI-positive Zellen mit einem noch hohen MTP zeigen keinen signifikanten Anstieg (von ca. 0,4% auf 2%). Die Mehrzahl der PI-positiven Zellen - dies zeigt der Verlauf der Ereignisse im Dot Plot - verliert ihre Vitalität, nachdem die Mitochondrien depolarisiert vorliegen. Nur wenige Ereignisse zeigen PI-positive Zellen, welche zuerst ihre Membranintegrität und erst dann, sekundär, die Polarität ihrer Mitochondrien einbüßen. Als Positivkontrolle (Abb. 11 C, D) dient die Vorbehandlung der Zellen mit m-Carbonyl-cyanidchlorophenylhydrazon (mCICCP), einem Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung (30 min, 200 µM mCICCP, Kap. II. B 4.4). Durch die Entkopplung bricht das MTP zusammen und nach Färbung mit DiOC₆(3) kann anhand dieser niedrig-fluoreszierenden Zellen der linke, untere Quadrant als repräsentative Stichprobe der depolarisierten Zellen definiert werden.

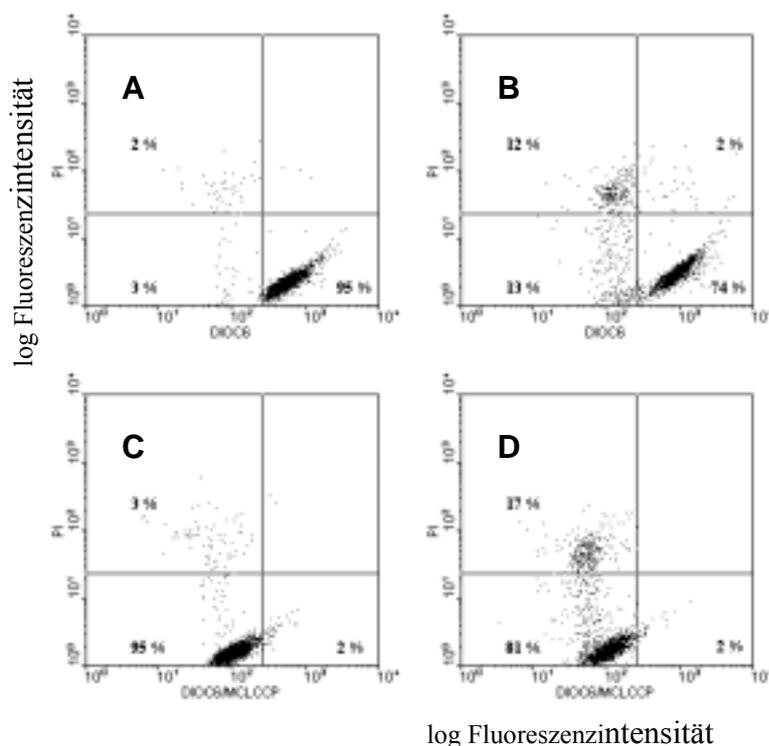


Abb. 11: 24 h-Inkubation mit 1 µg/ml Actinomycin D induziert in Jurkat-T-Zellen ein Absinken des Mitochondrien-transmembranpotentials (MTP). Sind die Mitochondrien einer Zelle depolarisiert, so bleibt eine Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes DiOC₆(3) in den Mitochondrien aus, die dann gemessene Fluoreszenz ist deutlich niedriger als bei Zellen mit nicht depolarisierten Mitochondrien. Die Zellen im jeweils unteren linken Quadranten weisen ein verringertes MTP auf und sind gleichzeitig vital (d.h. können nicht mit PI angefärbt werden). Im Vergleich zu unbehandelten Jurkat-T-Zellen (A) weisen die mit Actinomycin D behandelten Zellen (B) in dieser durchflußzytometrischen Analyse etwa 10% mehr vitale Zellen mit verringerter DiOC₆(3)-Fluoreszenz auf.

Diese besitzen depolarisierte Mitochondrien. „Nicht-vitale“ (PI-positive) Zellen zeigen überwiegend eine verringerte DiOC₆(3)-Fluoreszenz. Nach Präinkubation mit einem Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, mCICCP, der sowohl bei unbehandelten (C) als auch bei behandelten Zellen (D) zu einem Absinken des MTPs führt, zeigen etwa 98% der Zellen eine verringerte Fluoreszenz nach Färbung mit DiOC₆(3).

Entsprechende Untersuchungen zum MTP wurden mit den wt- und den mt-p53-Gliomzelllinien durchgeführt (Abb. 17 E, F, Tab. 7). wt-p53 U87-Zelllinien zeigten ab einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D einen deutlichen Rückgang der Vitalität. Gleichzeitig nahm der Anteil noch vitaler Zellen mit depolarisierten Mitochondrien an der Gesamtpopulation zu: In den unbehandelten Kontrollen waren 1-4% vitale Zellen mit depolarisierten Mitochondrien zu detektieren, nach ActoD-Behandlung waren es 30% bei U87-*cd*, 43% bei U87 und 74% bei U87-*tk*. Obwohl U87-*tk*- und U87-*cd*-Zellen einen etwa gleich stark ausgeprägten Rückgang der Vitalität zeigten, wiesen U87-*tk*-Zellen im AnnexinV- und im MTP-Test jeweils ca. 40% mehr apoptotische Zellen auf als U87-*cd*-Zellen.

Bei den mt-p53 9L-Zellen war ein signifikanter Rückgang des MTPs erst ab einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D und einem drastischen Rückgang der Vitalität festzustellen. Der Anteil depolarisierter Zellen war mit 17% bei 9L-*cd*, 18% bei 9L und 34% bei 9L-*tk* in Relation zu den U87-Zelllinien geringer. PS-Exposition trat bei den 9L-Zelllinien bereits bei wesentlich geringeren ActoD-Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$) auf und nahm stetig und vergleichsweise stärker zu. Nach Behandlung mit 2 $\mu\text{g/ml}$ ActoD waren 38% 9L-*tk*-, 40% 9L- und 48% 9L-*cd*-Zellen PS-positiv.

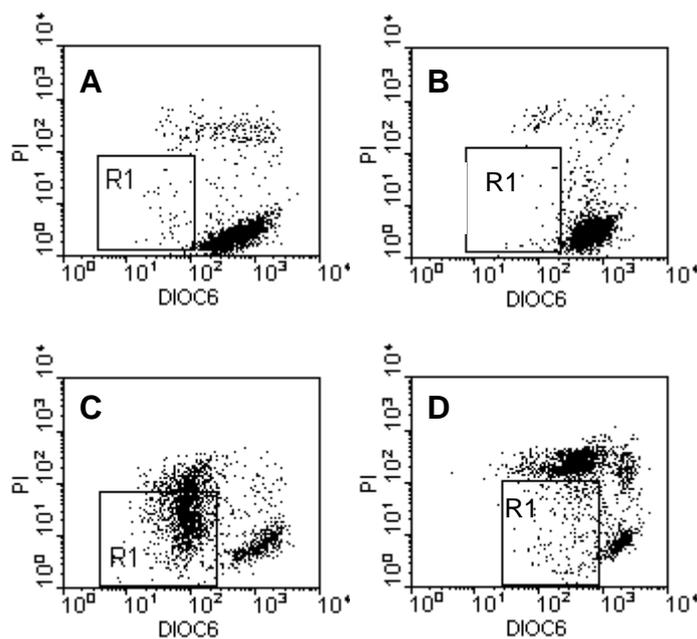


Abb. 12: Durchflußzytometrische Untersuchung des Mitochondrientransmembranpotentials bei U87- und 9L-Zellen nach Behandlung mit ActoD. In A, B unbehandelte U87- (A) bzw. 9L- (B) Zellen nach Färbung mit PI und DiOC₆(3). In C, D: 24 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ ActoD behandelte U87- (C) bzw. 9L-Zellen (D) ebenfalls nach Färbung mit PI und DiOC₆(3).

Während in den unbehandelten Zellproben nur wenige Zellen mit reduziertem MTP zu detektieren sind (enthalten in der als R1 bezeichneten Region), ist in den U87-Zellen nach Behandlung mit ActoD eine stabile Population mit reduziertem MTP zu detektieren, die noch nicht PI-positiv ist, d.h., die noch als vital zu bezeichnen ist.

Bei 9L-Zellen hingegen ist der überwiegende Teil der Zellen mit reduziertem MTP bereits auch PI-positiv, d.h. nicht mehr vital. (Leichte Schwankungen in der Fluoreszenz der Zellproben ergeben sich durch die Veränderung des Anteils vitaler, polarisierter Zellen in der jeweiligen Probe, da nur diese Zellen den Farbstoff aufnehmen. Bei einem geringeren Anteil dieser Zellen akkumuliert mehr Farbstoff in diesen Zellen.)

Auch unter Genterapie zeigte sich, daß mitochondriale Effekte bei den U87-Derivaten eine größere Rolle zu spielen scheinen als bei 9L-abgeleiteten Zelllinien (Tab. 8, Abb. 18 E, F). Allerdings schienen diese bei einer geringeren Anzahl von Zellen aufzutreten als die PS-Exposition.

Ein signifikanter Rückgang des MTPs der genterapeutisch behandelten U87-*tk*- bzw. U87-*cd*-Zellen ließ sich nach 2-3 Tagen messen (bis zu 15% bei U87-*cd* und 31% bei U87-*tk*). PS-Exposition ließ sich jedoch bereits ab Tag 1 der Behandlung (9% bei U87-*cd* bzw. 15% bei U87-*tk*) und stärker steigend als der Anteil der Zellen mit niedrigem MTP nachweisen (bis zu 19% bei U87-*cd* und bis zu 42% bei U87-*tk*). *Cd*-transduzierte Zellen zeigten im Vergleich zu *tk*-transduzierten Zellen eine geringere Ausprägung dieser

apoptotischen Merkmale. Nicht transduzierte U87-Zellen, unbehandelte oder mit irrelevanten Prodrugs behandelte Zellen zeigten keine signifikanten MTP-Veränderungen.

Bei den mit GCV-behandelten 9L-*tk*-Zellen (10 µg/ml) wurden an Tag 1 mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung etwa 22% vitale, apoptotische Zellen gemessen, diese wiesen jedoch keine Mitochondrien-depolarisation auf. An Tag 2 sind 36% der vitalen Zellen AnnexinV-positiv, jedoch hatten nur 10% der vitalen Zellen ein verringertes MTP. Nach 3-tägiger GCV-Behandlung waren 38% der Zellen apoptotisch, es besaßen jedoch nur 19% depolarisierte Mitochondrien. Unbehandelte 9L-*tk*-Zellen oder nicht transduzierte 9L-Zellen (behandelt oder unbehandelt) wiesen keine signifikanten MTP-Veränderungen auf (1-3%).

Ähnlich verhielt es sich bei 9L-*cd* Zellen nach Behandlung mit 5-FC (100 µg/ml). Der Anteil der vitalen Zellen, die PS-exponierten war an jedem Behandlungstag höher als der Anteil der Zellen mit verringertem MTP. Nicht transduzierte 9L- oder unbehandelte 9L-*cd*-Zellen zeigten keine MTP-Veränderung über einen Hintergrundwert von 2% hinaus. Auch hier war ähnlich wie bei U87-Zelllinien eine geringere Ausprägung der apoptotischen Merkmale bei 9L-*cd*-Zellen als bei 9L-*tk*-Zellen festzustellen. Verglichen mit U87-Zelllinien war der Anteil von Zellen mit verringertem MTP deutlich geringer. Dieser Unterschied zwischen U87- und 9L-abgeleiteten Zelllinien wurde bei Behandlung der Zellen mit höheren Prodrug-Konzentrationen noch deutlicher (Tab. 9, Abb. 19).

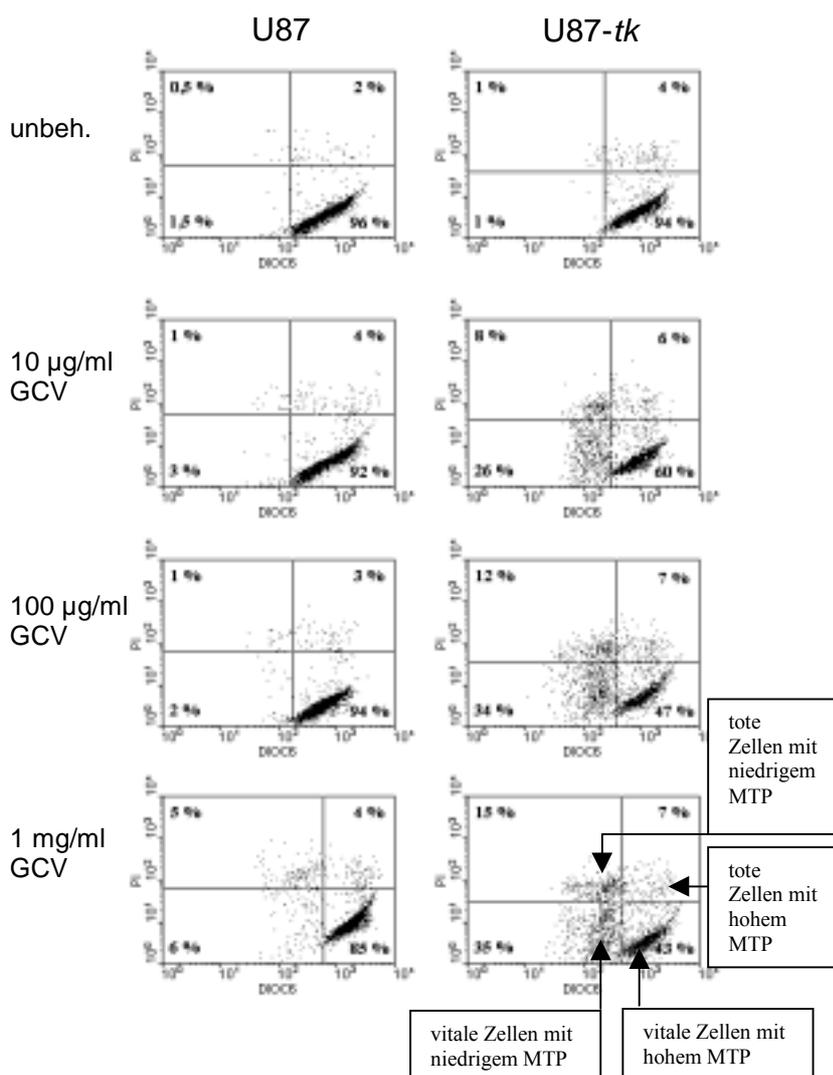


Abb. 13: Vergleich der Auswirkung verschiedener Prodrug-Konzentrationen auf das mitochondriale Transmembranpotential (MTP) von U87 und U87-*tk*-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit verschiedenen GCV-Konzentrationen (10 µg/ml bis 1 mg/ml) inkubiert bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit dem MTP-Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) sowie Propidiumiodid (zur Identifizierung nicht vitaler Zellen) gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Vitale, nicht apoptotische Zellen weisen eine hohe DiOC₆(3)-Fluoreszenz auf und sind PI-negativ (unterer rechter Quadrant). Eine Verringerung des MTPs äußert sich in einer geringeren DiOC₆(3)-Fluoreszenz (unterer linker Quadrant). Nicht vitale Zellen mit verringertem MTP befinden sich im oberen linken Quadranten, nicht vitale Zellen mit hohem MTP im oberen, rechten Quadranten. Die

transduzierten U87-*tk*-Zellen zeigen bereits nach Behandlung mit niedrigen GCV-Konzentrationen (10 µg/ml) einen deutlichen Rückgang des MTPs der Zellen, ein charakteristisches Apoptose-Merkmal. Bei Erhöhung der GCV-Konzentration wird auch der Anteil dieser apoptotischen Zellen an der behandelten U87-*tk*-Zellpopulation größer. Bei nicht transduzierten Zellen ist eine leichte Zunahme solcher apoptotischer Zellen erst ab einer 100-fach höheren GCV-Konzentration (1 mg/ml) festzustellen. Unbehandelte Zellproben zeigen keine signifikanten MTP-Veränderungen. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer repräsentativen Meßreihe.

Wie in der Abb. 13 für GCV-behandelte und unbehandelte U87- und U87-*tk*-Zellen dargestellt, wurden alle Zelllinien auch nach Behandlung mit den höheren Prodrug-Konzentrationen (10-1000 µg/ml GCV bzw. 100-3000 µg/ml 5-FC) auf MTP-Veränderungen untersucht (Tab. 9, Abb. 19).

Bei den U87-abgeleiteten Zelllinien U87-*tk* und U87-*cd* zeigte sich eine Korrelation zwischen steigender Zytotoxizität, PS-Exposition und MTP-Erniedrigung bei Behandlung mit höheren Konzentrationen der jeweiligen Prodrug. Während jedoch die Vitalität mit steigender Prodrug-Konzentration bei U87-*tk*- und U87-*cd*-Zellen etwa gleich stark abnahm, waren die apoptotischen Merkmale wiederum bei U87-*tk*-Zellen wesentlich ausgeprägter: Die PS-Exposition nahm bei U87-*tk*-Zellen von 27% positiven Zellen (10 µg/ml GCV) auf bis zu 54% (1 mg/ml GCV) zu. Die zugehörigen Werte für den Anteil der Zellen mit niedrigem MTP lagen zwar immer deutlich darunter, stiegen jedoch ebenfalls mit erhöhter Prodrug-Konzentration von 18% positiven Zellen (bei 10 µg/ml GCV) bis auf 40% (bei 1 mg/ml GCV) (Abb. 13). U87-*cd*-Zellen zeigten unter Standardbedingungen (100 µg/ml 5-FC) nur 18% PS-positive und nur 10% Zellen mit geringem MTP. Bei Erhöhung der 5-FC-Konzentration auf 3 mg/ml ließ sich dies auf 36% PS-positive und 19% Zellen mit geringem MTP steigern. Auch bei U87-*cd*-Zellen war also jeweils die Zahl PS-positiver Zellen höher als die Zahl der Zellen mit depolarisierten Mitochondrien. Unbehandelte U87-*tk*- oder U87-*cd*-Zellen zeigten keine signifikanten apoptotischen Veränderungen.

Obwohl transduzierte 9L-Zelllinien vergleichbare cytotoxische Effekte nach Prodrug-Behandlung zeigten, war jedoch insgesamt die Ausprägung apoptotischer Merkmale etwas geringer als bei den transduzierten U87-Zelllinien. Der Verlust des MTPs war bei 9L-*tk*-Zellen bei deutlich weniger Zellen festzustellen als bei U87-*tk*. Dieser Unterschied wurde besonders deutlich bei einem Vergleich der Daten, die man für ähnlich zytotoxisch effektive Dosierungen der Prodrug erhielt. Bei 9L-*tk*-Zellen sank die Vitalität nach 2-tägiger Behandlung mit 10 µg/ml GCV auf 65%. Eine annähernd gleich starke Zytotoxizität erreichte man in diesem Zeitraum bei U87-*tk*-Zellen nur nach Behandlung mit 1000 µg/ml GCV. Unter diesen Bedingungen waren 55% der U87-*tk*- und nur 30% der 9L-*tk*-Zellen PS-positiv, bei den Zellen mit geringem MTP waren 40% der U87-*tk* und nur 10% der 9L-*tk*-Zellen betroffen. Dieser Unterschied blieb aber auch feststellbar, wenn man die Auswirkung identischer GCV-Konzentrationen verglich, lediglich bei der Zahl der PS-positiven Zellen erreichten die 9L-*tk*-Zellen dann gleich hohe Werte. Ein Vergleich der *cd*-transduzierten Derivate fiel nicht so deutlich aus. Zwar war die Ausprägung der apoptotischen Merkmale bei U87-*cd*-Zellen nach 5-FC-Behandlung insgesamt etwas deutlicher. Bei Dosierungen etwa gleicher Toxizität glichen sich die Werte weiter an. Unbehandelte transduzierte Zellen (9L-*tk*, 9L-*cd*) zeigten dagegen keine signifikanten, apoptotischen Veränderungen.

Nicht transduzierte Zelllinien (9L, U87) zeigten unbehandelt und unter Standard-Prodrug-Konzentrationen keinen Effekt. Erst bei Erhöhung um den Faktor 100 zeigten U87 und 9L nach GCV-Behandlung 17 bzw. 18% PS-exponierende Zellen. Bei U87 war dies begleitet von einem Anstieg der Zellen mit geringem MTP (11%), welcher bei 9L-Zellen nicht deutlich war (6%). Bei Behandlung der nicht transduzierten Zellen mit 5-FC zeigte sich die größere Resistenz der U87-Zellen in dem (nach 2 Tagen noch) ausbleibenden Effekt auf die PS-Exposition und das MTP selbst bei 30-fach höherer 5-FC-Konzentration als unter Standardbedingungen. Erst nach längerer Inkubationszeit zeigten sich auch hier apoptotische Merkmale. Bei 3 mg/ml 5-FC war bei 9L-Zellen zumindest eine moderate Zunahme der PS-exponierenden Zellen

(7%) festzustellen. Bei Erhöhung der Prodrug-Konzentrationen begannen also auch die nicht-transduzierten Zelllinien cytotoxische Effekte und Apoptose zu demonstrieren.

Mit dem Mitosensor-Farbstoff können Veränderungen des mitochondrialen Potentials direkt in situ untersucht werden (Abb. 14).

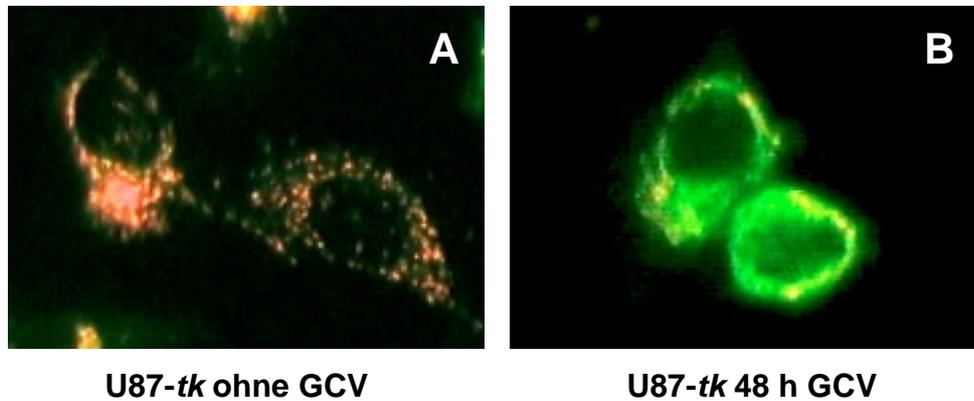


Abb. 14: Mitochondriendepolarisation wird durch HSV-*tk*/GCV-Gentherapie bei U87-*tk*-Zellen induziert. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und 2 Tage lang mit 10 $\mu\text{g/ml}$ GCV behandelt (B) bzw. unbehandelt (A) belassen. Anschließend wurde eine in situ-Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Mitosensor (Clontech) und Propidiumiodid durchgeführt. Rote, punktuelle Mitosensor-Fluoreszenz weist auf Mitochondrien mit hohem Transmembranpotential hin. Grüne, diffuse Fluoreszenz zeigt cytoplasmatisch lokalisierten Mitosensor-Farbstoff. Bei fehlendem Transmembranpotential bleibt eine Akkumulation des Farbstoffes in den Mitochondrien aus, die dortige Fluoreszenzverschiebung durch Aggregatbildung zu Rot findet dann nicht statt. Fehlende nukleäre PI-Färbung zeigt, daß die dargestellten Zellen noch vital sind.

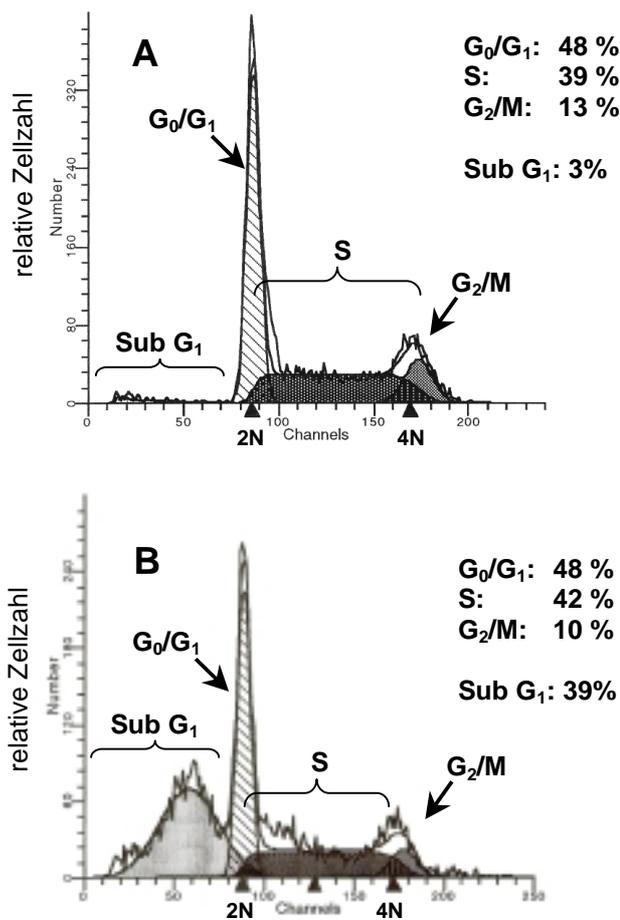
Diese mikroskopischen Analysen bestätigten qualitativ die mit DiOC₆(3) gewonnenen Ergebnisse. Gentherapeutische oder Behandlung mit Actinomycin D induzierte hier sichtbar eine Depolarisierung der Mitochondrien. Nekrose-induzierende Ethanolkonzentration (20% vol/vol) induzierte dagegen keine Depolarisation der Mitochondrien.

3.4 Bestimmung des Anteils subdiploider Zellen

Apoptotische Zellen können durchflußzytometrisch auch aufgrund ihres geringeren DNA-Gehalts identifiziert werden. Typischerweise wird die DNA in apoptotischen Zellen durch Endonukleasen fragmentiert, diese Fragmente können leicht ausgewaschen werden. Außerdem geht DNA durch Abspaltung DNA-haltiger Vesikel während des apoptotischen Zelltodes verloren. Als kennzeichnend für Apoptose wird zumeist die Erscheinung einer Population unterhalb des G₀/G₁-Peaks angesehen (die sogenannte Sub-G₁-Population). Dies ist wiederum für hämatopoetische Zellen beschrieben worden und läßt sich nach Behandlung von Jurkat-T-Zellen mit Actinomycin D (24 h) gut demonstrieren:

Abb 15: Nach Behandlung mit Actinomycin D zeigen sich apoptotische Jurkat-T-Zellen (aufgrund des Apoptose-typischen DNA-Verlusts) in der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse in Form einer Zellpopulation mit einem DNA-Gehalt, der unter dem normaler diploider Zellen ($\geq 2N$, bis zu $4N$) liegt. Diese Population wird als „Sub- G_0/G_1 “-Zellpopulation bezeichnet, da diese Zellen einen DNA-Gehalt von $<2N$ aufweisen (G_0/G_1 -Zellen = $2N$). Unbehandelt (A) zeigen nur 3% der Zellen einen Sub- G_1 -DNA-Gehalt, nach Behandlung (24 h) mit $2\mu\text{g/ml}$ (B) Actinomycin D sind 39% der gesamten gemessenen Zellprobe im Sub- G_1 -Bereich zu finden. Die Zellen wurden mit 70%-Ethanol fixiert (1 h) und störende RNA durch Verdau mit RNase A abgebaut. Nach Färbung mit Propidiumiod ($5\mu\text{g/ml}$) wurde die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels ModFit-Software (Vers. 2.0). Die Prozentzahlen der Zellzyklusphasen G_0/G_1 , S und G_2/M addieren sich jeweils zu 100%. Die Prozentzahl apoptotischer Zellen bezieht sich auf die insgesamt gemessenen Zellen, d.h. bei einem Anteil von 27% apoptotischer Zellen, verteilen sich die restlichen 73% auf die Zyklusphasen („=100%“).

$2N$ = diploider DNA-Gehalt, $4N$ = verdoppelter diploider DNA-Gehalt.



Nach Actinomycin D-Behandlung läßt sich diese Sub- G_1 -Population auch bei den Gliomzelllinien zeigen (Abb. 26). Die durchflußzytometrische Messung der Zahl der Sub- G_1 -Ereignisse ist ein gebräuchlicher und guter Marker für Apoptose. (Allerdings setzen sich Sub- G_1 -Ereignisse nicht nur aus ganzen Zellen, sondern auch aus Vesikeln zusammen, weshalb es hier zu einer Amplifizierung des Signals kommt.)

Als Indikator für Apoptose wurde der Sub- G_1 -Populationsanteil bei den durchflußzytometrischen Untersuchungen stets zusätzlich analysiert und mit den Ergebnissen der AnnexinV-Bindungsstudien und der Analysen des MTPs verglichen. Es zeigten sich prinzipiell die gleichen Tendenzen (Tab. 7-9, Abb. 17-19): So zeigten die transduzierten Zelllinien nach Behandlung mit den entsprechenden Prodrugs signifikante, im Verlauf der Behandlung Zunahmen der Sub- G_1 -Ereignisse. Dies war bei unbehandelten Zellen nicht zu beobachten. Die nicht transduzierten Ausgangszelllinien zeigten erst nach Erhöhung der Prodrug-Konzentrationen um den Faktor 30-100 eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikante Zunahme solcher Apoptose-typischen Zellen mit verringertem DNA-Gehalt. Nach Actinomycin D-Behandlung ab einer Konzentration von $0,01\mu\text{g/ml}$ war bei allen hier untersuchten Zelllinien eine deutliche Erhöhung der Sub- G_1 -Ereignisse festzustellen. Dieser Anstieg von Sub- G_1 -Ereignissen wäre in nekrotischen Zellproben nicht oder nicht in diesem Maße zu erwarten, da es hier nicht zu einer Veränderung des DNA-Gehaltes der Zellen kommt, allenfalls zu einem Aufplatzen der Zellen mit Entlassung von Chromatin, welches durch die ausgedehnten Waschschrte in der präparativen Vorbereitung der Zellproben größtenteils entfernt werden und die Messung nicht wesentlich beeinträchtigen sollte. Bei Behandlung der Zellen mit Nekrose-

auslösender Ethanolkonzentration (20% vol/vol) waren dementsprechend keine signifikanten Mengen von Sub-G₁-Ereignissen zu messen.

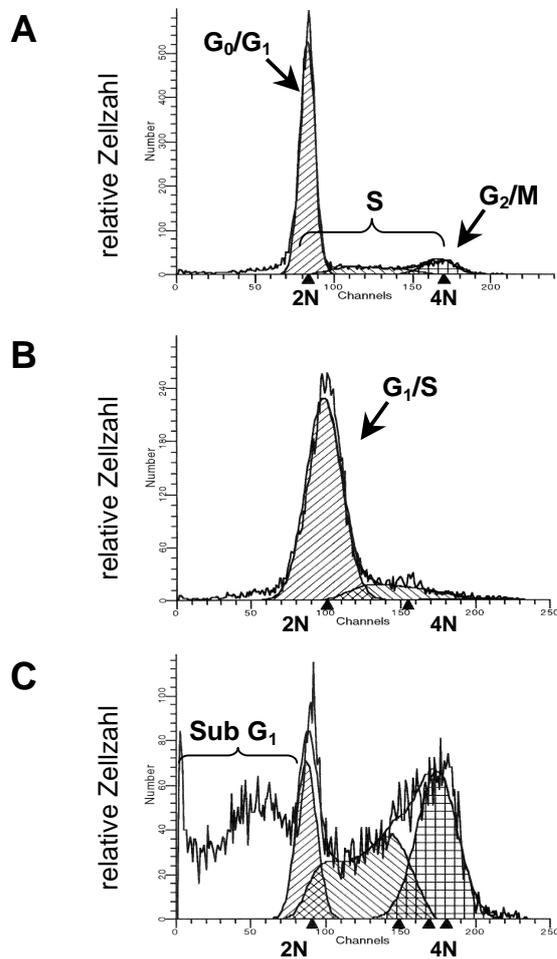


Abb. 16: Ausprägung einer Apoptose-typischen Sub-G₁-Population bei GCV-behandelten 9L-*tk*-Zellen. Dargestellt sind durchflußzytometrische Zellzyklusanalysen unbehandelter 9L-*tk*-Zellen (in A) sowie 4h mit 10 µg/ml GCV behandelter 9L-*tk*-Zellen nach weiteren 20h (in B) bzw. 44h Kultur in unversetztem Normalmedium (in C).

4h Behandlung der 9L-*tk*-Zellen mit GCV genügen, um einen Zellzyklusphasenarrest an der G₁/S-Grenze zu induzieren (B), der sich nach weiteren 24h in normalem, unversetztem Medium auflöst, wobei ein großer Teil der Zellen in Apoptose geht (C). Zu erkennen ist dies an dem großen Anteil von Zellen im Sub-G₁-Bereich.

(Weitere Erklärungen der Darstellung können der Abb. 15 entnommen werden.)

Zelllinie	Behandlung	Konz. [µg/ml]	vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub-G ₁ [%]
9L	unbehandelt	0	89	8	3	7
	ActoD	0,001	91	8	2	9
		0,01	86	10	7	14
		0,1	72	26	7	27
		1	66	32	7	36
		2	20	40	18	n.a.*
9L- <i>tk</i>	unbehandelt	0	90	7	2	4
	ActoD	0,001	89	9	3	6
		0,01	87	6	3	9
		0,1	71	24	5	22
		1	71	25	6	36
		2	45	38	34	n.a.
9L- <i>cd</i>	unbehandelt	0	92	5	1	5
	ActoD	0,001	92	5	1	11
		0,01	89	5	2	10
		0,1	77	12	4	24
		1	76	20	6	39
		2	43	48	17	n.a.
U87	unbehandelt	0	86	9	4	10
	ActoD	0,001	90	12	5	11
		0,01	86	5	11	40
		0,1	49	62	43	68
		1	39	59	51	n.a.
U87- <i>tk</i>	unbehandelt	0	85	10	3	6
	ActoD	0,001	89	9	2	6
		0,01	94	7	10	19
		0,1	67	83	74	89
		1	56	92	68	n.a.
U87- <i>cd</i>	unbehandelt	0	75	14	1	15
	ActoD	0,001	75	14	2	23
		0,01	82	14	9	37
		0,1	58	36	30	78
		1	38	60	39	79

Tab. 7: Vitalität, PS-Exposition, Zellen mit verringertem Mitochondrienpotential bzw. DNA-Gehalt (in %) nach Behandlung mit verschiedenen Actinomycin D-Konzentrationen bzw. in unbehandelten Kontrollen. Als „vitale“ Zellen wird der Anteil der Zellen (in Prozent) an der Gesamtpopulation bezeichnet, welcher in der durchflußzytometrischen Analyse PI-negativ ist. Die Prozentzahl der Zellen, die Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exponiert haben (PS-positiv sind), bezieht sich nur auf noch vitale (PI-negative) Zellen. Nach Abzug der PI-positiven Zellen von der gesamten Zellzahl bilden die verbliebenen vitalen Zellen zusammen also den „100%“-Bezugswert. Ein Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) ist typisch für apoptotische Zellen. Die Prozentzahl derjenigen Zellen mit verringertem MTP bezieht sich ebenfalls nur auf die noch vitale Zellfraktion. Das verringerte MTP ist meßbar als geringere Fluoreszenz dieser apoptotischen Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach Färbung mit dem Farbstoff DiOC₆(3). Im Verlauf der Apoptose

kommt es zu charakteristischen DNA-Verlusten, die zur Bildung einer Zellpopulation mit einem DNA-Gehalt unter dem der unveränderten diploiden Zellen führt („subdiploid“ oder „sub G_1 “). Der DNA-Gehalt kann durchflußzytometrisch gemessen werden. Vitale Zellen können hier aufgrund der Fixierung jedoch nicht mehr von toten Zellen unterschieden werden. Die Prozentzahl subdiploider Zellen bezieht sich demnach auf die gesamte, und nicht nur auf die vitale Zellpopulation. Ergebnisse einer repräsentativen Versuchsreihe. Standardabweichungen (SD) sind in der folgenden Abb. 17. eingetragen.

(*n.a.: nicht auswertbar, aufgrund nicht eindeutig identifizierbarem G_1 -Peak)

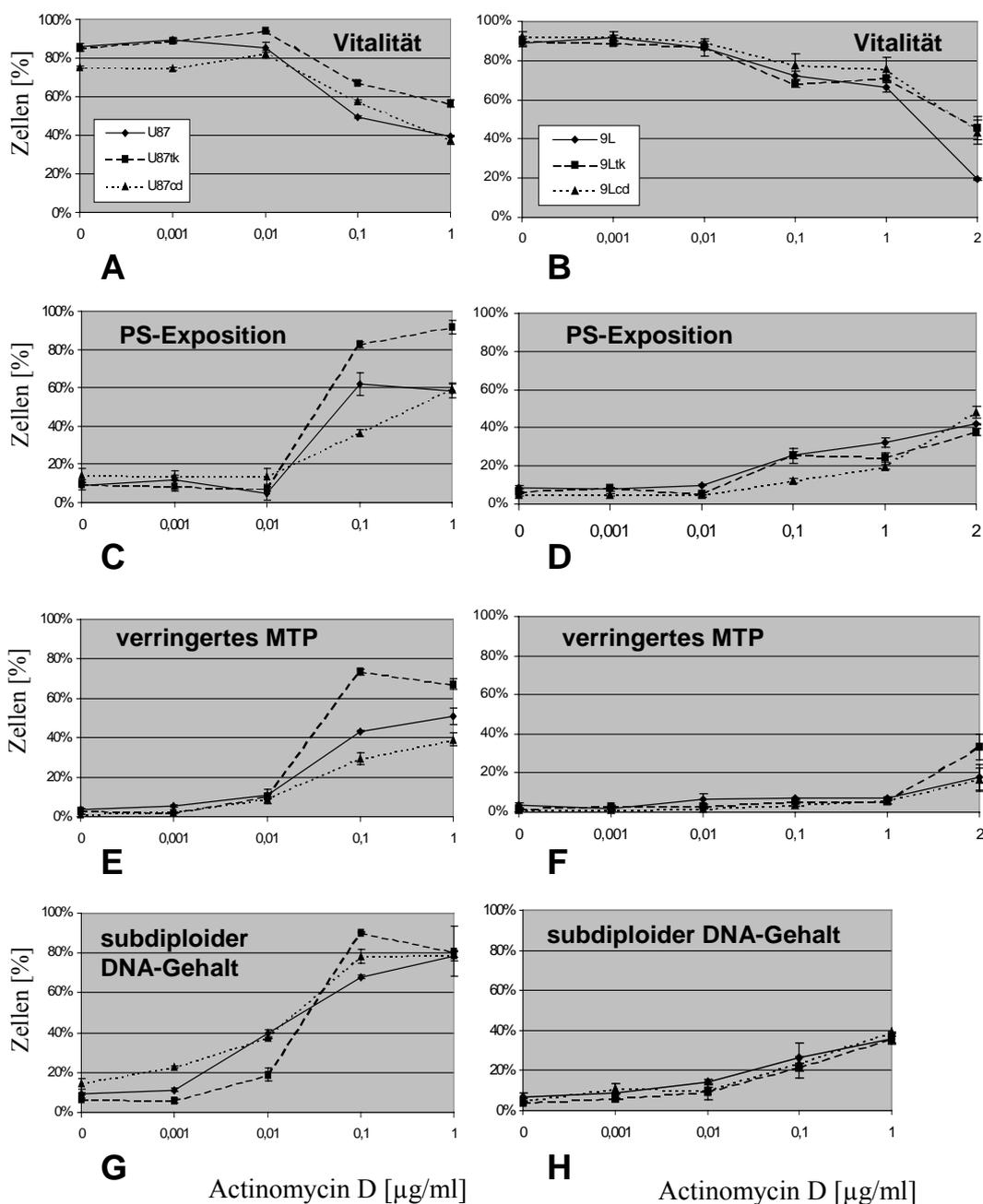


Abb. 17: Durchflußzytometrische Messungen der Vitalität (A, B), der PS-Exposition (C, D), des MTP-Rückgangs (E, F) sowie des DNA-Verlustes (G, H) der transduzierten und nicht-transduzierten 9L- und U87-Zelllinien nach 24 h Behandlung mit Actinomycin D in steigenden Konzentrationen (0-2 $\mu\text{g/ml}$). (Erklärung der gemessenen Parameter „Vitalität“, „PS-Exposition“, „verringertes MTP“ und „subdiploider DNA-Gehalt“ in der zugehörigen Tab. 7.) Ab einer ActoD-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zeigten sowohl die U87- als auch die 9L-Zelllinien

einen deutlichen Rückgang der Vitalität. Ab dieser Konzentration traten auch die ersten Anzeichen apoptotischen Zelltodes auf: Vor allem in den U87-Zelllinien war ein hoher Anteil der Zellen PS-positiv (36-83%) und wies depolarisierte Mitochondrien auf (30-74%). Es wurden vermehrt Ereignisse mit einem subdiploiden DNA-Gehalt (sub-G₁, 68-89%) gemessen. Diese charakteristischen Apoptose-Anzeichen waren bei 9L-Zelllinien zwar ebenfalls festzustellen, traten jedoch in geringerem Maße ab 0,1 µg/ml ActoD auf: Die PS-positiven Zellen betragen 12-26%. Dieser Prozentsatz konnte bis auf 38-48% bei Inkubation mit 2 µg/ml ActoD gesteigert werden. Auffallend war, daß der Prozentsatz von Zellen mit depolarisierten Mitochondrien dahinter deutlich zurückstand (4-7% bei 0,1 µg/ml und 6-7% bei 1 µg/ml und 17-34% bei 2 µg/ml ActoD). Sub-G₁-Ereignisse nahmen bei den 9L-Zelllinien ebenfalls ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ActoD zu (22-27%).

Zelllinie	Behandlung	Dauer [Tage]	vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub G ₁ [%]
9L	unbehandelt	3	96	4	1	4
	GCV (10 µg/ml)	1	94	5	2	4
		2	95	5	3	5
		3	95	5	2	5
	unbehandelt	3	86	4	2	2
	5-FC (100 µg/ml)	1	87	3	2	2
		2	85	3	2	3
		3	85	4	2	3
	9L- <i>tk</i>	unbehandelt	3	87	6	2
GCV (10 µg/ml)		1	63	22	2	≈11
		2	47	36	10	≈33
		3	33	38	19	≈15
9L- <i>cd</i>	unbehandelt	3	81	3	2	3
	5-FC (100 µg/ml)	1	85	12	4	18
		2	70	25	7	22
		3	62	20	11	19
U87	unbehandelt	3	92	6	2	2
	GCV (10 µg/ml)	1	93	8	2	1
		2	91	9	2	2
		3	93	8	3	2
	unbehandelt	3	82	6	4	4
	5-FC (100 µg/ml)	1	82	8	5	4
		2	83	7	5	4
		3	82	6	7	3
	U87- <i>tk</i>	unbehandelt	3	91	9	2
GCV (10 µg/ml)		1	87	15	5	9
		2	76	37	16	46
		3	73	42	31	54
U87- <i>cd</i>	unbehandelt	3	93	5	6	4
	5-FC (100 µg/ml)	1	91	9	4	11
		2	86	16	9	21
		3	82	19	15	33

Tab. 8: Auswirkung der Genterapie auf die Vitalität, die Exposition von Phosphatidylserin (PS), das mitochondriale Transmembranpotential (MTP) und den DNA-Gehalt der Zielzellen. Die Werte stellen Mittelwerte einer

repräsentativen Versuchsreihen dar, die in der Wiederholung vergleichbare Ergebnisse zeigte. Standardabweichungen sind der folgenden Abb. 18 zu entnehmen. Erklärungen der gemessenen Parameter können der Tab. 7 entnommen werden.

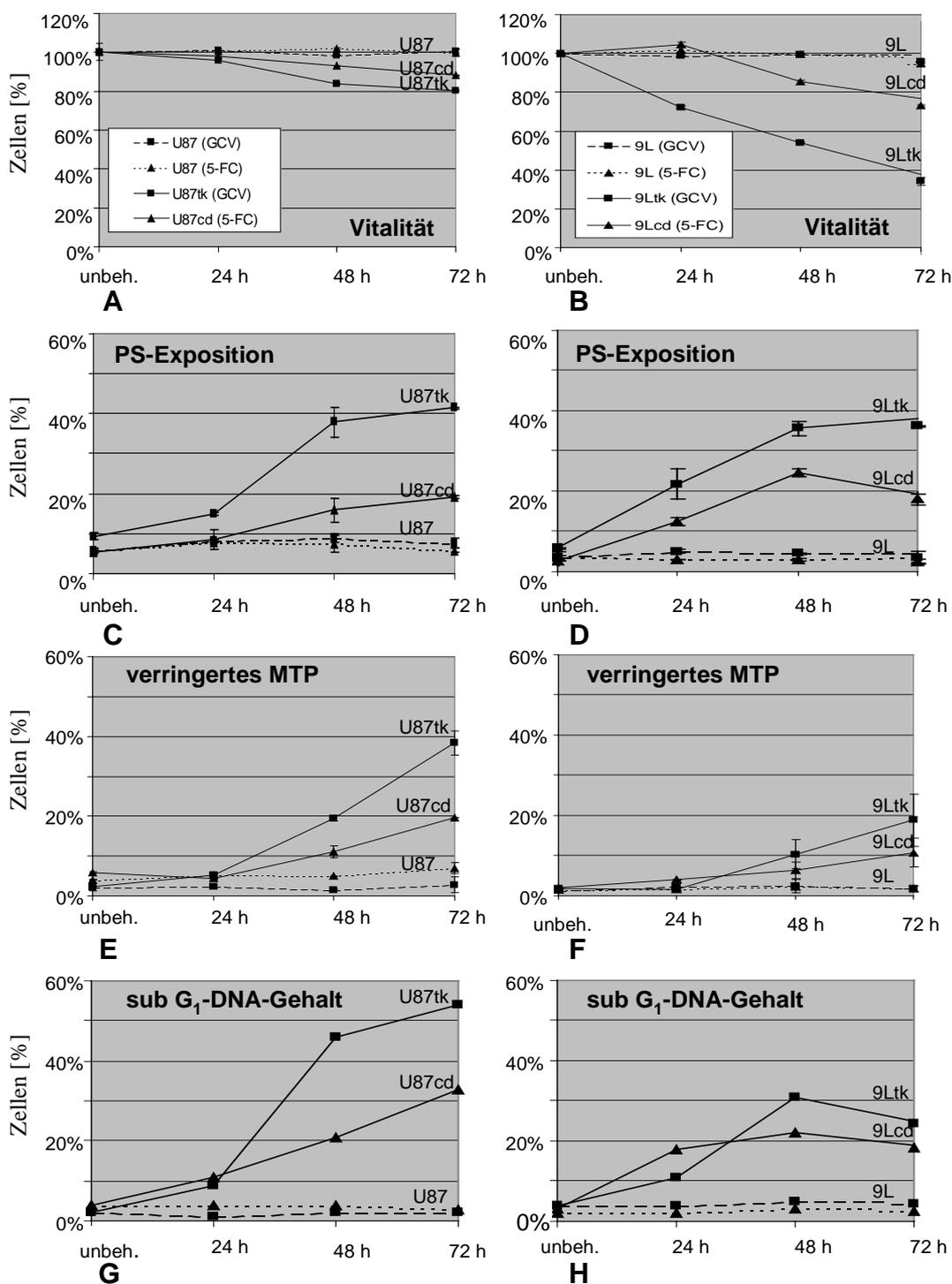


Abb. 18: Durchflußzytometrische Messungen der Vitalität (A, B), der Phosphatidylserin (PS)-Exposition (C, D), des Rückgangs des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) (E, F) sowie des DNA-Verlusts (subdiploider DNA-Gehalt: G, H) der transduzierten und nicht-transduzierten 9L- und U87-Zelllinien nach gentherapeutischer Behandlung über einen Zeitraum von 3 Tagen (s.a. Tab. 8). Erklärung der gemessenen Parameter s.

Tab. 7. Behandlung mit den Prodrugs (10 µg/ml GCV bzw. 100 µg/ml 5-FC) induziert in den entsprechend (mit dem HSV-*tk*- bzw. dem E.coli-*cd*-Gen) transduzierten U87- und 9L-Zelllinien Apoptose; bei unbehandelten Zellen ist dies nicht festzustellen. Die nicht transduzierten Ausgangszelllinien U87 und 9L zeigen unbehandelt oder nach Behandlung mit den Prodrugs keine signifikanten Apoptose-Merkmale.

Transduzierte 9L-Zellen zeigen einen größeren cytotoxischen Effekt nach Prodrug-Behandlung als transduzierte U87-Zellen: Nach 3-tägiger Prodrug-Behandlung sind 33-62% der transduzierten 9L-Zellen, aber noch 73-82% der U87-Zellen vital. Nicht transduzierte Zellen bleiben von der Prodrug-Behandlung unbeeinflusst. Die Vitalität der jeweiligen unbehandelten Zellen wurde hier als „100%“-Bezugswert genommen. Das für apoptotische Zellen charakteristische Merkmal „PS-Exposition“ tritt bei den *tk*-transduzierten U87- und 9L-Zellen häufiger auf, als bei den *cd*-transduzierten: 38-42% der *tk*-transduzierten und nur 19-20% der *cd*-transduzierten Zellen sind nach 3-tägiger Prodrug-Behandlung PS-positiv. Ein Rückgang des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) ist bei *tk*-transduzierten U87-Zellen nach Prodrug-Behandlung häufiger festzustellen (31%) als bei den *tk*-transduzierten 9L-Zellen (19%). Ebenso sind Zellen mit depolarisierten Mitochondrien bei U87-*cd*-Zellen (15%) nach 3-tägiger 5-FC-Behandlung häufiger festzustellen als bei 9L-*cd*-Zellen (11%). Die Apoptose-typischen DNA-Verluste (sub-G₁-Ereignisse) treten bei U87-Zelllinien (33-54%) etwas häufiger auf als bei den transduzierten 9L-Zelllinien (15-19%). Insgesamt kann eine generelle Zunahme dieser apoptotischen Merkmale im Verlauf der gentherapeutischen Behandlung festgestellt werden. Diese ist bei nicht transduzierten Zellen nicht festzustellen. Unbehandelte Zellen zeigen solche Merkmale ebenfalls nicht.

Zelllinie	Behandlung	Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub G ₁ [%]
9L	unbehandelt	0	90	2	3	6
	GCV	10	90	3	2	4
		100	89	5	4	10
		1000	81	18	7	29
	unbehandelt	0	93	2	2	3
	5-FC	100	90	2	2	4
		1000	92	4	3	8
3000		88	7	3	12	
9L- <i>tk</i>	unbehandelt	0	90	4	2	5
	GCV	10	65	30	11	20
		100	59	30	14	21
		1000	55	43	19	23
9L- <i>cd</i>	unbehandelt	0	90	4	2	4
	5-FC	100	83	16	7	13
		1000	79	17	13	13
		3000	74	21	17	14
U87	unbehandelt	0	94	1	2	3
	GCV	10	94	2	3	3
		100	95	6	4	5
		1000	88	18	13	21
	unbehandelt	0	94	1	3	3
	5-FC	100	91	2	2	2
		1000	91	2	2	2
3000		88	4	3	3	
U87- <i>tk</i>	unbehandelt	0	95	3	3	3
	GCV	10	80	27	32	59
		100	76	26	38	68
		1000	72	54	47	72
U87- <i>cd</i>	unbehandelt	0	89	8	8	6
	5-FC	100	82	18	10	16
		1000	71	31	15	28
		3000	67	36	19	35

Tab. 9: Auswirkung höherer Prometabolitenkonzentrationen auf die Vitalität, die Exposition von Phosphatidylserin (PS), das mitochondriale Transmembranpotential (MTP) und den DNA-Gehalt der Zellen nach 48 h Inkubation. Die Werte stellen gerundete Mittelwerte repräsentativer Versuchsreihen dar (Kap. II. B 2.2). Die Wiederholung dieser Versuchsreihen zeigte ähnliche Ergebnisse. Standardabweichungen und Erläuterung der Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 16 zu finden. Erklärung der gemessenen Parameter können der Tab. 7 entnommen werden.

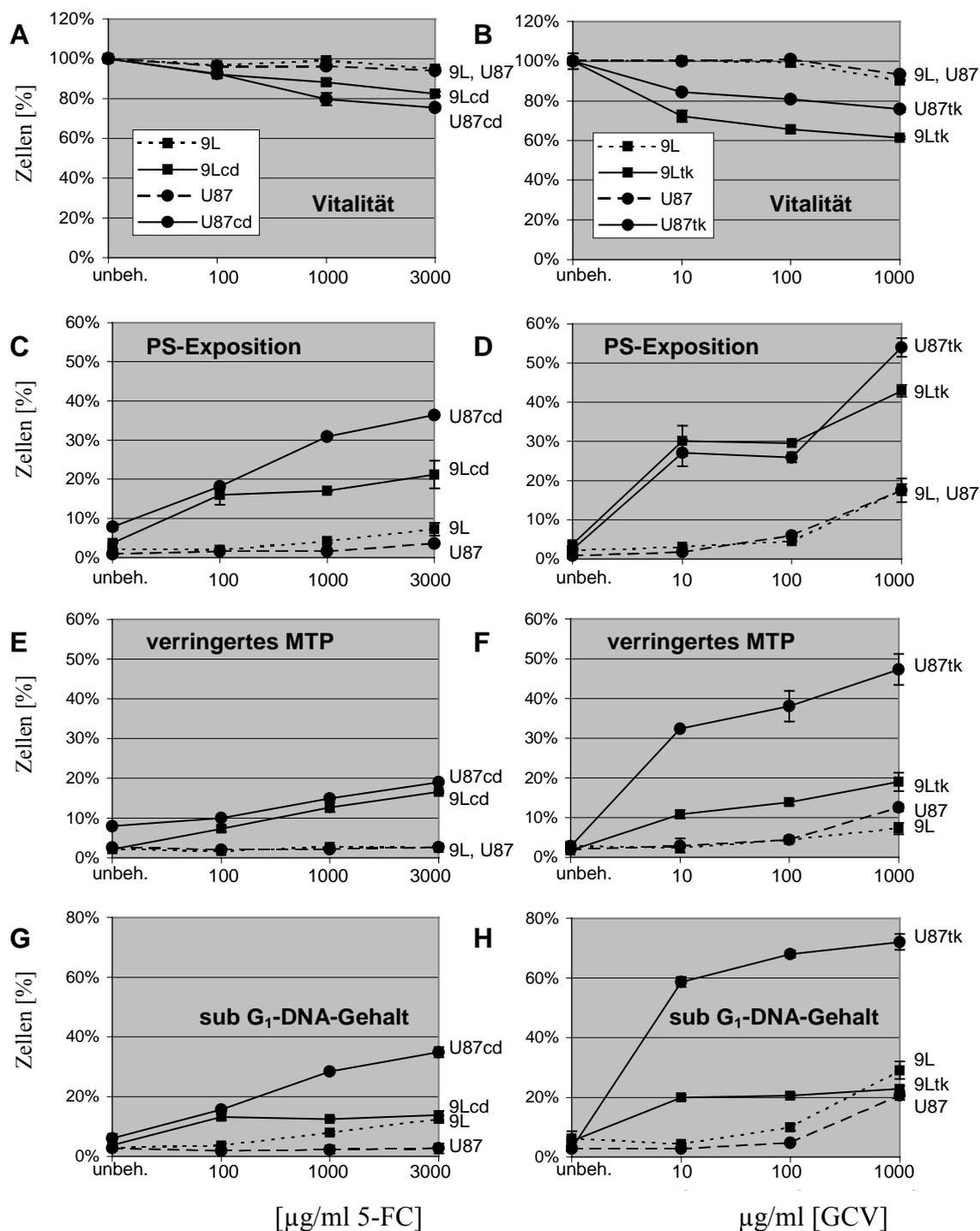


Abb. 19: Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen der Vitalität (A, B), der Phosphatidylserin (PS)-Exposition (C, D), des Rückgangs des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) (E, F) sowie des DNA-Verlustes (subdiploider DNA-Gehalt: G, H) der transduzierten und nicht transduzierten 9L- und U87-Zelllinien nach 48 h-Behandlung mit höheren Prodrug-Konzentrationen (10-1000 $\mu\text{g/ml}$ GCV bzw. 100-3000 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC) (s.a. Tab. 9). Erklärung der gemessenen Parameter s. Tab. 7. Höhere Prodrug-Konzentrationen bewirkten größere cytotoxische Effekte auf transduzierte Zellen und begannen auch nicht transduzierte Zellen zu schädigen. Der Rückgang der Vitalität der nicht transduzierten Zellen nach 2-tägiger Prodrug-Behandlung ist allerdings nicht deutlich: Nach Inkubation mit den höchsten eingesetzten GCV- bzw. 5-FC-Konzentrationen sind nur 5-6% weniger Zellen vital als bei den unbehandelten Vergleichsproben. Bei den transduzierten Zellen ist der zytotoxische Effekt dieser um den Faktor 30-100 höheren Prodrug-Konzentrationen nach 2 Tagen ebenfalls nicht

wesentlich größer: Nach einer solchen Behandlung sind nur 8-15% weniger Zellen vital als nach Inkubation mit den niedrigeren Standard-Dosierungen (10 µg/ml GCV bzw. 100 µg/ml 5-FC). (Die Vitalität der jeweiligen unbehandelten Zellen wurde hier als „100 %“-Bezugswert genommen.)

Das für apoptotische Zellen charakteristische Merkmal „PS-Exposition“ tritt bei den nicht transduzierten Zelllinien nicht nach Behandlung mit Standard-Prodrug-Konzentrationen auf. Nach Erhöhung der GCV-Konzentration um den Faktor 100 ist jedoch eine deutliche PS-Exposition bei jeweils 18% der vitalen 9L- und U87-Zellen zu detektieren. Nach Behandlung mit der höchsten untersuchten 5-FC-Konzentration (3 mg/ml) ist dies nach 2 Tagen kaum festzustellen (7%-PS-positive Zellen bei 9L, 4% bei U87). Wie in den vorhergehenden Untersuchungen zeigten die transduzierten Zelllinien bereits nach Behandlung mit der jeweiligen Standard-Konzentration der Prodrug PS-Exposition. Die Zahl der PS-exponierenden Zellen konnte durch die Anwendung höherer Konzentrationen jedoch weiter gesteigert werden.

Ein Rückgang des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) ist bei nicht transduzierten Zelllinien selbst nach Anwendung höherer Prodrug-Konzentrationen kaum festzustellen. Nur U87-Zellen zeigen nach Behandlung mit 1 mg/ml GCV einen Anteil von 13% vitaler Zellen mit niedrigem MTP. Bei den transduzierten Zelllinien zeigen alle Linien nach Behandlung eine Reduktion des MTPs. Dies ist bei U87-*tk*-Zellen am stärksten ausgeprägt (bis zu 47% vitale Zellen mit reduziertem MTP). Bei 9L-*tk*-, 9L-*cd*- und U87-*cd*-Zellen wiesen maximal 17-19% der Zellen depolarisierte Mitochondrien auf.

Die Apoptose-typischen DNA-Verluste (Sub-G₁-Ereignisse) treten auch bei den nicht transduzierten Zelllinien nach 2-tägiger Behandlung mit 1 mg/ml GCV (29% bei 9L, 21% bei U87) sowie bei 9L-Zellen nach Behandlung mit 3 mg/ml 5-FC (12%) auf. Die transduzierten Zelllinien zeigen bereits unter den Standard-Dosierungen einen deutlichen Anteil von Zellen mit verringertem DNA-Gehalt (13-59%). Dieser ließ sich nur bei den U87-abgeleiteten Zelllinien durch eine Steigerung der Prodrug-Konzentrationen weiter erhöhen.

4. Untersuchungen zur DNA-Degradierung

Ein typisches Merkmal für apoptotischen Zelltod ist der zielgerichtete Abbau der zellulären DNA. Dabei beginnt zunächst das Chromatin zu kondensieren, die DNA wird zerstückelt und der Nukleus aufgelöst. Diese Prozesse sind innerhalb der Zelle auf die Aktivierung von Caspasen und spezifischen Endonukleasen zurückzuführen. Caspase 3 ist durch gezieltes Zerschneiden von Bestandteilen der Kernmembran (Lamine) beteiligt an deren Abbau. Spezifische Faktoren (z.B. „Acinus“, Sahara et al. 1999) und Endonukleasen (z. B. „CAD“, Enari et al. 1998) werden durch Mitglieder der Caspase-Familie aktiviert und bewirken die DNA-Zerstückelung. Zunächst wird die DNA in größere Fragmente bis zu 50 kB zerschnitten. Andere Endonukleasen schneiden DNA an den zwischen den Nukleosomen liegenden Sequenzen, wodurch Fragmente von 180-200 bp sowie Vielfache hiervon entstehen. Diese zeigen aufgetragen auf ein Agarosegel das als „DNA-Leiter“ beschriebene Erscheinungsbild, welches typischerweise mit apoptotischem Zelltod assoziiert ist (Wyllie 1980).

Klassische Methoden zum Nachweis dieser DNA-Zerschneidung sind der „TUNEL“-Test und die Agarosegelelektrophorese isolierter DNA.

4.1 Nachweis von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Test

Für die Nachweisreaktion wird die Eigenschaft der terminalen Desoxynukleotidyltransferase („TdT“) genutzt, freie Nukleotidtriphosphate Matrizen-unabhängig an freie 3‘OH-Enden von DNA zu synthetisieren. Aceton-fixierte Zellpräparate wurden hier mit TdT und Fluorescein-markiertem dUTP inkubiert, was zum Einbau von fluoreszierendem dUTP an freie 3‘OH-Enden führt. Dieses wurde mit einem anti-dUTP-Antikörper (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) detektiert, anschließend mit Substrat (Fast-Red) entwickelt und lichtmikroskopisch untersucht. Bei Vorhandensein einer großen Zahl von DNA-Brüchen erhält man eine deutliche nukleäre Färbung (Abb. 20).

9L- und U87-Zelllinien (transduzierte und nicht transduzierte) wurden in 6-Well-Platten auf sterile Deckgläschen ausgesät und nach 24 h für jeweils 48 bzw. 72 h mit Prodrug behandelt oder unbehandelt gelassen. Bei den genterapeutisch behandelten Zellen konnte in situ nach Anwendung des TUNEL-Nachweises eine deutliche nukleäre Färbung detektiert werden. Diese schien bei 9L-*cd*-Zellen ausgeprägter zu sein als bei 9L-*tk*-Zellen. Ein ähnliches Signal zeigte sich nicht bei den unbehandelten Zellen, bei behandelten, nicht transduzierten Zellen oder bei mit irrelevanten Prodrugs behandelten, transduzierten Zellen. Die Abwesenheit der TdT im Inkubationspuffer führte zu einem Verlust des positiven Signals bei den genterapeutisch behandelten Zellen.

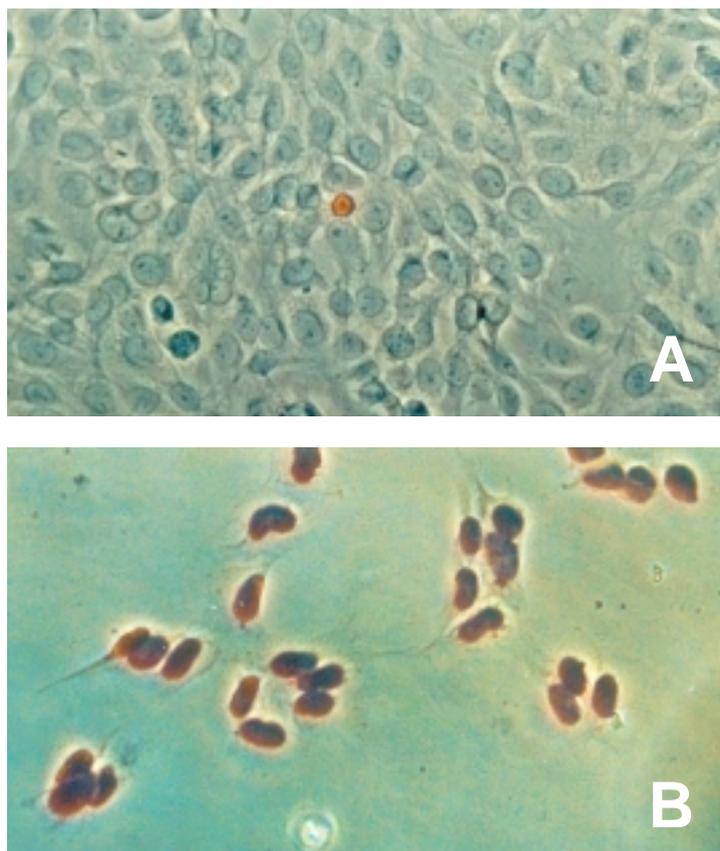


Abb. 20: 9L-*cd*-Zellen zeigten nach Behandlung mit 5-FC DNA-Fragmentierung im TUNEL-Test. Mikroskopische Aufnahmen von Aceton-fixierten unbehandelten (A) und mit 5-FC (48 h, 100 µg/ml) behandelten 9L-*cd*-Zellpräparaten (B) nach TUNEL-Test. Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) katalysiert die kovalente Bindung von Fluorescein-markiertem dUTP an freie 3'-OH-DNA-Enden. Für die lichtmikroskopische Analyse wurde eingebautes Fluorescein-dUTP mittels anti-Fluorescein-Antikörper (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) und Fast Red-Substrat detektiert. DNA-Strangbrüche liessen sich nur in mit 5-FC behandelten (B), nicht aber in unbehandelten 9L-*cd*-Zellen (A) in Form eines nukleär lokalisierten roten Niederschlags nachweisen.

4.2 „DNA-Laddering“

Mittels konventioneller DNA-Isolierung war es nicht möglich, das DNA-Laddering in apoptotischen Zellen eindeutig darzustellen (Abb. 21 B). Auf diese Weise war es lediglich möglich, zwischen undegradierten und degradierten DNA-Proben zu unterscheiden. Ein Leitermuster war nur schwach zu erkennen und nekrotische unspezifische Degradation nicht auszuschließen. Nach Verwendung einer spezifischen (Ligase-medierten) PCR zur Signalverstärkung konnten auch kleinste Ladder-Fragmente deutlich gezeigt werden (Abb. 21 A). Durch die Ligation von Adapteroligomeren an freie 3'-OH-Enden der DNA und anschließende Verwendung dieser Oligomere als Primer in einer PCR-Reaktion konnten diese Fragmente gezielt amplifiziert werden. Nach zweitägiger genterapeutischer Behandlung zeigten 9L-*cd*, 9L-*tk*, U87-*cd* und U87-*tk* mit Hilfe dieses PCR-Nachweisverfahrens deutliche Leitermuster. Diese blieben aus, wenn die Zellen nicht oder mit irrelevanten Prometaboliten behandelt wurden. Nicht transduzierte Zellen zeigten ein solches Leiternmuster nicht. Übliche PCR-Negativ-Kontrollen (Amplifizierung von Proben ohne zugesetzte DNA) zeigten keine DNA-Leiter-Amplifizierung. Dies zeigt, daß zumindest ein Teil der Zellen apoptotisch stirbt und daß hierbei die spezifische Zerschneidung der DNA in 180-200bp-große Fragmente auftritt.

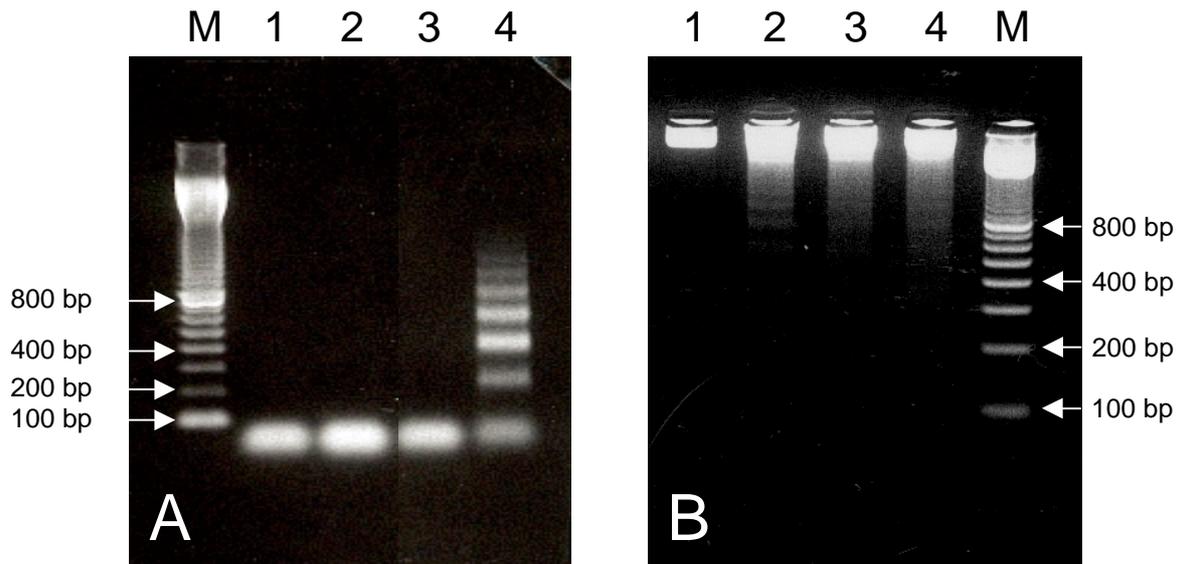


Abb. 21: DNA-Degradierung bei 9L-Zellen nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie.

Nachweis der Spaltung chromosomaler DNA in 180-200bp-Fragmente und -Multimere: (B) mittels konventioneller Methodik (Zellyse, ProteinaseK-Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion, Isopropanol-Fällung der DNA, RNase-Verdau und Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989)) und (A) mittels Ligase-mediierter PCR und Gelelektrophorese (Clontech) (Kap. II. B 7.).

Nach konventioneller Methodik (B) war die DNA-Leiter nur schwach zu detektieren. Dargestellt sind isolierte DNA-Proben von unbehandelten (1) und behandelten 9L-*tk*-Zellen (24-72 h = 2-4, s.u.). Die unbehandelte DNA-Probe zeigte keine sichtbare Degradierung. Die behandelten Proben wiesen Zeichen von Degradierung und ein schwach sichtbares, leiterartiges Muster auf (2). Nach Signalverstärkung durch Anwendung einer Ligase-vermittelten PCR zur selektiven Amplifizierung kleiner, durch Strangbrüche entstandener DNA-Fragmente war die Ausbildung der Apoptose-typischen DNA-Leiter bei 9L-*tk*-Zellen nach Behandlung mit GCV (48 h, 10 µg/ml) deutlich nachzuweisen (A, 4). Unbehandelte Zellen (3) bzw. nicht transduzierte Zellen (9L, behandelt (2) oder unbehandelt (1)) zeigten ein solches Muster nicht.

In (A): (M) 100bp-Molekulargewichtsmarker

- (1) 9L unbehandelt,
- (2) 9L + 10µg/ml GCV,
- (3) 9L-*tk* unbehandelt,
- (4) 9L-*tk* + 10µg/ml GCV.

Alle Proben nach 48 h Kultur.

In (B): (1) 9L-*tk* unbehandelt, 72 h,

- (2) 9L-*tk* + 10µg/ml GCV, 24 h,
- (3) 9L-*tk* + 10µg/ml GCV, 48 h,
- (4) 9L-*tk* + 10µg/ml GCV, 72 h,
- (M) 100bp-Molekulargewichtsmarker (Gibco BRL).

5. Zellzyklusanalysen

Zunächst wurden Generationszeit und Dauer der Zellzyklusphasen sowohl für die transduzierten als auch für die nicht transduzierten Zelllinien während des Wachstums in Normalmedium bestimmt (Kap. II. B 3.1). Aufgrund der zufälligen Integration einer oder mehrerer Kopien der transfizierten Plasmide in das Genom der Zielzelle kann es neben der Expression des transferierten Gens auch zu weiteren Veränderungen der zellulären Genexpression kommen. Die Expression von Genen kann u.a. artifiziell aktiviert oder reprimiert werden. In Abhängigkeit von der Funktion der betroffenen Gene können sich hierdurch Phänotypen ergeben, welche von dem der nicht transduzierten Ausgangszelle abweichen. Ein Vergleich der Zellmorphologie zeigte in keiner der transfizierten Zelllinien eine signifikante Veränderung. Neben der Zellmorphologie ist das Zellwachstum ein relevanter Indikator. Zellwachstum und -zyklus wurden außerdem untersucht, um in späteren Analysen den Einfluß von Suizidgentherapie und Actinomycin D-Behandlung auf diese Parameter beurteilen zu können. Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen der transduzierten und nicht transduzierten Zelllinien faßt Tab. 10 zusammen:

Zelllinie	Generationszeit	Zellzyklusphasen		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
U87	13,1 h (± 1,1)	7,7 h (± 1,2)	3,8 h (± 0,7)	1,6 h (± 0,5)
U87- <i>tk</i>	14,9 h (± 2,2)	8,4 h (± 1,6)	4,6 h (± 1,0)	1,9 h (± 0,6)
U87- <i>cd</i>	20,9 h (± 4,0)	12,4 h (± 3,1)	5,9 h (± 2,1)	2,6 h (± 1,4)
9L	15,3 h (± 0,1)	7,2 h (± 0,3)	6,1 h (± 0,4)	1,9 h (± 0,3)
9L- <i>tk</i>	18,4 h (± 1,9)	7,8 h (± 1,2)	8,0 h (± 1,2)	2,7 h (± 0,5)
9L- <i>cd</i>	12,9 h (± 1,3)	6,1 h (± 0,9)	5,2 h (± 0,8)	1,6 h (± 0,4)

Tab. 10: Die Generationszeit gibt denjenigen Zeitraum an, welcher für eine Verdoppelung der Zellzahl der betreffenden Zelllinie während der exponentiellen Wachstumsphase nötig ist. Bestimmt wurde sie durch Zellzählungen in 24 h Intervallen. Die Werte sind Mittelwerte einer von zweien, in Triplikaten vorgenommenen Meßreihe, die Standardabweichung ist in Klammern angegeben (Kap. II. B 3.1). Die Zellzyklusphasenverteilung wurde durchflußzytometrisch ermittelt (Kap. II. B 4.2). Anhand des prozentualen Auftretens der einzelnen Phasen konnte auf die Dauer der jeweiligen Zyklusphase zurückgeschlossen werden. Diese Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und wiederholt. Dargestellt ist eine repräsentative Messung mit Standardabweichung.

Alle untersuchten Zelllinien besitzen kurze Generationsphasen. Eine Generationszeit betrug zwischen 13 und 21 h, d.h. zur Verdoppelung der Population benötigten diese Zelllinien weniger als einen Tag. Innerhalb der 9L-Zelllinien wichen die Werte für die Generationszeit sowie die Zellzyklusphasen kaum voneinander ab, lediglich die 9L-*tk*-Zelllinien wuchs etwas langsamer und benötigte vor allem für die Vollendung der S-Phase 2-3 h länger als 9L- bzw. 9L-*cd*-Zellen. Innerhalb der U87-Zelllinien verhielten sich U87 und U87-*tk* relativ ähnlich. U87-*cd*-Zellen wiesen jedoch eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf. Das scheint vor allem an einem höheren Anteil von Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zyklus zu liegen. S- und G₂/M-Phase sind hier jeweils nur etwa 2 h länger als bei parentalen U87-Zellen und nur 1,3 bzw. 0,7 h länger als bei U87-*tk*-Zellen. Vermutlich verblieb ein größerer Teil der Zellen länger in der G₀-, der Ruhe-Phase des Zyklus. Trotzdem war auch bei dieser Zelllinie die proliferative Aktivität noch so hoch, daß man nicht von einer wesentlichen Veränderung des Wachstumsverhaltens nach Transfektion sprechen kann.

9L-*tk*-Zellen arretierten nach Behandlung mit GCV (10 µg/ml) in der S-Phase des Zellzyklus (Abb. 22). Dieser Arrest trat bereits nach 24 h auf und umfaßte nahezu alle Zellen. Dies änderte sich über den gesamten Behandlungszeitraum von 3 Tagen nicht mehr (Tab. 11). Ein solcher S-Phase-Arrest zeigte sich nicht bei unbehandelten 9L-*tk*-Zellen. Bei den nicht transduzierten 9L-Zellen war nach GCV-Behandlung lediglich eine leichte Erhöhung des Anteils von Zellen in der S-Phase festzustellen (Abb. 22, Tab. 11), welcher an Tag 3 wieder rückläufig war. Erst eine Erhöhung der GCV-Dosierung zeigte, daß 9L-Zellen

ähnlich wie die transduzierten 9L-*tk*-Zellen reagieren (Tab. 12), und daß lediglich die effektive Dosis um den Faktor >100 höher liegt als bei stabil mit HSV-*tk* transduzierten Zellen: Bei Behandlung mit 10 µg/ml GCV waren an Tag 2 11% mehr 9L-Zellen in der S-Phase als bei unbehandelten 9L-Zellen. Nach Erhöhung der Dosierung auf 100 µg/ml waren es 23% und bei einer weiteren Dosiserhöhung auf 1000 µg/ml waren auch die nicht transduzierten 9L-Zellen überwiegend in der S-Phase nachzuweisen.

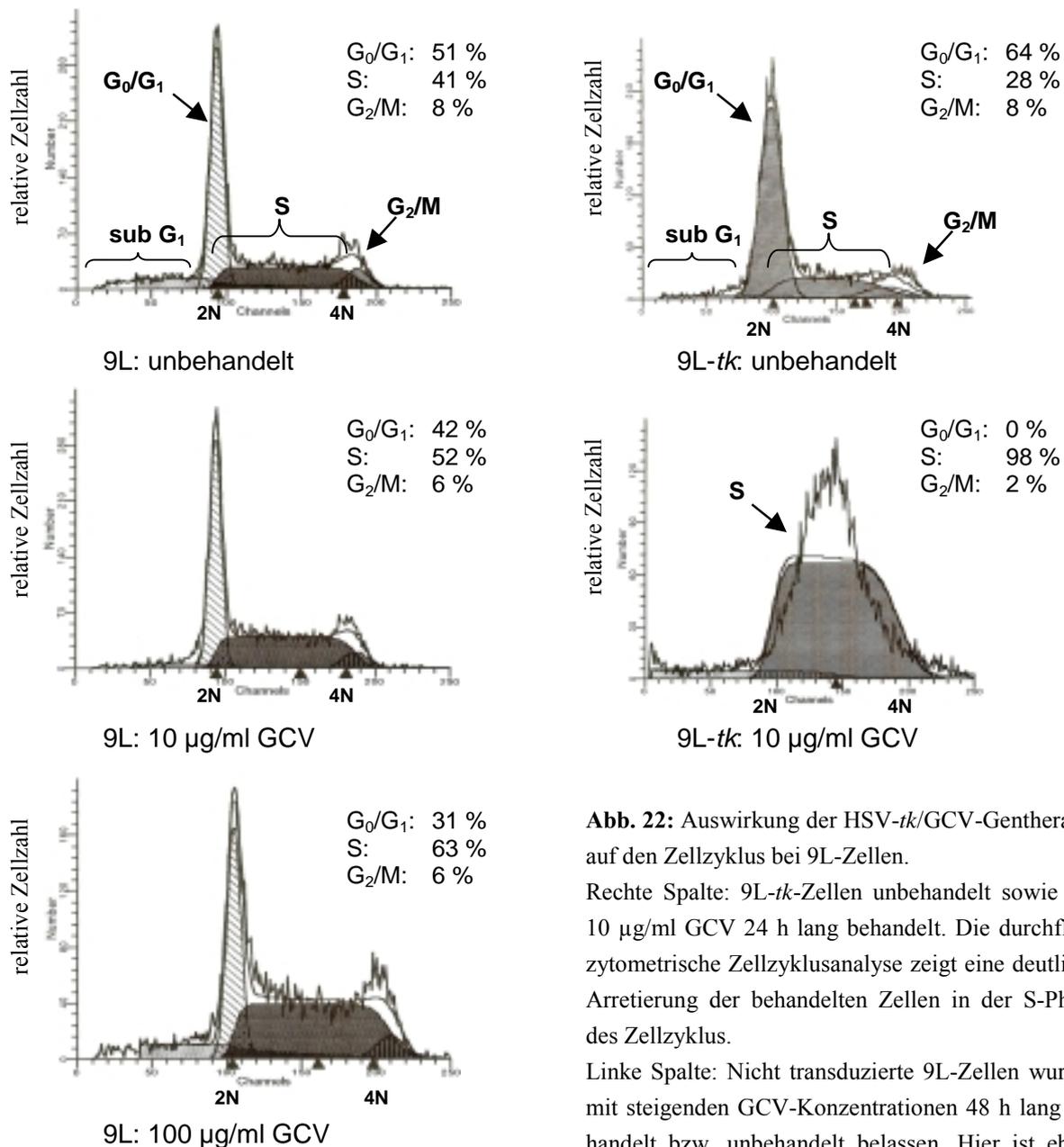


Abb. 22: Auswirkung der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie auf den Zellzyklus bei 9L-Zellen.

Rechte Spalte: 9L-*tk*-Zellen unbehandelt sowie mit 10 µg/ml GCV 24 h lang behandelt. Die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse zeigt eine deutliche Arretierung der behandelten Zellen in der S-Phase des Zellzyklus.

Linke Spalte: Nicht transduzierte 9L-Zellen wurden mit steigenden GCV-Konzentrationen 48 h lang behandelt bzw. unbehandelt belassen. Hier ist ebenfalls eine zunehmende Akkumulation von Zellen in der S-Phase nach GCV-Behandlung zu sehen.

Diese ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei transduzierten Zellen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Meßreihe in Duplikaten. Die Wiederholung dieser Versuchsreihe zeigte ähnliche Ergebnisse. Erläuterungen der Art der Abbildung sowie der Abkürzungen können der Abb. 15 entnommen werden.

U87-*tk*-Zellen zeigten nach 24 h GCV-Inkubation in der Standarddosierung von 10 µg/ml ebenso wie 9L-*tk*-Zellen einen S-Phase-Arrest (Abb. 22, Tab. 11). Dieser betraf jedoch nicht 100% der Zellen (wie bei 9L-*tk* zu sehen war), sondern nur 69%. Im Vergleich zu 9L-*tk*-Zellen fiel auf, daß diese S-Phase-Zellen an Tag 2 der Behandlung kaum noch zu detektieren waren. Im Gegensatz zum 9L-Modell war an Tag 1 noch ein relativ großer Anteil von G₀/G₁-Zellen (31%) zu detektieren. Die nicht transduzierten U87-Zellen zeigten nach 2-tägiger Behandlung mit der Standarddosierung von 10 µg/ml GCV nur eine leichte Erhöhung des Zellanteils in der S-Phase (11% mehr gegenüber der unbehandelten Kontrolle) (Abb. 22, Tab. 11). Erst bei einer Erhöhung der Prodrug-Konzentration (Tab. 12) auf 100 µg/ml bzw. 1000 µg/ml GCV wurde auch hier ein S-Phase-Arrest deutlich (24% bzw. 46% mehr Zellen in der S-Phase als in der unbehandelten Kontrolle). Erhöhung der GCV-Konzentration um den Faktor 10 führte bei U87-*tk*-Zellen zur fast vollständigen Auflösung der Zellzyklusverteilung: nur noch 10% der Zellen befanden sich in der G₁/G₀-Phase. Bei weiterer Dosiserhöhung ließ sich auch der G₁/G₀-Peak nicht mehr zweifelsfrei identifizieren, die Zellen waren vollständig apoptotisch, wie die Analyse der Sub-G₁-Ereignisse (Tab. 9) nahelegt.

Bei der *E.coli-cd/5-FC*-Gentherapie zeigten sowohl U87-*cd*- als auch 9L-*cd*-Zellen (Abb. 23, Tab. 11) einen - allerdings gering ausgeprägten - G₁/G₀-Phasenarrest (etwa 5-10%) an Tag 1 der Behandlung. An Tag 2 der Behandlung war dieser nicht mehr festzustellen, der Anteil der Zellen in dieser Zyklusphase war sogar rückläufig. Stattdessen akkumulierten die Zellen in der S-Phase. Dieser S-Phase-Arrest wurde nur bei U87-*cd*-Zellen, nicht jedoch bei 9L-*cd*-Zellen deutlicher nach Behandlung mit höheren Prodrug-Konzentrationen (bis zu 3 mg/ml 5-FC) (Abb. 24, Tab. 12).

Der Zellzyklus nicht transduzierter U87-Zellen blieb auch bei Behandlung mit 3 mg/ml 5-FC nach 2 Tagen noch unverändert (Abb. 24). 9L-Zellen reagierten ab einer Konzentration von 1 mg/ml 5-FC nach 2 Tagen mit einer deutlichen Akkumulation der Zellen in der S-Phase: In unbehandelten Proben befanden sich 44% der Zellen in der S-Phase-Zellen, nach 5-FC-Behandlung 65% (Abb. 23).

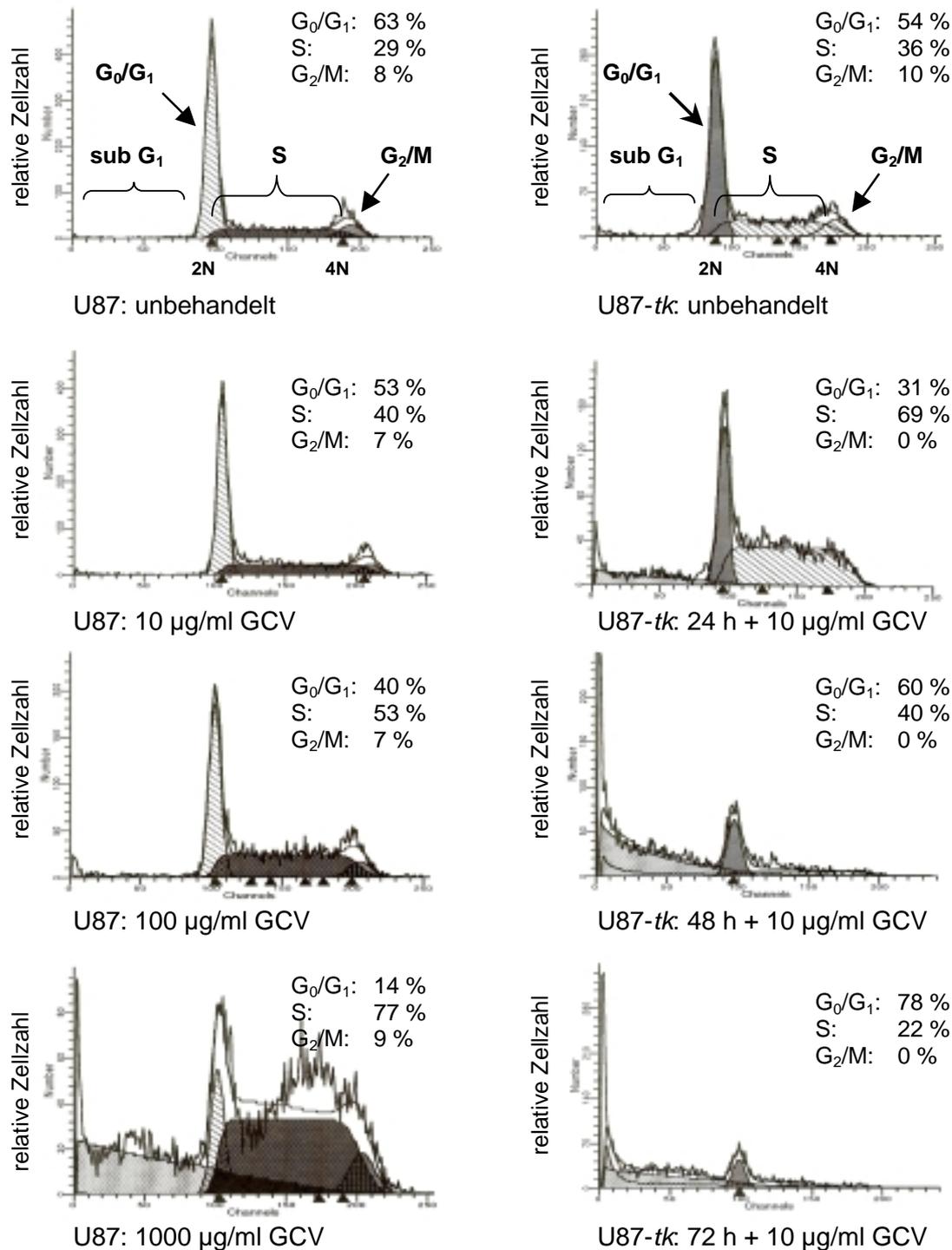


Abb. 23: Auswirkung der HSV-tk/GCV-Gentherapie auf den Zellzyklus bei U87-Zellen. Linke Spalte: U87-Zellen unbehandelt sowie 48 h lang mit steigenden GCV-Konzentrationen (10-1000 µg/ml) behandelt. Die durchflußzytometrische Zyklusanalyse zeigt eine Arretierung der behandelten Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, welche deutlicher wird, je höher die GCV-Konzentration ist. Nach Behandlung mit 1000 µg/ml GCV befinden sich außerdem 1/3 der gemessenen Ereignisse im Sub-G₁-Bereich, ein typisches Merkmal apoptotischer Zellen. Rechte Spalte: U87-tk-Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 10 µg/ml GCV behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Es zeigt sich eine deutliche Akkumulation der Zellen in der S-Phase nach 24 h. An den Folgetagen ist diese nicht mehr nachzuweisen. Ab Tag 1 der Behandlung nimmt der Anteil apoptotischer Zellen (= sub G₀/G₁) im Zyklusprofil zu. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Meßreihe in Duplikaten. Erläuterungen der Art der Abbildung sowie der Abkürzungen können der Abb. 15 entnommen werden.

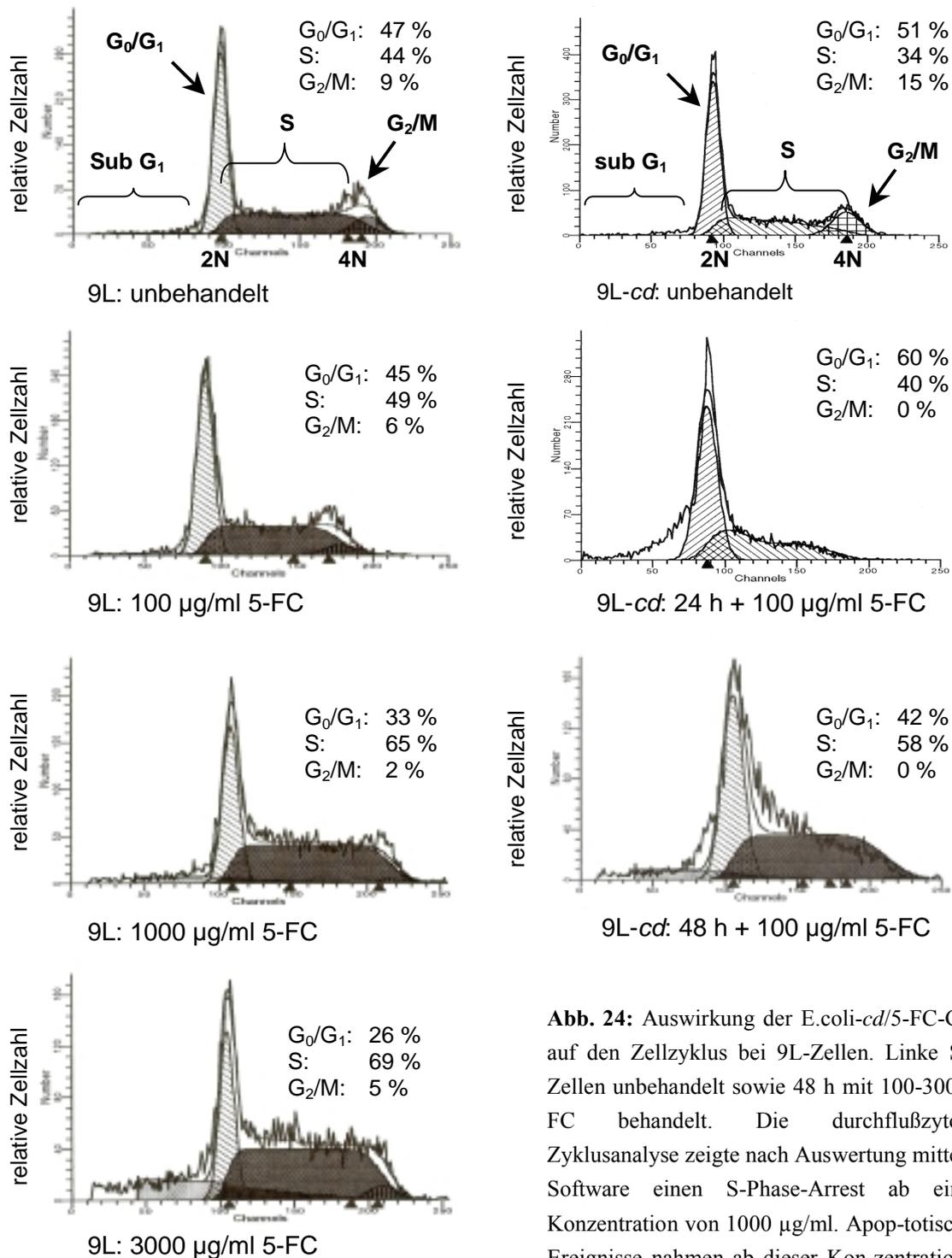


Abb. 24: Auswirkung der *E.coli-cd*/5-FC-Gentherapie auf den Zellzyklus bei 9L-Zellen. Linke Spalte: 9L-Zellen unbehandelt sowie 48 h mit 100-3000 µg/ml 5-FC behandelt. Die durchflußzyto-metrische Zyklusanalyse zeigte nach Auswertung mittels ModFit-Software einen S-Phase-Arrest ab einer 5-FC-Konzentration von 1000 µg/ml. Apoptotische Sub-G₁-Ereignisse nahmen ab dieser Konzentration ebenfalls zu.

Rechte Spalte: 9L-cd-Zellen wurden mit 100 µg/ml 5-FC behandelt bzw. unbehandelt gelassen und nach 24 und 48 h analysiert. Nach 24 h nahm zunächst der G₀/G₁-Anteil zu, nach 48 h war dieser rückläufig und die Zellen akkumulierten zunehmend in der S-Phase. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Meßreihe in Duplikaten. Erläuterungen der Art der Abbildung sowie der Abkürzungen können der Abb. 15 entnommen werden.

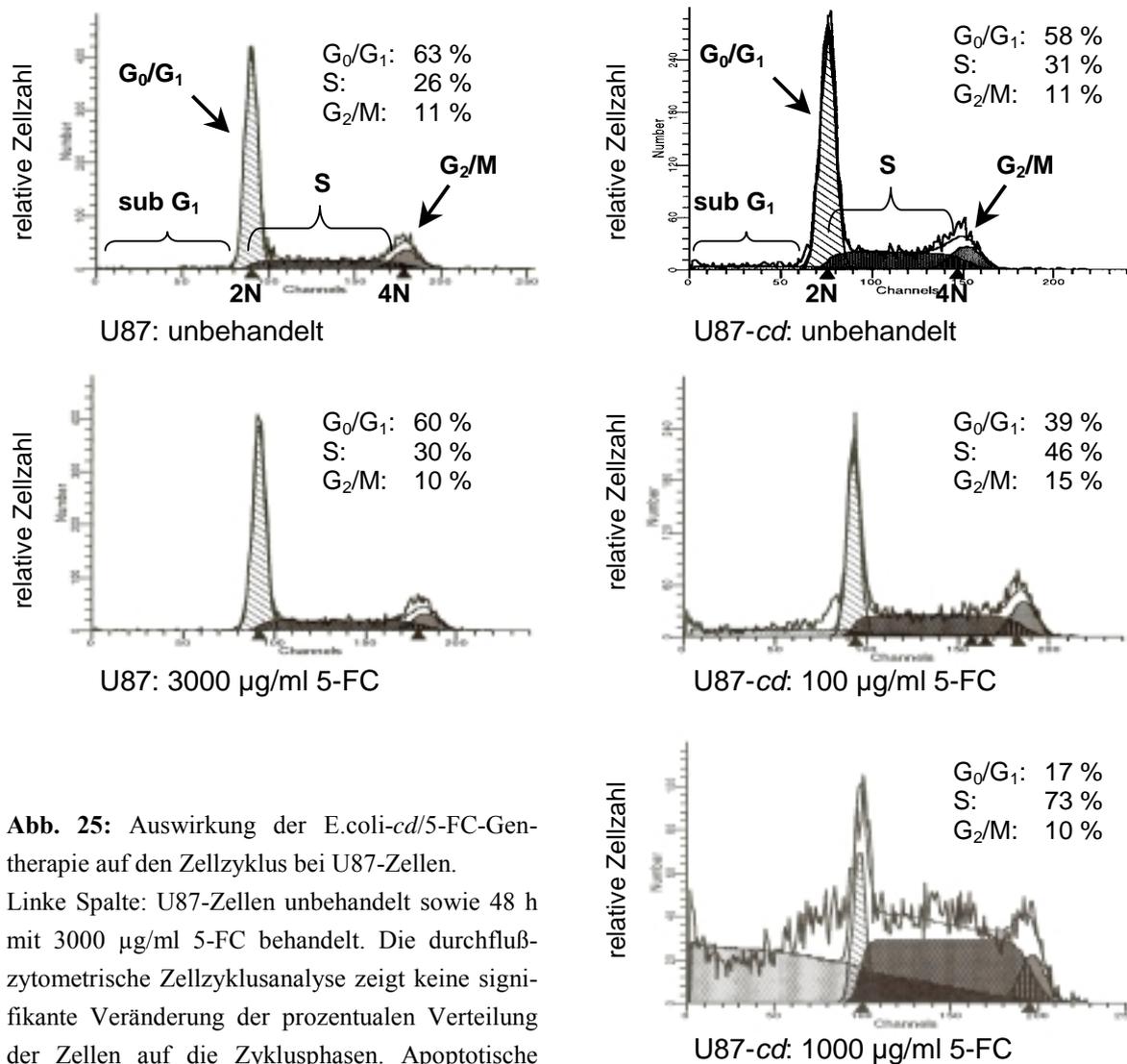


Abb. 25: Auswirkung der E.coli-cd/5-FC-Gentherapie auf den Zellzyklus bei U87-Zellen.

Linke Spalte: U87-Zellen unbehandelt sowie 48 h mit 3000 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC behandelt. Die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse zeigt keine signifikante Veränderung der prozentualen Verteilung der Zellen auf die Zyklusphasen. Apoptotische Sub- G_1 -Zellen sind nicht nachzuweisen.

Rechte Spalte: U87-cd-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden 5-FC-Konzentrationen behandelt bzw. unbehandelt belassen. Die Zyklusanalyse zeigte, daß es nach 48 h bereits bei 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC zu einer deutlichen Akkumulation von Zellen in der S-Phase kommt. Durch Inkubation mit höheren Dosierungen der „Prodrug“ wird diese Tendenz verstärkt. Auch die Zahl der apoptotischen Sub- G_1 -Ereignisse nimmt deutlich zu. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse einer Meßreihe in Duplikaten. Erläuterungen der Art der Abbildung sowie der Abkürzungen können der Abb. 15 entnommen werden.

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	GCV [10 µg/ml]		
			Tag 1	Tag 2	Tag 3
9L	G ₀ /G ₁	48 %	49 %	44 %	42 %
	S	47 %	47 %	56 %	50 %
	G ₂ /M	5 %	4 %	0 %	8 %
9L- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	64 %	0 %	0 %	na
	S	28 %	98 %	100 %	na
	G ₂ /M	8 %	2 %	0 %	na
U87	G ₀ /G ₁	63 %	54 %	53 %	47 %
	S	29 %	38 %	40 %	45 %
	G ₂ /M	8 %	8 %	6 %	7 %
U87- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	54 %	31 %	60 %	78 %
	S	36 %	69 %	40 %	22 %
	G ₂ /M	10%	0 %	0 %	0 %

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	5-FC [100 µg/ml]		
			Tag 1	Tag 2	Tag 3
9L	G ₀ /G ₁	55 %	54 %	54 %	55 %
	S	36 %	29 %	33 %	30 %
	G ₂ /M	9 %	17 %	13 %	15 %
9L- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	51 %	60 %	42 %	39 %
	S	34 %	40 %	58 %	58 %
	G ₂ /M	15 %	0 %	0%	3 %
U87	G ₀ /G ₁	61 %	59 %	59 %	59 %
	S	29 %	30 %	28 %	27 %
	G ₂ /M	10 %	11 %	13 %	14 %
U87- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	64 %	37 %	34 %	40 %
	S	24 %	49 %	48 %	29 %
	G ₂ /M	12 %	14 %	18 %	31 %

Tab. 11: Messung der Anteile der Zellzyklusphasen (in %) von 9L- und U87-Zelllinien während der Behandlung mit GCV bzw. 5-FC über einen Zeitraum von 3 Tagen im Vergleich zu unbehandelten („unbeh.“) Zellproben. Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase in Bezug zur Gesamtzahl der Zellen in diesen Phasen zusammengenommen (=100%). Wiedergegeben sind Ergebnisse repräsentativer Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden und nach Wiederholung vergleichbare Ergebnisse zeigten. Die Auswertung erfolgte mittels ModFit-Software. („na“, nicht auswertbar).

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	GCV [$\mu\text{g/ml}$]		
			10	100	1000
9L	G ₀ /G ₁	51 %	42 %	31 %	38 %
	S	41 %	52 %	63 %	61 %
	G ₂ /M	8 %	6 %	6 %	1 %
9L- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	50 %	0 %	31 %	na
	S	37 %	98 %	62 %	na
	G ₂ /M	13 %	2 %	7 %	na
U87	G ₀ /G ₁	63 %	53 %	40 %	14 %
	S	29 %	40 %	53 %	77 %
	G ₂ /M	8 %	7 %	7 %	9 %
U87- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	60 %	41 %	na	na
	S	35 %	52 %	na	na
	G ₂ /M	6 %	7 %	na	na

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	5-FC [$\mu\text{g/ml}$]		
			100	1000	3000
9L	G ₀ /G ₁	47 %	45 %	33 %	26 %
	S	44 %	49 %	65 %	69 %
	G ₂ /M	9 %	6 %	2 %	5 %
9L- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	49 %	41 %	42 %	39 %
	S	42 %	59 %	58 %	54 %
	G ₂ /M	9 %	0 %	0 %	7 %
U87	G ₀ /G ₁	63 %	61 %	62 %	60 %
	S	26 %	28 %	29 %	30 %
	G ₂ /M	11 %	11 %	10 %	10 %
U87- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	58 %	39 %	17 %	20 %
	S	31 %	46 %	73 %	72 %
	G ₂ /M	11 %	15 %	10 %	8 %

Tab. 12: Messung der Anteile der Zellzyklusphasen (in %) von 9L- und U87-Zelllinien während der Behandlung mit steigenden Prodrug-Konzentrationen nach 2 Tagen im Vergleich zu unbehandelten („unbeh.“) Zellproben. Es wurden 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ GCV bzw. 100-3000 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC eingesetzt. Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase in Bezug zur Gesamtzahl der Zellen in diesen Phasen zusammengekommen (=100%). Wiedergegeben sind Ergebnisse repräsentativer Messungen, die in Duplikaten durchgeführt wurden und nach Wiederholung vergleichbare Ergebnisse zeigten. Die Auswertung erfolgte mittels ModFit-Software. („na“, nicht auswertbar).

Actinomycin D induzierte bei den U87-Zelllinien in gering toxischen Dosierungen (bis zu einer Konzentration von 0,01 µg/ml und 24 h Inkubation) einen G₀/G₁-Arrest (Abb. 25, Tab. 13). Ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml ließ sich ineinander übergehend eine Akkumulation in der S- und der G₂/M-Phase nachweisen.

Ähnlich verhielt es sich bei den 9L-Zelllinien (Abb. 25, Tab. 13): Bei geringer Actinomycin D-Konzentration (bis 0,01 µg/ml) zeigte sich eine Arrettierung in der G₀/G₁-Phase. Diese war allerdings wesentlich geringer ausgeprägt als bei den U87-Zelllinien. Bei höheren Konzentrationen (ab 0,1 µg/ml) zeigte sich eine Akkumulation der Zellen in der G₂/M-Phase: 9L wiesen 10% mehr Zellen in G₂/M-Phase auf verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, 9L-*tk* 10-15% und 9L-*cd* 15%.

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	ActoD [µg/ml]			
			0,001	0,01	0,1	1
9L	G ₀ /G ₁	48,5 %	55 %	38,3 %	46,6 %	54,5 %
	S	38,5 %	34,8 %	45,1 %	33,6 %	26,1 %
	G ₂ /M	13,1 %	12,6 %	16,6 %	19,8 %	25,1 %
9L- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	44 %	48,4 %	35,1 %	36,1 %	41,6 %
	S	42,1 %	38,7 %	49,3 %	44,4 %	30,5 %
	G ₂ /M	14 %	12,9 %	15,6 %	23,8 %	28 %
9L- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	44,9 %	56,5 %	35,6 %	44,1 %	39,9 %
	S	41,7 %	33,8 %	48,2 %	36,2 %	33,9 %
	G ₂ /M	13,4 %	9,7 %	16,2 %	19,7 %	26,2 %
U87	G ₀ /G ₁	56,9 %	95,1 %	65,9 %	na	na
	S	29,5 %	3,2 %	15,5 %	na	na
	G ₂ /M	13,6 %	1,7 %	18,7 %	na	na
U87- <i>tk</i>	G ₀ /G ₁	54,4 %	76,2 %	40,9 %	na	na
	S	30,7 %	8,3 %	41,6 %	na	na
	G ₂ /M	15 %	15,5 %	17,4 %	na	na
U87- <i>cd</i>	G ₀ /G ₁	57,3 %	75,7 %	31,6 %	50,6 %	65,5 %
	S	25,2 %	14 %	48,4 %	14,3 %	0 %
	G ₂ /M	17,4 %	10,3 %	20 %	35,2 %	34,5 %

Tab. 13: Messung der Anteile der Zellzyklusphasen (in %) von 9L- und U87-Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Actinomycin D-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten („unbeh.“) Zellproben. Dargestellt sind Mittelwerte (von Duplikaten) einer Meßreihe. In der Wiederholung wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase in Bezug zur Gesamtzahl der Zellen in diesen Phasen zusammengenommen (=100%). Die Auswertung erfolgte mittels ModFit-Software. („na“, nicht auswertbar)

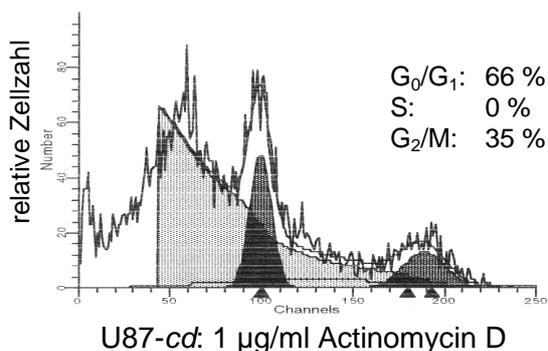
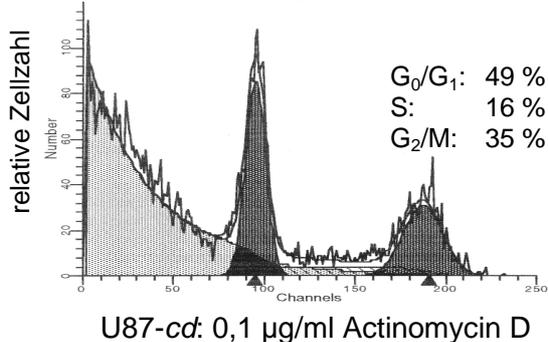
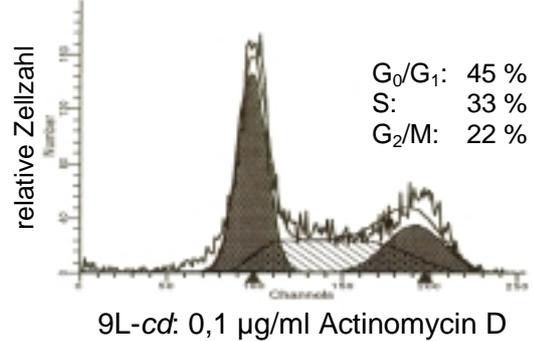
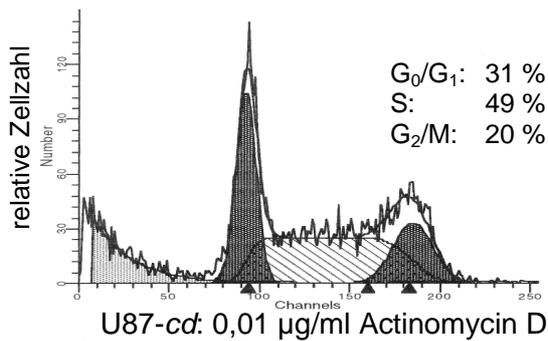
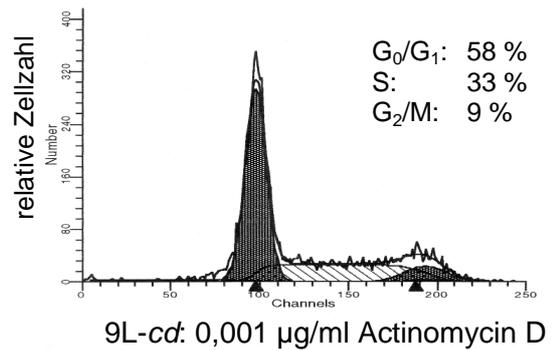
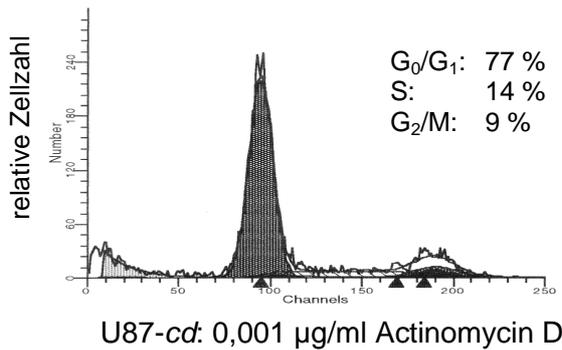
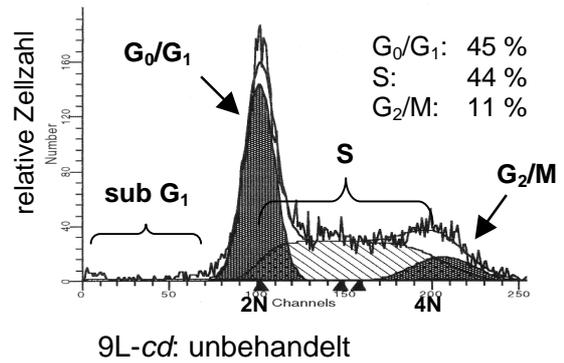
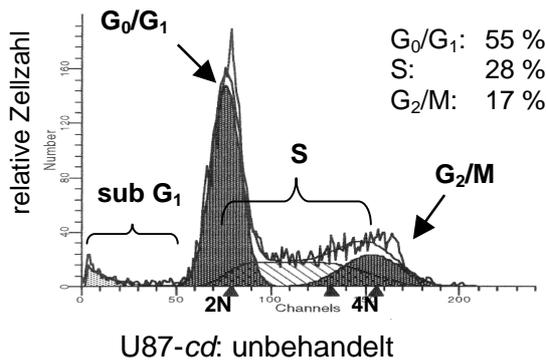


Abb. 26: Auswirkung der Behandlung mit Actinomycin D auf den Zellzyklus von U87- und 9L-Zellen. Linke Spalte: Veränderung der Verteilung von U87-cd-Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach Behandlung (24 h) mit steigenden ActoD-Konzentrationen. Bei geringer Dosierung (0,001 µg/ml) ist ein G₀/G₁-Phasenarrest deutlich. Höhere Konzentrationen führen zu vermehrter Akkumulation in der G₂/M-Phase sowie einem stetig steigenden Anteil von Zellen mit Sub-G₁-DNA-Gehalt (apoptotische Zellen). Rechte Spalte: Veränderung der Verteilung von 9L-cd-Zellen auf die Phasen des Zellzyklus nach Behandlung (24 h) mit steigenden ActoD-Konzentrationen. Bei geringer Dosierung (0,001 µg/ml) ist ebenfalls ein G₀/G₁-Phasenarrest deutlich. Höhere Konzentrationen führen wie bei U87-cd-Zellen zu vermehrter Akkumulation in der G₂/M-Phase. Erläuterung der Art der Abbildung sowie der Abkürzungen können der Abb. 15 entnommen werden.

6. Analyse von Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswegen: CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α

Die Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswege CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α gehören zu den Zytokin-vermittelten Apoptose-Signalwegen. Die Zahl der beschriebenen Todesrezeptoren und ihrer spezifischen Liganden wächst zwar stetig, jedoch sind nur wenige der nachfolgenden Transduktionswege genau verstanden. Darunter die Aktivierung der TNF-RI- und CD95-Rezeptoren: Die Bindung ihrer jeweiligen Liganden führt zur Bildung intrazellulärer Signalkomplexe. Diese Komplexe aktivieren Caspasen, die Apoptose-Effektoren (Enari et al. 1995, Boldin et al. 1996, Chinnaiyan et al. 1996, Muzio et al. 1996). Eine Beteiligung des CD95/CD95L-Systems bei der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie wurde von Beltinger et al. (1999) und Wei et al. (1999) postuliert. In den hier untersuchten Zellmodellen scheinen diese Signaltransduktionswege jedoch nicht an der Apoptose-Auslösung und -Exekution nach Suizidgentherapie oder Acto D-Behandlung beteiligt zu sein.

Die Expression der Todesrezeptoren CD95 und TNF-RI wurde durchflußzytometrisch in den Zellmodellen U87 und 9L nach Suizidgentherapie sowie Chemotherapie (ActoD, Etoposid, Vincristin) untersucht. Bei der Suizidgentherapie im 9L-Modell wurde über den gesamten Behandlungszeitrahmen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern auf Erhöhung der Oberflächenexpression von CD95 und TNF-RI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht. Zellen der 9L-Zelllinien zeigten keinerlei detektierbare Oberflächenproteinexpression von CD95 oder TNF-RI, weder unbehandelt noch nach Behandlung mit einer der angeführten Therapien. Einzige Ausnahme: 9L-*tk/cd*-Zellen, welche bereits im unbehandelten Zustand CD95 exprimieren, diese Expression stieg jedoch nach GCV-Behandlung nicht weiter an. Zusätzlich wurde mittels eines ultrasensitiven ELISA-Tests die Sekretion von TNF α ins Medium bei 9L und 9L-*tk*-Zellen nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie untersucht. Es konnte keinerlei Sekretion von TNF α nachgewiesen werden. Durchflußzytometrische Untersuchungen im U87-Modell zeigten ebenfalls keine detektierbare Erhöhung der Oberflächenexpression von CD95 oder TNF-RI.

Es ist beschrieben worden, daß Zellen mit mutiertem p53 CD95 zwar transkribieren und translatieren, jedoch der Transport des synthetisierten Proteins auf die Oberfläche der Membran über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat gestört ist (Bennett et al. 1998, Müller et al. 1998). Bennett et al. (1998) berichten außerdem von verstärkter TNF-RI-Oberflächenexpression nach Aktivierung von überexprimiertem p53. Zur Klärung der Frage, ob in dem untersuchten p53-mutierten Modellsystem 9L die Expression auf transkriptionaler Ebene induziert wird und lediglich der posttranslationale Proteintransport nicht stattfindet, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Untersucht wurde das HSV-*tk*/GCV System. Die Behandlung von 9L- und 9L-*tk*-Zellen wurde über einen Zeitraum von 3 Tagen durchgeführt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Als interne Kontrolle diente β -Actin. In diesen Untersuchungen war mRNA für CD95, CD95L, TNF-RI und TNF α nachweisbar. Die Expressionshöhe von CD95/CD95L und TNF-RI/TNF α war gering und veränderte sich nicht über den Behandlungszeitraum (Abb. 27).

Abb. 27: Die Untersuchung der mRNA-Expression von CD95 und CD95L mittels semi-quantitativer PCR im Vergleich zu β -Actin zeigte keine Veränderung nach HSV-*tk* /GCV-Gentherapie im 9L-Modell.

(Die gewählte Anzahl von PCR-Amplifizierungszyklen unterscheidet sich bei β -Actin (30x), CD95 (35x) und CD95L (40x), weshalb die β -Actin-Expression vergleichsweise niedrig erscheint.)

(A) 9L-*tk* unbehandelt,

(B) 9L-*tk* 24 h mit 10 μ g/ml GCV und

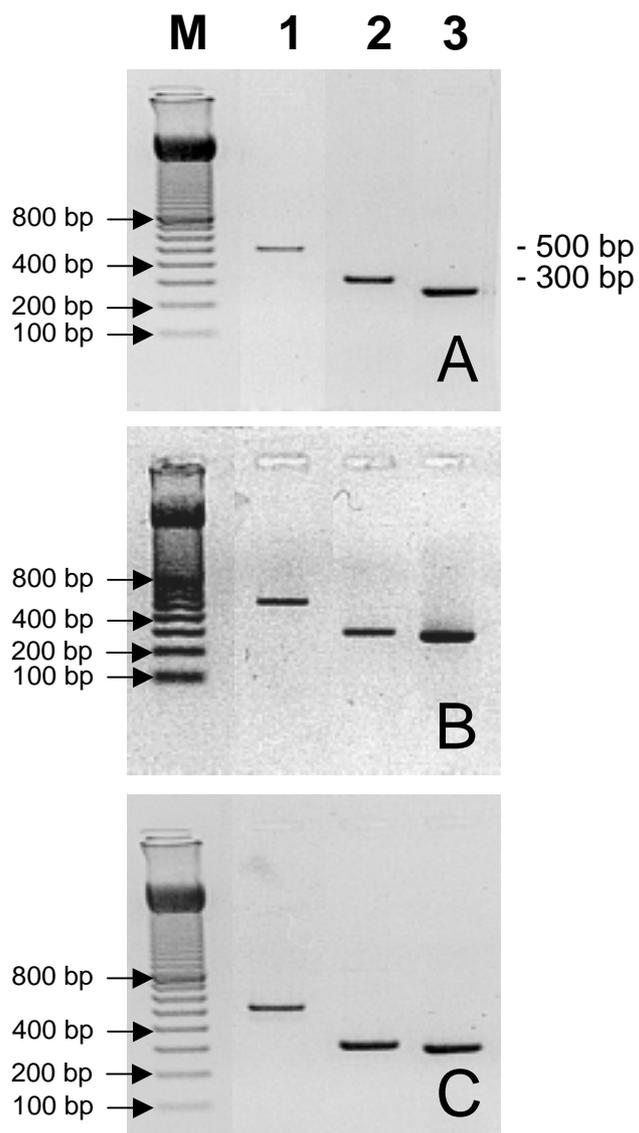
(C) 9L-*tk* 48 h mit 10 μ g/ml GCV behandelt.

(M) 100 bp Molekulargewichtsmarker (Gibco),

(1) β -Actin (500 bp),

(2) CD95 (306 bp),

(3) CD95L (285 bp).



7. Proteinexpression

7.1 Immunhistochemie

Ein wichtiger Kontrollpunkt der Apoptoseinduktion ist der Tumorsuppressor p53 (Vogelstein und Kinzler 1992). Nach DNA-Schädigung akkumuliert p53-Protein durch posttranskriptionale Stabilisierung im Nukleus der betroffenen Zelle (Maltzman und Czyzyk 1984, Kastan et al. 1991). Dies führt entweder zu reguliertem Zelltod (Yonish-Rouach et al. 1991, Shaw et al. 1992) oder zu einem Wachstumsstopp der Zelle, der vermutlich Zeit für Reparaturprozesse gewährt (Michalovitz et al. 1990, Martinez et al. 1991, Kuerbitz et al. 1992, Cox et al. 1995). Die zytotoxische Wirkung der Gentherapiesysteme HSV-*tk*/GCV und E.coli-*cd*/5-FC ist u.a. durch Schädigung der DNA bedingt. Die Beteiligung von p53 an den Signaltransduktionswegen, die zum Zelltod durch diese Gentherapiesysteme führt, ist noch nicht geklärt. Daher wurde die p53-Proteinexpression im Verlauf der Gentherapie untersucht.

Mittels immunhistochemischer Färbung wurde die p53-Expression zunächst bei unbehandelten nicht transduzierten Zelllinien untersucht. Der immunhistochemische Nachweis von p53 ist i.d.R. korreliert mit dem Vorhandensein von Mutationen, die die Halbwertszeit des Proteins verlängern. Durch die verlängerte Halbwertszeit kommt es zur nukleären Akkumulation des Proteins über physiologische Konzentrationen hinaus. Erst durch die Akkumulation wird p53 immunhistochemisch nachweisbar. Wildtyp-p53 (wt-p53) ist unter normalen Umständen nicht mittels Immunhistochemie nachweisbar. Wt-p53 kann jedoch nach Induktion durch DNA-schädigende Noxen (z.B. UV-Strahlung, Röntgenstrahlung, einige Chemotherapeutika) die immunhistochemische Detektionsgrenze ebenfalls überschreiten.

Die immunhistochemische Färbung mit monoklonalem anti p53-Antikörper PAB122, welcher sowohl mutiertes (mt) als auch wt-p53 bindet, war für U87 und die murine Fibroblastenzelllinie 3T3 negativ, für 9L positiv. U87 und 3T3 exprimieren wt-p53 (Rittling und Denhardt 1992, Tiemann und Deppert 1994, Van Meir et al. 1994, Asai et al. 1994), die exprimierten p53-Proteinmengen liegen normalerweise unterhalb der Detektionsgrenze. 9L-Zelllinien hingegen exprimieren mutiertes p53 (Van Meir et al. 1994, Asai et al. 1994) und zeigten eine deutliche, nukleär lokalisierte p53-Expression (Abb. 28 A, B).

Immunhistochemisch nachweisbar wurde p53 jedoch auch in 3T3 und U87 sowie deren transduzierten Derivaten nach Behandlung mit Apoptose-auslösenden Konzentrationen von Doxorubicin (20 µg/ml, 24 h) oder Actinomycin D (2 µg/ml, 24 h) (Abb. 28 C-F). Behandlung mit Vincristin (0,1 µg/ml, 24 h) oder Etoposid (1 µg/ml, 24 h) zeigten dagegen keine eindeutig positive Reaktion. Die transduzierten U87- und 3T3-Zelllinien wiesen nach Gentherapie keine eindeutige p53-Akkumulation auf. An Tag 3 der Behandlung mit GCV waren lediglich vereinzelte U87-*tk*- bzw. 3T3-*tk*-Zellen schwach positiv. *Cd*-transduzierte U87-Zellen wiesen nach Standardbehandlung mit 5-FC über einen Zeitraum von drei Tagen keine detektierbare p53-Akkumulation auf, obwohl die Zellen deutliche morphologische Anzeichen für Apoptose zeigten.

9L-Zellen sowie die davon abgeleiteten stabil transduzierten Zelllinien 9L-*tk* und 9L-*cd* wiesen bereits in unbehandeltem Zustand eine hohe Expression des mutierten p53 im Nukleus auf. Diese wurde durch Behandlung mit 5-FC oder GCV nicht erkennbar verändert.

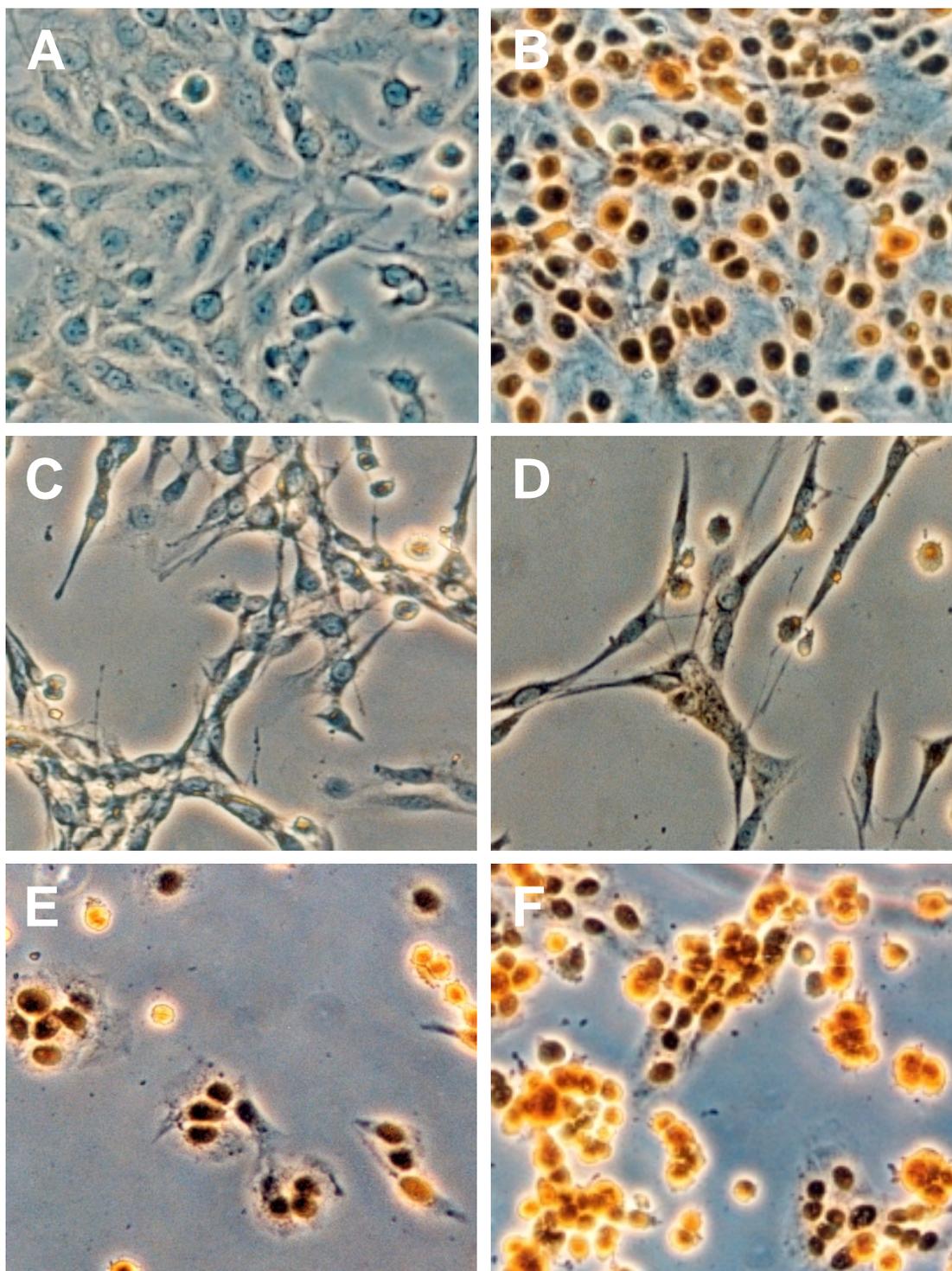


Abb. 28: Zu **A, B**: 9L Ratten-Gliosarkomzellen weisen eine p53-Missense-Punktmutation auf. Das mutierte p53-Proteinprodukt ist durch immunhistochemische Methodik nachweisbar. In (A): Färbung von 9L-Zellen mit irrelevantem Isotyp-mAb (anti-Dansyl). In (B): Färbung von 9L-Zellen mit monoklonalem anti-p53-Ab (PAB 122), der Wildtyp- und mutierte p53-Proteine nachweisen kann. Der nukleär lokalisierte Farbniederschlag (DAB) zeigt die Akkumulation von p53.

Zu **C-F**: U87-*tk*-Zellen nach immunhistochemischer p53-Detektion: (C) unbehandelt, (D) nach 72 h GCV-Behandlung (10 µg/ml), (E) nach 24 h Acto D-Behandlung (2 µg/ml) und (F) nach 24 h Doxorubicin-Behandlung (20 µg/ml). Deutliche, spezifische p53-Akkumulation zeigt sich nach Behandlung mit ActoD und Doxorubicin, nicht jedoch bei unbehandelten oder genterapeutisch behandelten Zellen.

7.2 Western Blot

7.2.1 Tumorsuppressor p53

Die p53-Proteinexpression wurde im U87- und 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie sowie nach Behandlung mit Actinomycin D auch mittels Western Blot-Analyse untersucht. Hier ist der Verlust von apoptotischen, weniger adhärenenten Zellen geringer als bei der Immunhistochemie. p53 war in unbehandelten U87- und U87*tk*-Zellen kaum nachweisbar (Abb. 29 A) Nach 48 h Behandlung mit 10 µg/ml GCV akkumulierte p53 in U87-*tk* und schwächer auch in U87. Nach 72 h nahm diese Induktion bei U87-*tk*-Zellen weiter zu, bei U87 sank die Expression auf das Hintergrundniveau zurück. Nach Behandlung von U87-*tk*-Zellen mit der irrelevanten Prodrug 5-FC änderte sich die Expressionshöhe von p53 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht. Dies galt auch für mit GCV-behandelte U87-*cd*-Zellen.

Im Unterschied zum HSV-*tk*/GCV-System zeigte sich beim E.coli-*cd*/5-FC-System eine schnellere Induktion von p53 bei U87-*cd*-Zellen (bereits nach 24 h), diese sank an den folgenden Tagen wieder (Abb. 29 B). Die p53-Expressionshöhe von parentalen U87-Zellen wurde durch Behandlung mit 5-FC nicht verändert. Nach Behandlung mit ActoD zeigten alle U87-Zelllinien eine deutliche p53-Akkumulation (z.B. U87-*cd*, Abb. 29 B).

p53-Monomere waren bei 9L-Zelllinien als Doppelbande bei 53 kD zu detektieren (Abb. 30). Im Verlauf der Gentherapie nahm bei 9L-*tk*-Zellen insgesamt die p53-Konzentration zu, vor allem im Bereich der schwereren Bande. Nach 72 h-GCV-Behandlung war die untere p53-Bande kaum noch zu detektieren.

Bei nicht transduzierten 9L-Zellen war nach GCV-Applikation keine absolute Zunahme der Expressionshöhe von p53 festzustellen. Jedoch nahm - wie bei 9L-*tk* - die schwerere p53-Bande zu, die leichtere hingegen ab. Nach 72 h GCV-Behandlung war jedoch kaum noch ein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festzustellen. Bei Behandlung von 9L-*tk* mit irrelevanter Prodrug (100 µg/ml 5-FC) änderte sich die Expression von p53 ebenfalls nicht. Dies galt auch für GCV-behandelte 9L-*cd*-Zellen. 9L-*tk*-Zellen schienen höhere Mengen p53 als die nicht transduzierte Ausgangszelllinie zu exprimieren. Die Analyse der p53-Proteinexpression im 9L-Modell während Behandlung mit ActoD (2 µg/ml, 24 h) mittels Western Blot zeigte einen Rückgang der leichteren p53-Proteinbande (Abb. 31).

7.2.2 Proto-Onkogen mdm2

Mdm2 bindet p53 und inhibiert dadurch dessen transkriptionelle Aktivität (Momand et al. 1992). Diese Bindung führt p53 in den Ubiquitin-Proteinabbauweg ein (Haupt et al. 1997; Kubbutat et al. 1997). Gleichzeitig wird die Expression von mdm2 durch p53 transkriptionell positiv reguliert (Barak et al. 1993, Wu et al. 1993). Dadurch entsteht anscheinend ein negativer „Feedback“-Mechanismus zur strengen Kontrolle der p53-Proteinkonzentration. Aufgrund dieses engen Zusammenhangs zwischen p53 und MDM2 wurde auch die Proteinexpression von MDM2 mittels Western Blot nach Gentherapie bzw. ActoD-Behandlung untersucht.

Der verwendete monoklonale Maus-IgG₁-Antikörper SMP14 ist reaktiv mit MDM2 der Ratte (Picksley et al. 1994), der Maus und des Menschen (Martin et al. 1995). MDM2 kommt in fünf verschiedenen Spleißvarianten (p90, p85, p76, p74 sowie p58-57) vor, welche sämtlich das vom verwendeten monoklonalen Antikörper erkennbare Epitop aufweisen (Olson et al. 1993). Chen et al. (1997) berichteten desweiteren von einer proteolytischen Fragmentierung von MDM2 im Verlauf von Apoptoseprozessen durch eine DEVD-Caspase. Hierdurch entstehen zusätzliche Proteinfragmente mit den molekularen Massen von 60 und 32kD. Das 60kD-Protein besitzt ebenfalls das relevante Epitop und sollte daher detektierbar sein. Von den genannten MDM2-Varianten sind lediglich p90, p85, p57-58 und p60 zur Komplexierung mit p53 befähigt.

MDM2 wurde in den U87-Zelllinien hauptsächlich in Form der Spleißprodukte p90 und p85 exprimiert (Abb. 29 A, B). Spleißprodukte geringerer Größe waren nur schwach zu detektieren. Die Expressionshöhe war in der nicht transduzierten Zelllinie geringer als in den stabil transduzierten Linien U87-*tk* und U87-*cd*. Nach 48 h Behandlung mit 10 µg/ml GCV akkumulierte MDM2 in U87-*tk* und schwächer auch in U87. Nach 72 h nahm diese Induktion bei U87-*tk*-Zellen weiter zu, bei U87 sank die Expression auf das Hintergrundniveau zurück. Hinzu kam bei U87-*tk* die erhöhte Expression eines zweiten MDM2-Transkriptes, wobei es sich entweder um ein DEVD-Caspase-Schnittprodukt (60kD) oder um ein alternatives Spleißprodukt (58/57kD) handelte. Nach Behandlung von U87-*tk*-Zellen mit der irrelevanten Prodrug 5-FC bzw. von U87-*cd*-Zellen mit GCV änderte sich die Expressionshöhe von MDM2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht.

Beim *E.coli-cd/5-FC*-System zeigte sich ebenfalls eine Induktion von MDM2. Die MDM2-Expression bei U87-*cd* wurde erhöht und erreichte ihr Maximum nach 48 h. Auch U87-Zellen zeigten eine leichte MDM2-Induktion nach 48 h. Nach Behandlung mit ActoD zeigten U87-*tk*- und U87-*cd*-Zellen keine nachweisbare MDM2-Expression mehr.

Die MDM2-Expression war in 9L-Zellen 24 h nach GCV-Applikation leicht erniedrigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach 48 und 72 h war dieser Unterschied zur Kontrolle wieder aufgehoben (Abb. 30). 9L-*tk*-Zellen exprimierten höhere Mengen MDM2 als die nicht transduzierten 9L-Zellen, wobei vorwiegend das p90 und/oder das p85-Spleißprodukt nachzuweisen war. Die MDM2-Konzentration sank nach GCV-Behandlung stetig ab. Dieses Expressionmuster war bei 9L-*cd*-Zellen nach 5-FC-Behandlung ähnlich (nicht gezeigt). Bei Behandlung von 9L-*tk* mit irrelevanter Prodrug (100 µg/ml 5-FC) änderte sich die Expression von MDM2 nicht. Dies galt auch für mit GCV-behandelte (10 µg/ml, 72 h) 9L-*cd*-Zellen.

Nach 24-stündiger Inkubation mit 1-2 µg/ml Actinomycin D war MDM2 in keiner der untersuchten Zelllinien (9L, 9L-*tk*, 9L-*cd*, U87, U87-*tk*, U87-*cd*) nachzuweisen (Abb. 29 B, 31).

7.2.3 Bcl-2-Proteinfamilie

Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie (Oltvai et al.1993), und es wird vermutet, daß Bax direkt involviert ist beim Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials. Die Verminderung des Transmembranpotentials stellt einen wichtigen Faktor im Verlauf von Apoptoseprozessen dar (Green und Reed 1998, Hengartner 2000). Die direkte transkriptionale Regulation von bax durch p53 (Miyashita and Reed, 1995) scheint einen eigenständigen Apoptoseweg zu charakterisieren, auch wenn die zunehmend erkennbare Komplexität apoptotischer Vorgänge dies relativieren könnte.

Die Bax-Proteinexpression im U87- und 9L-Modell wurde während HSV-*tk*/GCV- und *E.coli-cd/5-FC*-Gentherapie mittels Western Blot analysiert (Abb. 32 A, B). Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen mit den Prodrugs (10 µg/ml GCV; 100 µg/ml 5-FC) bzw. 24 h mit ActoD (1-2 µg/ml) behandelt. Die Bax-Proteinexpression im U87-Modell änderte sich nicht nach Gentherapie oder nach ActoD-Behandlung. Im 9L-Modell wurde Bax nur sehr gering exprimiert (z.T. unterhalb der Detektionsgrenze). Dies änderte sich nicht nach Gentherapie, jedoch war nach ActoD-Behandlung eine höhere Bax-Expression nachzuweisen.

Bei stabiler Bax-Expression kann jedoch alternativ die Reduktion der Konzentration von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Apoptose bedingen. Es ist gut charakterisiert (Reed 1994), wie pro- und anti-apoptotische Faktoren dieser Familie Heterodimere bilden und sich hierdurch in ihrer Funktion gegenseitig neutralisieren können. Nach Störung des Konzentrationsgleichgewichtes, z.B. durch Bcl-2-Degradierung, kann Bax vermehrt aus den neutralisierenden Heterodimeren freigesetzt werden und seine proapoptotische Funktion trotz gleichbleibender Konzentration ausüben.

Daher wurde auch die Proteinexpression der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-x_L mittels Western Blot analysiert (Abb. 33 und 34).

Bei den nicht transduzierten Zelllinien änderte sich die Bcl-2-Expression unter Gentherapie nicht wesentlich (Abb. 33). U87-*tk*-Zellen zeigten einen leichten Rückgang der Expression beginnend 24 h nach Einsetzen der GCV-Behandlung. Bei U87-*cd* zeigte sich keine deutliche Bcl-2-Reduzierung nach Behandlung mit 5-FC. Die Bcl-2-Expressionshöhe blieb bei 9L-*tk*-Zellen unbeeinflusst von der GCV-Behandlung. Bei mit 5-FC-behandelten 9L-*cd*-Zellen zeigte sich jedoch eine deutliche Zunahme der Bcl-2-Expression.

Nach Behandlung mit ActoD zeigten U87-*tk*, U87-*cd* und 9L-*tk* einen Rückgang der Bcl-2-Expression, 9L-*cd* zeigte eine deutliche Zunahme.

Bei den nicht transduzierten Zelllinien änderte sich die Bcl-x_L-Expression unter Gentherapie nicht (Abb. 34). U87-*tk* und U87-*cd* zeigten keine Änderung der Bcl-x_L-Expression nach der jeweiligen Prodrug-Behandlung. Bei 9L-*tk*-Zellen trat im Verlauf der Gentherapie eine zweite, etwas schwerere Bcl-x_L-Proteinbande auf, die schwach auch bei 9L-Zellen zu erkennen war, dort jedoch nicht wesentlich zunahm. Bei 9L-*cd*-Zellen war nach 72 h ein Rückgang zu verzeichnen.

Nach Behandlung mit ActoD zeigten U87-*tk*, U87-*cd*, 9L-*tk* und 9L-*cd* einen Rückgang der Bcl-x_L-Expression.

7.2.4 p21^{WAF1, Cip1, Sdi1}, Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen

Ein weiteres p53-Zielgen ist p21, ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor, dessen Bedeutung für den G₁-Zellzyklusarrest nach p53-Induktion durch DNA-Schädigung gut charakterisiert ist (El-Deiry et al. 1993). p21 kann der Induktion von Apoptose entgegenwirken (Tian et al. 2000) und wird in einigen Apoptosewegen frühzeitig von Caspasen inaktiviert (Gervais et al. 1998, Chai et al. 2000). Aufgrund seiner Bedeutung für den Zellzyklus, für DNA-Reparatur/Replikation und Apoptose sowie als Zielgen von p53 wurde die Proteinexpression von p21 während Gentherapie und Therapie mit Actinomycin D mittels Western Blot untersucht.

Bei den nicht transduzierten Zelllinien U87 und 9L änderte sich die p21-Expression unter Gentherapie nicht (Abb. 35). Bei U87-*tk*-Zellen änderte sich das Expressionsprofil nach GCV-Applikation ebenfalls nicht. Mit 5-FC behandelte U87-*cd*-Zellen zeigten eine p21-Induktion nach 24 h, die nach 48 h wieder abnahm und nach 72 h erneut auf den Kontrollwert abgesunken ist. 9L-*tk*-Zellen exprimierten p21 auf einem höheren Niveau als die nicht transduzierten 9L-Zellen. Nach GCV-Behandlung nahm p21 bereits nach 24 h deutlich ab, eine zweite Bande bei ca. 16 kD wurde sichtbar. Diese war nach 48 h nicht mehr zu detektieren. 9L-*cd*-Zellen exprimierten p21 in geringer Konzentration (verglichen mit U87-Zellen). 24 h nach 5-FC-Applikation war p21 nicht mehr nachzuweisen, dies änderte sich über den Behandlungszeitraum nicht mehr.

Nach Behandlung mit ActoD zeigten U87-*cd*, 9L-*tk* und 9L-*cd* einen Rückgang der p21-Expression. U87-*tk* zeigte eine deutliche Erhöhung der Expressionsstärke.

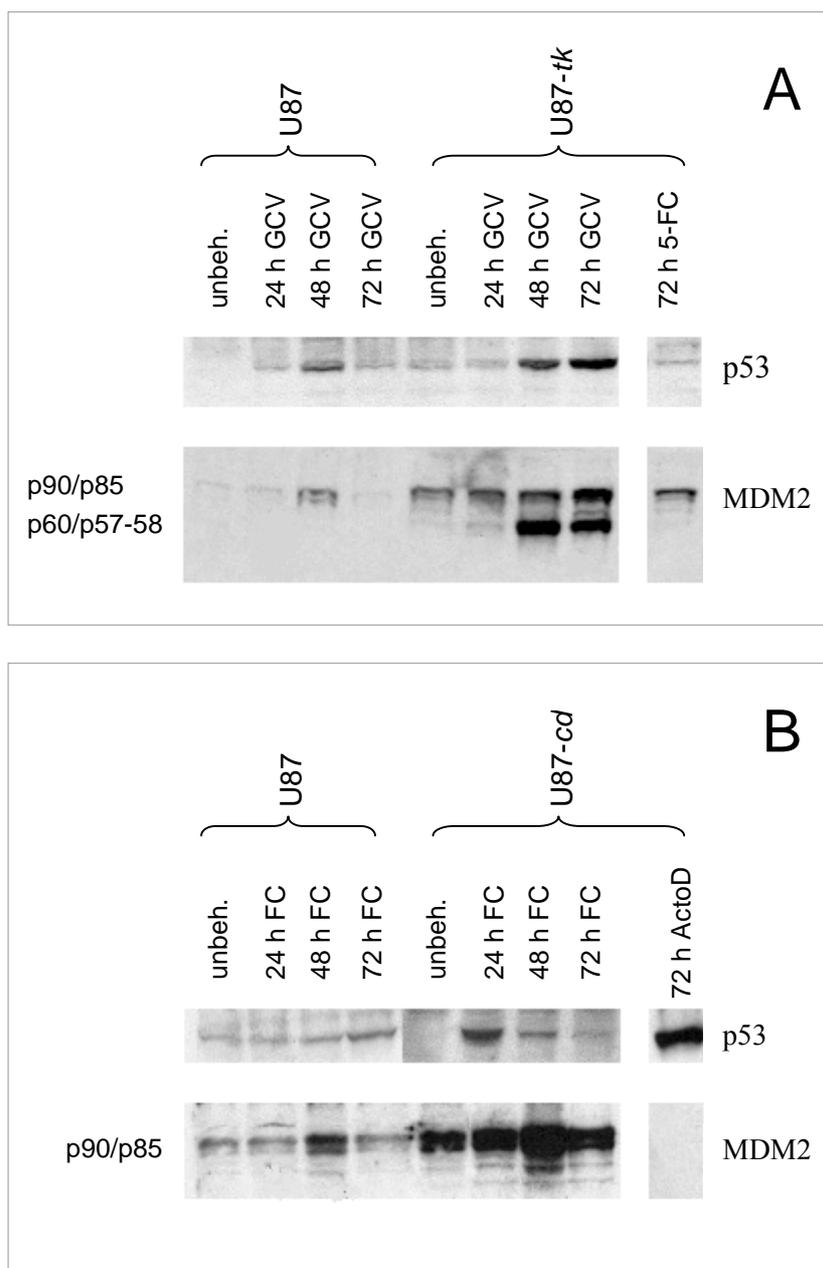
Abb. 29: Analyse der p53- und MDM2-Proteinexpression im U87-Modell während der HSV-*tk*/GCV- (A) und *E.coli-cd*/5-FC-Gentherapie (B) mittels Western Blot.

(A) p53 ist in unbehandelten U87- und U87-*tk*-Zellen nur schwach nachweisbar. Nach 48h Behandlung mit 10 μ g/ml GCV akkumuliert p53 in U87-*tk* und schwächer auch in U87. Nach 72 h nimmt diese Induktion bei U87-*tk*-Zellen weiter zu, bei U87 sinkt die Expression auf das Hintergrundniveau zurück.

Dies gilt analog für die MDM2-Expressionshöhe. Hinzu kommt bei U87-*tk* die erhöhte Expression eines zweiten MDM2-Transkriptes, wobei es sich entweder um ein Caspase 3-Schnittprodukt (60kD) oder um ein alternatives Spleißprodukt (58/57kD) handelt. Nach Behandlung von U87-*tk*-Zellen mit der irrelevanten Prodrug 5-FC ändert sich die Expressionshöhe von p53 und MDM2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht.

(B) p53- und MDM2-Expression im U87-Modell unter *E.coli-cd*/5-FC-Gentherapie:

Im Unterschied zum HSV-*tk*/GCV-System wird im *E.coli-cd*/5-FC-System p53 schneller induziert (bei U87 *cd*-Zellen bereits nach 24 h). Die p53-Konzentration sinkt an den folgenden Tagen wieder. Die p53 Expressionshöhe von nicht trans-duzierten U87-Zellen wird nicht verändert. Die MDM2-Expression bei U87 *cd* wird erhöht und erreicht ihr Maximum nach 48 h. Auch U87-Zellen zeigen eine leichte MDM2-Induktion nach 48 h. Nach Behandlung mit ActoD zeigen U87-*cd*-Zellen eine deutliche p53-Akkumulation, MDM2 Proteine sind nicht nachweisbar.



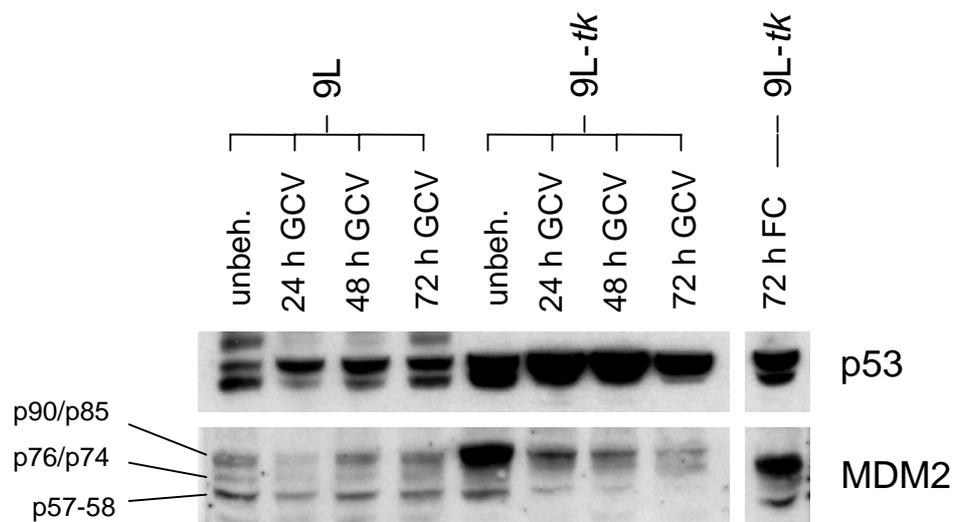
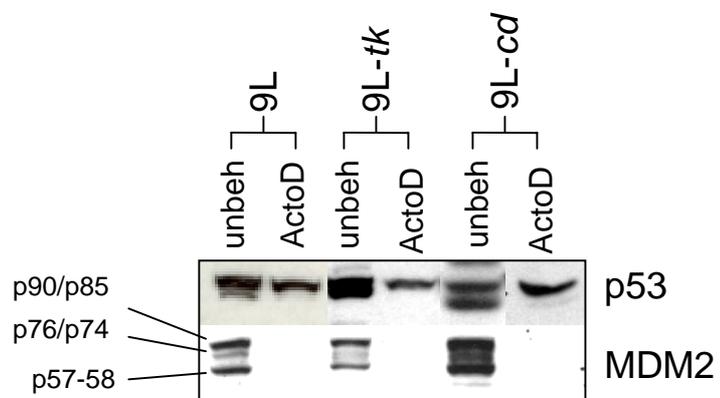


Abb. 30: Analyse der p53- und MDM2-Proteinexpression im 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV-Gentherapie mittels Western Blot. p53-Monomere sind bei 9L-Zelllinien als Doppelbande bei 53 kD zu detektieren. Im Verlauf der Gentherapie nimmt bei 9L-*tk*-Zellen insgesamt die p53-Konzentration zu, vor allem im Bereich der schwereren (höheren) Bande.

Bei nicht transduzierten 9L-Zellen ist keine signifikante Zunahme der Expressionshöhe von p53 festzustellen. Nach GCV-Applikation nimmt jedoch wie bei 9L-*tk* die schwerere p53-Bande zu, die leichtere hingegen ab. Nach 72 h GCV-Behandlung ist jedoch kaum noch ein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festzustellen. Bei Behandlung von 9L-*tk* mit irrelevanter Prodrug (100 µg/ml 5-FC) ändert sich die Expression von p53 und MDM2 nicht. Die MDM2-Expression ist in 9L-Zellen 24 h nach GCV-Applikation leicht erniedrigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach 48 und 72 h ist dieser Unterschied zur Kontrolle wieder aufgehoben. 9L-*tk*-Zellen exprimieren nicht nur höhere Mengen p53 als die nicht transduzierte Ausgangszelllinie, sondern weisen auch ein höheres MDM2-Expressionsniveau auf, wobei vorwiegend das p90 und/oder das p85-Spleißprodukt nachzuweisen ist. Die MDM2-Konzentration sinkt nach GCV-Behandlung stetig und gleichmäßig für die exprimierten Spleißprodukte ab.

Abb. 31: Analyse der p53- und MDM2-Proteinexpression im 9L-Modell während Behandlung mit Actinomycin D (2 µg/ml, 24 h) mittels Western Blot. Nach Acto D-Behandlung ist die leichtere p53-Proteinbande nicht zu detektieren, MDM2 ist ebenfalls nicht nachweisbar.



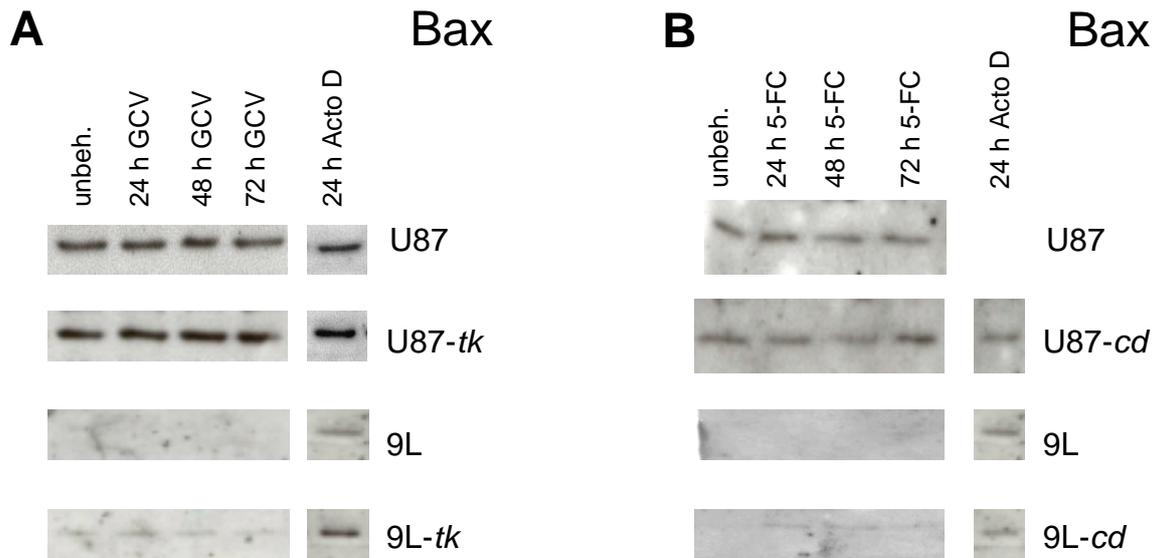


Abb. 32: Analyse der Bax-Proteinexpression im U87- und 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV- (A) und E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie (B) mittels Western Blot. Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen mit den Prodrugs (10 µg/ml GCV; 100 µg/ml 5-FC) bzw. 24 h mit Acto D (1-2 µg/ml) behandelt. Die Bax-Proteinexpression im U87-Modell ändert sich nicht nach Gentherapie oder nach Acto D-Behandlung. Im 9L-Modell wird Bax nur sehr gering exprimiert (z.T. unterhalb der Detektionsgrenze), dies ändert sich nicht nach Gentherapie. Nach Actinomycin D-Behandlung ist jedoch eine höhere Bax-Expression nachzuweisen.

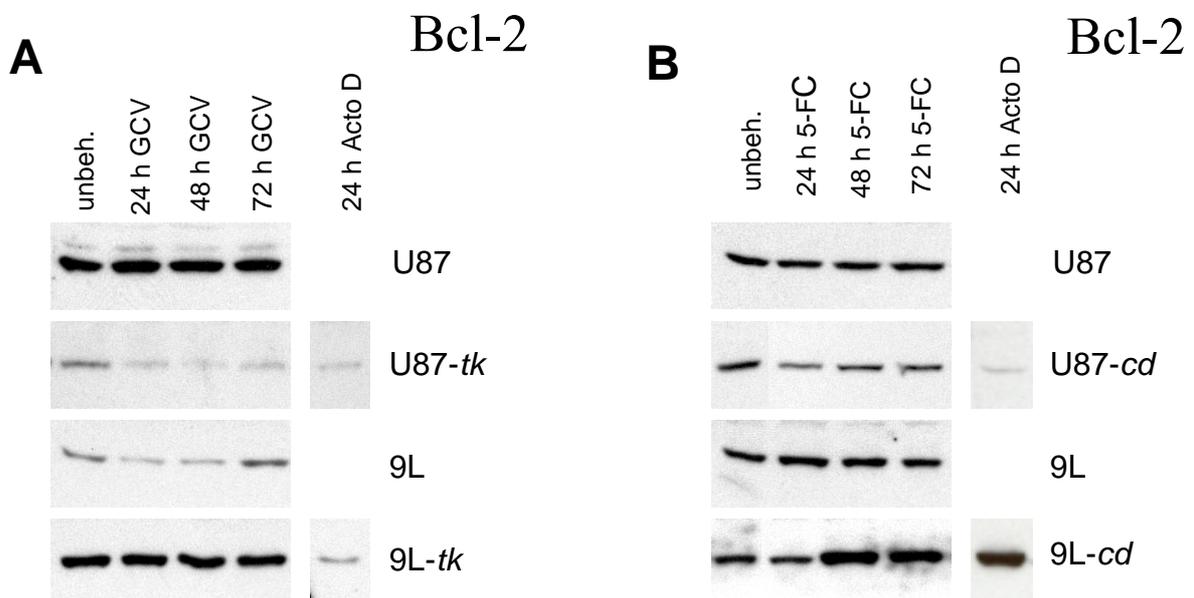


Abb. 33: Analyse der Bcl-2-Proteinexpression im U87- und 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV- (A) und E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie (B) mittels Western Blot. Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen mit den Prometaboliten (10 µg/ml GCV; 100 µg/ml 5-FC) bzw. 24 h mit Acto D (1-2 µg/ml) behandelt. Bei den nicht transduzierten Zelllinien ändert sich die Bcl-2-Expression unter Gentherapie nicht. Nur bei GCV-behandelten 9L-Zellen zeigt sich nach 24 und 48 h ein leichter Rückgang, der jedoch nach 72 h nicht mehr festzustellen ist. U87-*tk* zeigt einen leichten Rückgang der Expression beginnend 24 h nach Einsetzen der GCV-

Behandlung. Bei U87-*cd* verändert sich die Bcl-2-Konzentration nach 5-FC-Behandlung nicht signifikant. Die Bcl-2-Expressionshöhe bleibt bei 9L-*tk*-Zellen unbeeinflusst von der GCV-Behandlung. Bei mit 5-FC-behandelten 9L-*cd*-Zellen zeigt sich jedoch eine deutliche Zunahme der Bcl-2-Expression. Nach Behandlung mit ActoD zeigen U87-*tk*, U87-*cd* und 9L-*tk* einen Rückgang der Bcl-2-Expression, 9L-*cd* eine deutliche Zunahme.

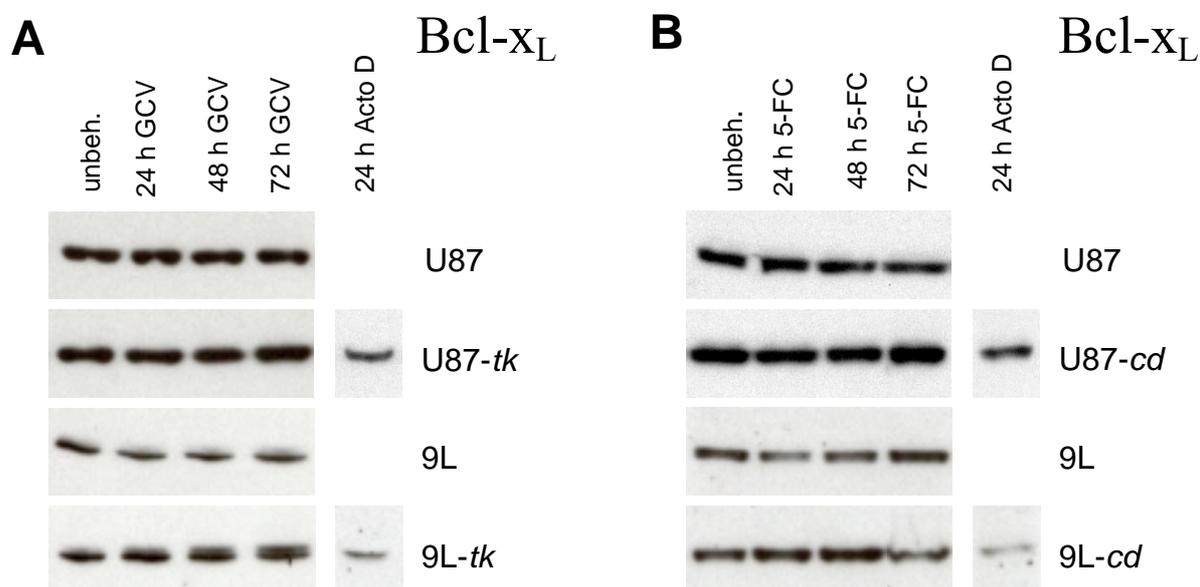


Abb. 34: Analyse der Bcl-x_L-Proteinexpression im U87- und 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV- (A) und E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie (B) mittels Western Blot. Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen mit den Prometaboliten (10 µg/ml GCV; 100 µg/ml 5-FC) bzw. 24 h mit Acto D (1-2 µg/ml) behandelt.

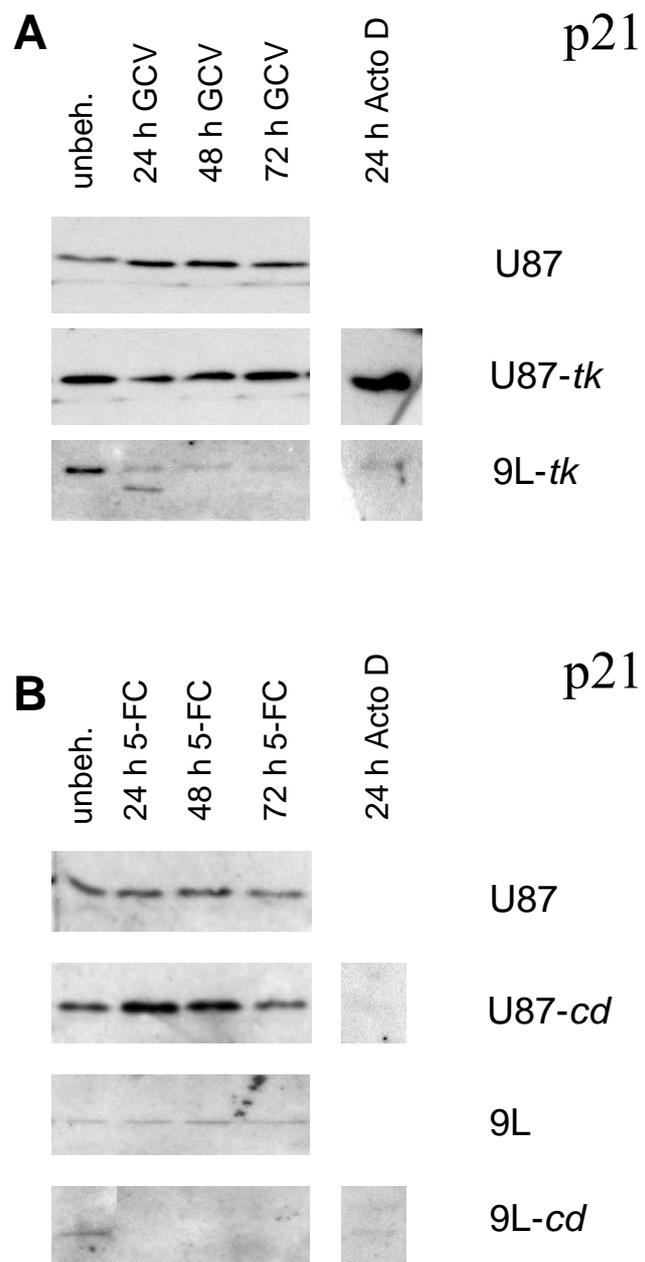
Bei den nicht transduzierten Zelllinien ändert sich die Bcl-x_L-Expression unter Gentherapie nicht. U87-*tk* und U87-*cd* zeigen keine Änderung der Bcl-x_L-Expression nach der jeweiligen Prodrug-Behandlung. Bei 9L-*tk*-Zellen tritt im Verlauf der Gentherapie eine zweite etwas schwerere Bcl-x_L-Proteinbande auf, die schwach auch bei 9L-Zellen zu erkennen ist, dort jedoch nicht wesentlich zunimmt. Bei 9L-*cd*-Zellen ist nach 72 h ein leichter Rückgang der Bcl-x_L-Konzentration zu verzeichnen.

Nach Behandlung mit Actinomycin D zeigen U87-*tk*, U87-*cd*, 9L-*tk* und 9L-*cd* einen Rückgang der Bcl-x_L-Expression.

Abb. 35: Analyse der p21-Proteinexpression im U87- und 9L-Modell während HSV-*tk*/GCV- (A) und *E.coli-cd*/5-FC-Gentherapie (B) mittels Western Blot. Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen mit den Prodrugs (10 µg/ml GCV; 100 µg/ml 5-FC) bzw. 24 h mit Acto D (1-2 µg/ml) behandelt.

Bei den nicht transduzierten Zelllinien U87 und 9L ändert sich die p21-Expression unter Gentherapie nicht signifikant (9L +GCV nicht gezeigt). Bei U87*tk*-Zellen ändert sich das Expressionsprofil nach GCV-Applikation ebenfalls nicht. Mit 5-FC behandelte U87*cd*-Zellen zeigen eine p21-Induktion nach 24 h, die nach 48 h wieder abnimmt und nach 72 h erneut auf den Kontrollwert absinkt. 9L-*tk*-Zellen exprimieren p21 auf einem höheren Niveau als die nicht transduzierte Ausgangszelllinie 9L. Nach GCV-Behandlung nimmt p21 bereits nach 24 h deutlich ab, eine zweite Bande bei ca. 16 kD wird sichtbar. Diese ist nach 48 h nicht mehr zu detektieren. 9L-*cd*-Zellen exprimieren p21 in geringer Konzentration (verglichen mit U87-Zellen). 24 h nach 5-FC-Applikation ist p21 nicht mehr nachzuweisen, dies ändert sich über den Behandlungszeitraum nicht mehr.

Nach Behandlung mit ActoD zeigen U87-*cd*, 9L-*tk* und 9L-*cd* einen Rückgang der p21-Expression. U87-*tk* zeigt eine deutliche Erhöhung der Expressionsstärke.



8. Colorimetrische Detektion der Caspase 3-Enzymaktivität

Die meisten der morphologischen Veränderungen, die charakteristisch für den apoptotischen Zelltod sind, werden von einer Familie von Cystein-Proteasen bewirkt. Diese werden spezifisch in apoptotischen Zellen aktiviert. Durch das Zerschneiden ihrer Substrate werden strukturelle Veränderungen wie z.B. Kondensation und Auflösung des Nukleus, Vesikelabschnürung, Auflösung des Zytoskeletts, aber auch funktionelle Veränderungen z.B. bei der DNA-Reparatur und -Replikation oder dem Spleißen von mRNA bewirkt.

Da insbesondere die Cystein-Protease Caspase 3 eine wichtige Effektor-Funktion im Verlauf des apoptotischen Zelltodes einnimmt, wurde die Aktivität dieses Enzyms nach Gentherapie und Actinomycin D-Chemotherapie in 9L- und U87-Zellen untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Zellysaten mittels eines colorimetrischen Testverfahrens, das auf der Spaltung des artifiziellen Caspase 3-Substrats DEVD-pNA unter Bildung des spektrophotometrisch detektierbaren Chromophors p-Nitroanilid (pNA) beruht. Die pNA-Bildung pro Zeiteinheit (1 h) ist dann ein Maß für die Caspase 3-Aktivität im untersuchten Zellysate.

Alle 9L- und U87-Zelllinien wurden über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen auf die Induktion entsprechender Caspase-Aktivität, meßbar als Absorptionserhöhung bei 405 nm im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, überprüft. Sofern nicht anders vermerkt, liegen allen Ergebnissen Doppelwerte zugrunde. Die Ergebnisse wurden in unabhängigen Tests reproduziert. Als Kontrollen dienten jeweils sowohl die entsprechenden unbehandelten Zellen als auch Lysate der behandelten Zellen, die allerdings zuvor mit einem irreversiblen Caspase 3-Inhibitor (DEVD-fmk) behandelt wurden.

Die deutlichste Caspase 3-Aktivität ließ sich nach ActoD-Behandlung (2 µg/ml, 24 h) bei 9L und 9L-*cd* mit etwa 2,5-fach erhöhter Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigen. 9L-*tk* zeigten eine 2,2-fache Absorptionserhöhung unter ActoD-Behandlung (Abb. 36). Die U87-Zelllinien wiesen nach ActoD-Behandlung (1 µg/ml) eine deutlich geringere Caspase 3-Aktivität auf (nur etwa 1,4-fache Absorptionserhöhung) (Abb. 36). Dies war erstaunlich, da die PS-Exposition im Annexin V-Test bei ActoD-Behandlung bereits bei 60-80% der von U87-abgeleiteten Zellen die Einleitung von Apoptose nahelegte, während nur etwa 40% der 9L-abgeleiteten Zellen diesen Apoptosemarker bei gleicher Behandlung zeigten. Von den Gentherapiemodellen wies die HSV-*tk*/GCV-Gentherapie die deutlichste Caspase 3-Aktivierung auf. Die U87-*tk*-Zellen zeigten bereits an Tag 1 eine 1,5-fach höhere Absorption als die unbehandelte Kontrolle (Abb. 37). Die Absorptionserhöhung stieg an den Tagen 2 und 3 weiter bis auf das 1,8-fache. Bei den 9L-*tk*-Zellen war die erhöhte Caspaseaktivität erst an Tag 2 zu messen, betrug dann aber schon das 1,8-fache des Kontrollwertes und blieb auch an Tag 3 auf diesem hohen Niveau (Abb. 37)¹.

Bei der Behandlung der Zellen mit dem E.coli-*cd*/5-FC-System ließ sich bei den 9L-*cd*-Zellen eine weniger deutliche Absorptionserhöhung auf das 1,4-fache an Tag 2 detektieren (Abb. 38). Diese fiel an Tag 3 auf das 1,3-fache und ließ sich an Tag 4 überhaupt nicht mehr nachweisen. Bei den U87-*cd* Zellen zeigte sich eine ähnlich schwache Caspaseaktivierung (1,3-fach) bereits an Tag 1 (Abb. 39). Die Caspaseaktivierung stieg an Tag 2 auf das 1,5-fache an und erreichte ihr Maximum an Tag 3 mit einer 2,25-fachen Erhöhung. Dies war vergleichbar mit dem durch GCV in U87-*tk*-Zellen ausgelösten Aktivitätsanstieg. Bei Behandlung der transduzierten Zellen mit irrelevanten Prodrugs oder bei Behandlung nicht transduzierter Zellen mit GCV (10 µg/ml 24-72 h) oder 5-FC (100 µg/ml 24-72 h) konnte keine Absorptionserhöhung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden (Abb. 38).

¹ Vorinkubation mit einem irreversiblen Caspase-Inhibitor (D'Mello et al. 1998; Boc-D-FMK, Boc-Asp(OMe)-CH₂F, 10-100 µg/ml präinkubiert 1 h vor GCV-Applikation) konnte bei 9L-*tk* allerdings die Apoptoseinduktion, nachgewiesen durch Bestimmung der PS-Exposition im AnnexinV-Bindungstest, nicht verhindern. Nach 48 h GCV-Inkubation (10 µg/ml) wurde die PS-Exposition durchflußzytometrisch untersucht. Nicht mit GCV-behandelte 9L-*tk*-Zellen zeigten einen Hintergrund PS-exponierender Zellen von 4% (5% der vitalen Zellen). Mit GCV-behandelte Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne Caspaseinhibitor einen Anteil PS-positiver Zellen von 15-18% (entspricht 30-36% der vitalen Zellpopulation). Ebenso wenig konnte das Ausmaß des Zellsterbens supprimiert werden.

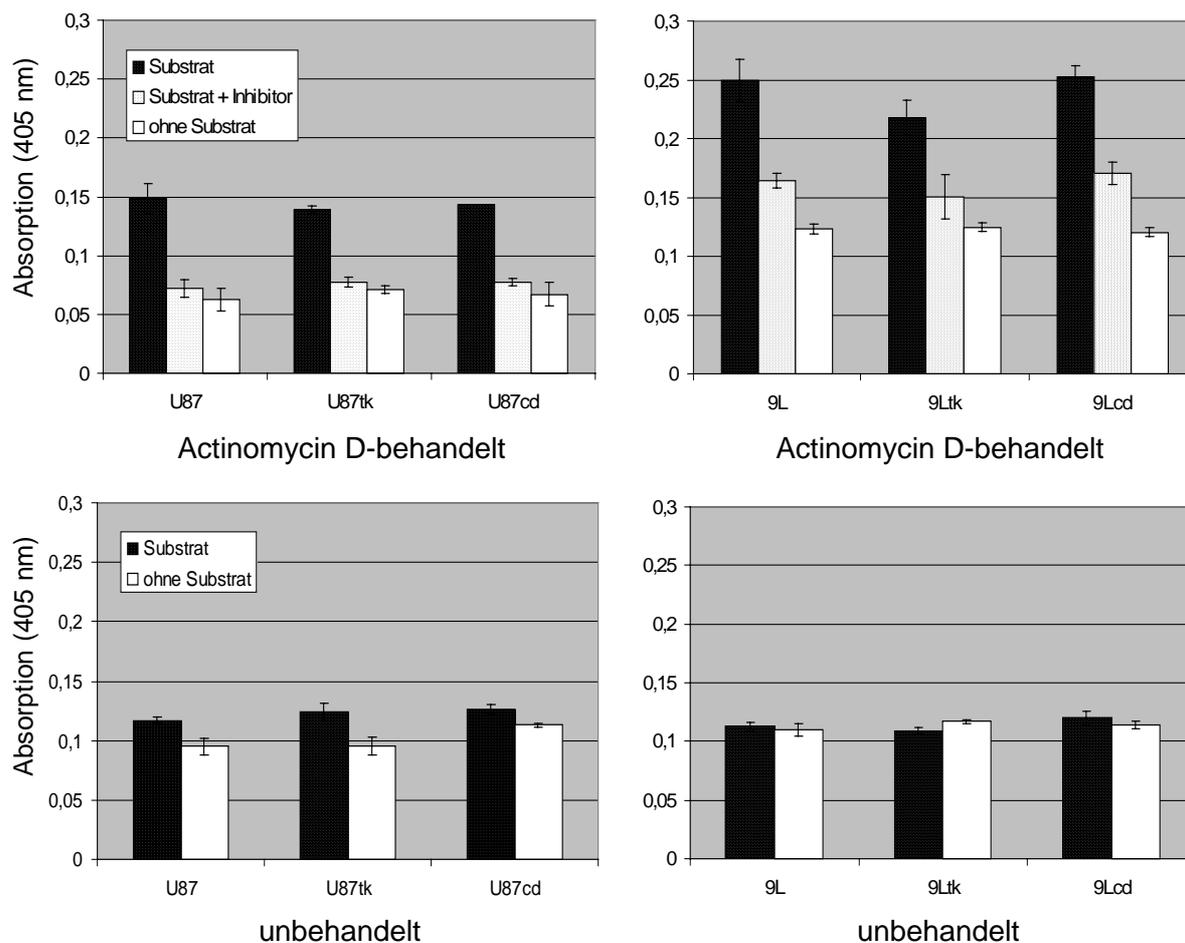


Abb. 36: DEVD-Caspasen wurden bei 9L- und U87-Zelllinien nach Actinomycin D-Behandlung (2 µg/ml, 24 h) aktiviert. Mittels colorimetrischem Assay wurde die Freisetzung von pNA aus dem artifiziiellen Substrat DEVD-pNA nach Spaltung durch zelluläre DEVD-Caspasen in Zellysaten anhand der Absorption von pNA bei 405 nm gemessen (in den Grafiken in absoluten Werten angegeben). „Substrat“ zeigt die jeweiligen Zellysat-Messungen 1 h nach Zugabe von Substrat (pNA). „Substrat + Inhibitor“ gibt die Meßwerte parallel hergestellter Proben wieder, welche mit Caspase-Inhibitor präinkubiert wurden. Diese Werte zeigen die Absorption abzüglich der DEVD-Caspase-Aktivität und lassen Rückschlüsse auf unspezifische pNA-Spaltung zu. „Ohne Substrat“ zeigt die Absorptionswerte weiterer Parallelproben, welche ohne vorherige Substrat-Zugabe den Absorptionshintergrundwert darstellen. Jedem Meßwert liegen zwei unabhängige Proben, die parallel gemessen wurden, zugrunde. Die entsprechende Abweichung ist als Fehlerbalken eingetragen. Jede Meßreihe wurde zweimal in unabhängigen Tests an Zellysaten, welche in separaten Testreihen gewonnen wurden, durchgeführt.

Alle untersuchten Zelllinien zeigen eine spezifische Absorptionserhöhung nach ActoD-Behandlung. Diese ist bei den 9L-Zelllinien insgesamt höher als bei U87-Zelllinien. Eine zusätzliche, geringe unspezifische Aktivität ist ebenfalls zu detektieren und bei 9L-Zelllinien wiederum stärker ausgeprägt als bei U87-Zelllinien. Bei unbehandelten Zellen ist dagegen keine Caspaseaktivität meßbar.

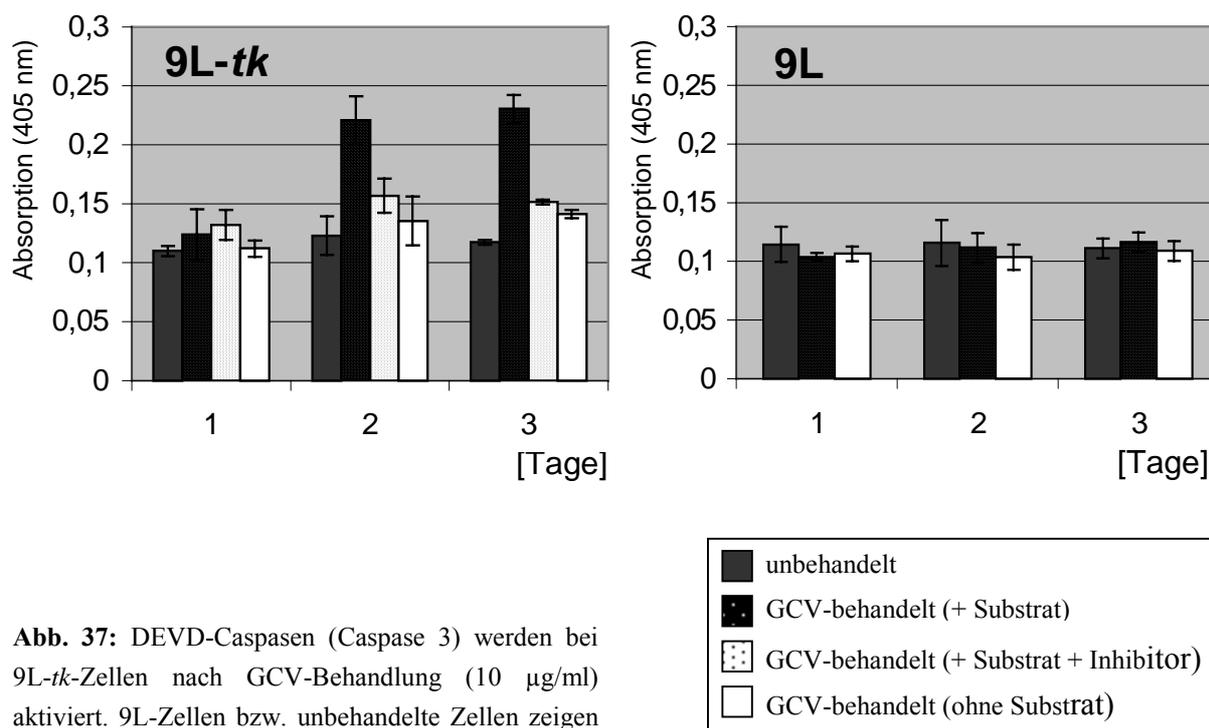
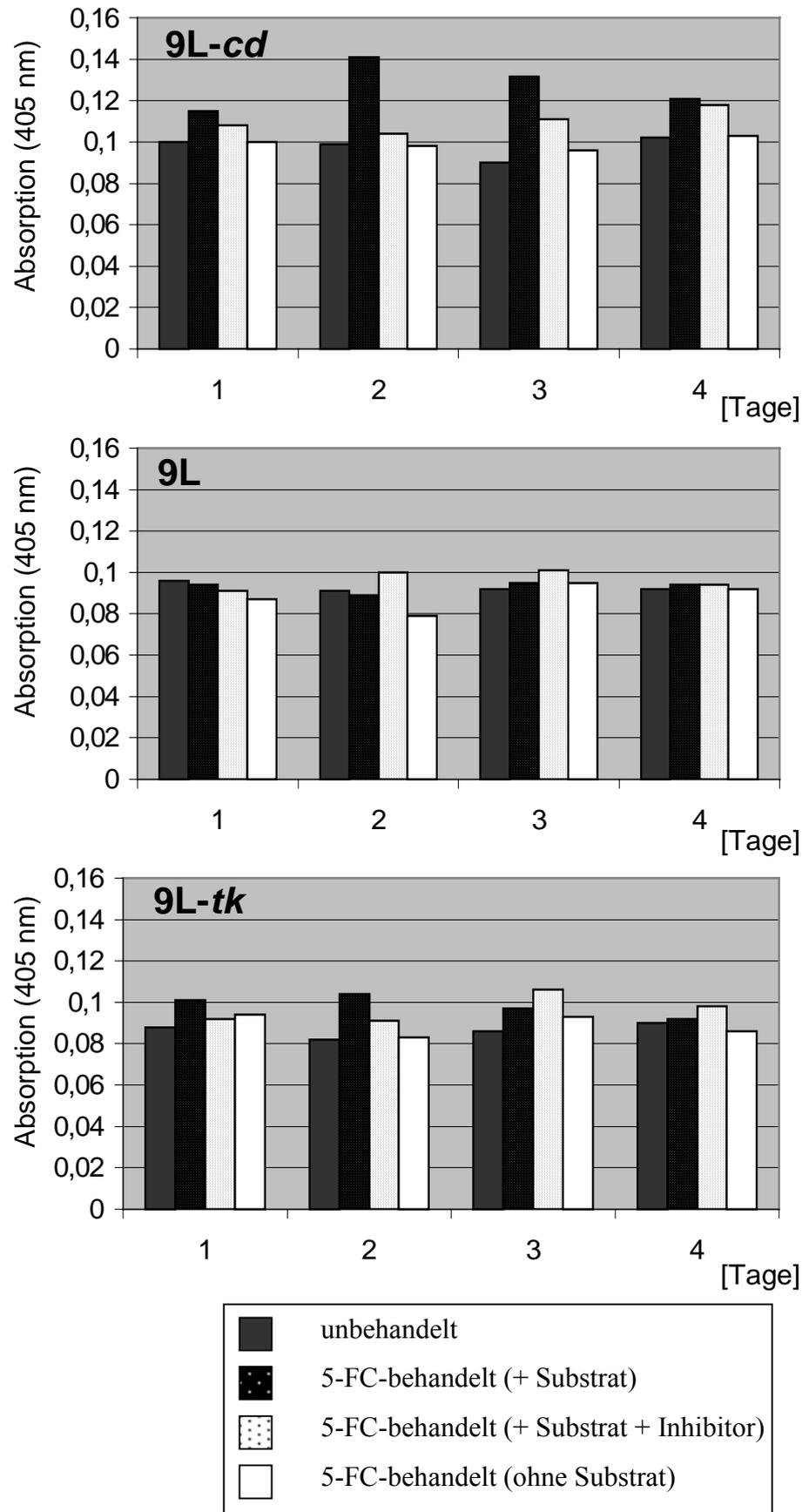


Abb. 37: DEVD-Caspasen (Caspase 3) werden bei 9L-tk-Zellen nach GCV-Behandlung (10 µg/ml) aktiviert. 9L-Zellen bzw. unbehandelte Zellen zeigen eine solche Aktivierung nicht.

Wie in Abb. 36 geschildert wurde hier mittels colorimetrischem Assay die Freisetzung von pNA aus DEVD-pNA nach Spaltung durch zelluläre DEVD-Caspasen in Zellysaten anhand der Absorption von pNA bei 405 nm gemessen (als absolute Werte wiedergegeben). Erklärung der Bezeichnungen „Substrat“, „Substrat + Inhibitor“ und „ohne Substrat“ können der Abb. 36 entnommen werden. Jedem Meßwert liegen zwei unabhängige Proben, die parallel gemessen wurden, zugrunde. Die entsprechende Abweichung ist als Fehlerbalken eingetragen. Jede Meßreihe wurde zweimal in unabhängigen Tests an Zellysaten, welche in separaten Testreihen gewonnen wurden, durchgeführt.

9L-tk-Zellen zeigen nach 24 h GCV-Behandlung noch keine detektierbare Caspase 3-Aktivität. Diese ist erst nach 48 h deutlich meßbar. Auch nach 72 h Behandlung bleibt die detektierte Caspase 3-Aktivität auf diesem hohen Niveau. Bei der nicht transduzierten Ausgangszelllinie 9L ist hingegen keine erhöhte Caspase 3-Aktivität meßbar.

Abb. 38: DEVD-Caspasen werden bei 9L-*cd* durch 5-FC-Behandlung (100 µg/ml) aktiviert. Diese Aktivierung bleibt in nicht transduzierten Zellen und in mit irrelevanten Suizidgenen transduzierten Zellen aus. Wie in Abb. 36 geschildert, wurde hier mittels colorimetrischem Assay die Freisetzung von pNA aus DEVD-pNA nach Spaltung durch zelluläre DEVD-Caspasen in Zellysaten anhand der Absorption von pNA bei 405 nm gemessen (in absoluten Werten wiedergegeben). Erläuterung der Bezeichnungen „Substrat“, „Substrat + Inhibitor“ und „ohne Substrat“ in Abb. 36. Dargestellt ist eine exemplarische Testreihe mit Bestimmung der Absorptionen von Einzelwerten. 9L-*cd*-Zellen zeigen nach 5-FC-Behandlung eine geringe Caspase 3-Aktivität vor allem an Tag 2. An den Folgetagen der Behandlung sinkt diese wieder ab. Diese Enzymaktivität ist bei unbehandelten 9L-*cd*-Zellen nicht zu detektieren. Nach 5-FC-Behandlung zeigen weder die nicht transduzierte Ausgangszelllinie 9L noch die mit dem irrelevanten Suizidgen *tk* transduzierte Zelllinie 9L-*tk* eine signifikante Caspase 3-Aktivität.



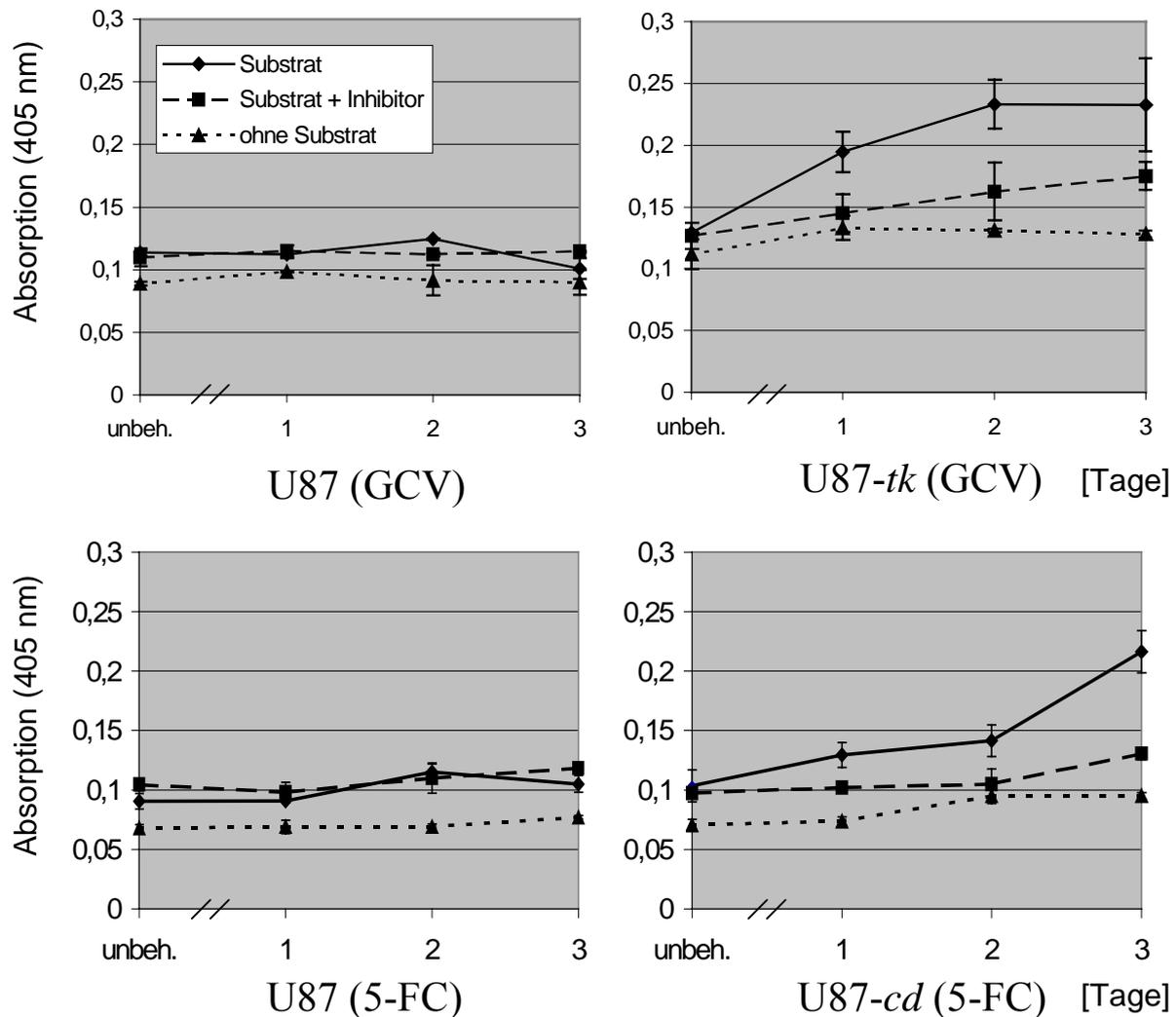


Abb. 39: DEVD-Caspasen werden bei U87 nach Gentherapie aktiviert. Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurden U87, U87-*tk* und U87-*cd* Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ GCV bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC behandelt. Unbehandelte Zellen („unbeh.“) wurden ebenfalls untersucht. Es wurden zu jedem Zeitpunkt Zellysate unter Zugabe von DEVD-pNA („Substrat“), unter Zugabe von DEVD-pNA und Caspase-Inhibitor („Substrat + Inhibitor“) sowie ohne Zugabe von Caspase-Substrat einer colorimetrischen Untersuchung auf DEVD-Caspase-Aktivität unterzogen. Dargestellt ist eine Messung der Absorptionen bei 405 nm (in absoluten Werten). Die Enzym-aktivitäten wurden anhand von Doppelwerten bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

U87-*tk*-Zellen zeigen bereits nach 24-stündiger GCV-Behandlung eine deutlich meßbare Caspase 3-Aktivität, die sich nach 48 h Behandlung auf einem maximalen Niveau befindet und nach 72 h noch gleich hoch ist. Unbehandelt ist bei U87-*tk* diese Enzymaktivität nicht meßbar. Die nicht transduzierte Ausgangszelllinie zeigt weder unbehandelt noch nach Behandlung mit GCV oder 5-FC eine signifikante Caspase 3-Aktivität. U87-*cd*-Zellen weisen nach 24 h Behandlung mit 5-FC nur eine geringe Caspase 3-Aktivität auf, die auch nach 48 h nur schwach steigt. Erst nach 72 h erreicht die Caspase 3-Aktivität hier ein Maximum, welches vergleichbar hohe Werte annimmt wie bei den 48 h lang mit GCV behandelten U87-*tk*-Zellen.

9. Ergebnisse der Untersuchungen zum Bystander-Effekt

9.1 Zytotoxizitätstests

Der Bystander-Effekt bezeichnet den zytotoxischen Effekt einer Therapie auf primär unbeteiligte, benachbarte Zellen. Bei der Suizidgentherapie versteht man darunter das Sterben nicht-transduzierter Zellen in der Nachbarschaft transduzierter Zellen nach Prodrug-Applikation. Die Ursachen dieses Effektes sind noch nicht im Detail geklärt, hierbei scheinen verschiedene Faktoren eine Rolle zu spielen. Auch bei den verschiedenen Suizidgensystemen gibt es Unterschiede. Metabolische Kooperation von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen, Austausch zytotoxischer Metabolite über Gap-Junctions oder Endocytose werden u.a. diskutiert. Im *E.coli-cd/5-FC*-System diffundiert der aktive Metabolit 5-FU direkt von Zelle zu Zelle. In vivo kann auch eine Verstärkung oder Aktivierung des Immunsystems oder eine Inhibition von Neovaskularisierung beteiligt sein. Bystander-Effekte sind keine obligate Begleiterscheinung von Suizidgentherapiesystemen, für das *HSV-tk/GCV* sowie das *E.coli-cd/5-FC*-System sind sie jedoch gut dokumentiert. Im Falle des *HSV-tk/GCV*-Systems sind jedoch auch schon Fälle von Resistenzen beschrieben worden. Auch scheint das Ausmaß des zu beobachtenden Bystander-Effektes sehr variabel zu sein.

Daher wurden in der vorliegenden Studie die stabil transfizierten Zelllinien zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nicht-transduzierte Zellen in Kokultur abzutöten.

Die mit dem *HSV-tk*-Gen transduzierten Zelllinien 9L-*tk*, U87-*tk* und 3T3-*tk* induzierten nach GCV-Applikation einen deutlichen Bystander-Effekt in kokultivierten, nicht transduzierten Ausgangszellen (Abb. 40). 10^5 Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 und 1:1 (nicht transduzierte : transduzierte Zellen) ausgesät und 96 h mit 10 µg/ml GCV behandelt. Parallel dazu wurden auch reine Kulturen sowie unbehandelte Kulturen untersucht (Kap. II. B 3.2.2). Alle Werte wurden als Triplikate angesetzt und sämtliche Tests in wenigstens zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen wiederholt.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (entspricht 100%), wiesen die nicht transduzierten Zellen nach Behandlung mit GCV keine signifikant verringerte Proliferation auf (U87: 72-81%, 3T3: 87-91%, 9L: 78-91%, Tab. 14, Abb. 40). Dementsprechend wäre in den kokultivierten Zellmischungen bei Abwesenheit eines Bystander-Effektes immer eine Überlebensrate zu erwarten, die dem prozentualen Anteil der nicht transduzierten Zellen entsprechen würde. Ist jedoch die auftretende Überlebensrate signifikant geringer als der Anteil nicht transduzierter Zellen, so liegt wahrscheinlich ein Bystander-Effekt vor. Der verbliebene Anteil überlebender, transduzierter Zellen kann hierbei vernachlässigt werden, da er nachweislich nur 1-2% beträgt. Das Verhältnis („V“, 0-1) der tatsächlich gemessenen Zellzahl zur rechnerisch erwarteten Zellzahl zeigt daher, ob ein Bystander-Effekt vorliegt, und vermittelt einen Eindruck von der Stärke dieses Effektes. Werte um $V = 1$ sind zu erwarten, wenn kein Bystander-Effekt vorliegt. Ist dagegen ein Bystander-Effekt vorhanden, sollte das Verhältnis deutlich geringer ($V < 1$) ausfallen.

9L-*tk*-Zellen induzierten einen deutlichen Bystander-Effekt, nicht nur bei der zugehörigen parentalen Zelllinie 9L ($V = 0,05$ bis $0,32$), sondern auch in xenogenen Mischungen mit der humanen Gliomzelllinie U87 ($V = 0,25$ bis $0,52$) und der Maus-Fibroblastenzelllinie 3T3 ($V = 0,05$ bis $0,38$). Dabei war der Bystander-Effekt bei Kokulturen mit einem hohen Anteil transduzierter Zellen im *HSV-tk/GCV*-System allgemein stärker ausgeprägt als bei Kulturen mit einem geringeren Anteil transduzierter Zellen. Am Auswertungstag wurden noch 1-2% der transduzierten 9L-*tk*-Zellen gezählt. Bei weiterer Inkubation dieser Zellen zeigte sich, daß diese transduzierten Zellen nicht weiter proliferierten und nach weiteren 2-3 Tagen vollständig abstarben.

U87-*tk*-Zellen induzierten in der zugehörigen nicht transduzierten Ausgangszelllinie U87 einen deutlichen Bystander-Effekt ($V = 0,16$ bis $0,39$), zeigten jedoch keinerlei Effekt auf 9L-Zellen ($V = 0,92$ bis $1,61$) und lediglich einen geringen Effekt auf 3T3-Zellen ($V = 0,44$ bis $0,68$). U87-*tk*-Reinkulturen starben unter der GCV-Behandlung bis auf 1% im Versuchszeitraum ab. Die weitere Kultivierung zeigte auch hier, daß die noch verbliebenen Zellen nach 2-3 zusätzlichen Inkubationstagen vollständig abstarben. Der beobachtete

Bystander-Effekt von U87-*tk* auf U87 war signifikant und verglichen mit 9L/9L-*tk*-Mischungen kaum geringer. Aber obwohl 9L-*tk* zytotoxisch auf U87 wirkten, blieb dieser Effekt aus, wenn U87-*tk* und 9L-Zellen kokultiviert wurden. Dieses Ergebnis konnte mit einer zweiten *tk*-transduzierten U87-Zelllinie (U87-*tk-CD4*) reproduziert werden (nicht gezeigt).

3T3-*tk*-Zellen induzierten nur einen vergleichsweise schwachen Bystander-Effekt auf 3T3 ($V = 0,3$ bis $0,57$), 9L ($V = 0,36$ bis $0,63$) und U87 ($V = 0,36$ bis $0,67$).

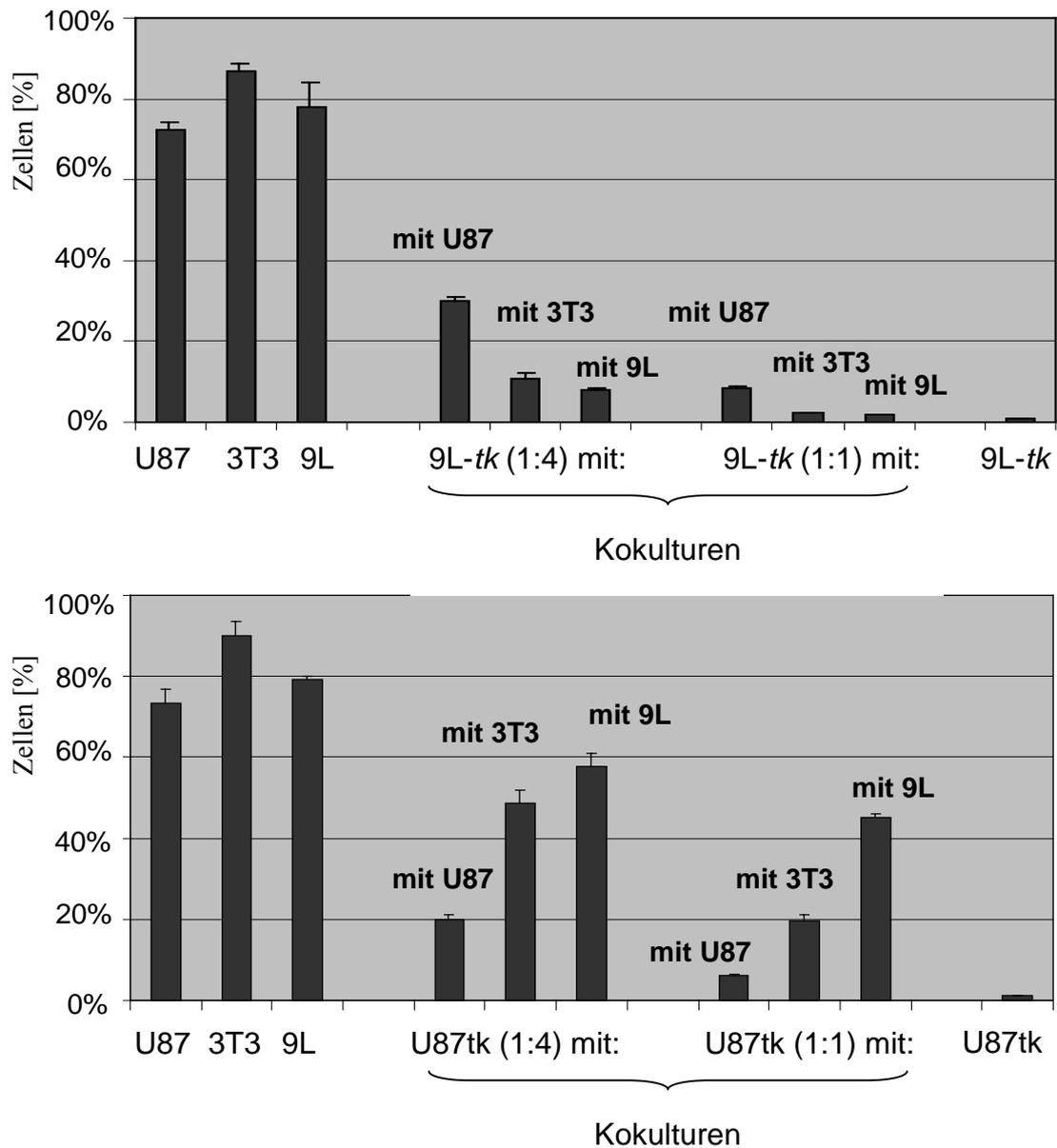


Abb. 40: 9L-*tk* induziert Bystander-Effekte nicht nur in der parentalen 9L-Zelllinie, sondern auch in den xeno-genen Zelllinien U87 und 3T3. U87-*tk* induziert Bystander-Effekte effizient nur in U87-Zellen, kaum jedoch in 3T3-Zellen und nicht in 9L-Zellen.

Dargestellt sind jeweils nur die Ergebnisse der behandelten Zellen, die entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden für jede Kohorte als 100%-Wert zur Grundlage der Berechnung der behandelten Zellen genommen. Es wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen als Triplikate ausgesät und 96 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ GCV behandelt. Die Zellzählung erfolgte im Anschluß an die Inkubationszeit und wurde in zwei voneinander unabhängigen Testreihen wiederholt. (Standardabweichungen der Triplikate als Fehlerbalken eingetragen.)

Zelllinien	Mischungsverhältnis	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		72 %		
3T3		87 %		
9L		78 %		
U87 / 9L- <i>tk</i>	4:1	30 %	58 %	0,52
3T3 / 9L- <i>tk</i>	4:1	11 %	70 %	0,16
9L / 9L- <i>tk</i>	4:1	8 %	62 %	0,13
U87 / 9L- <i>tk</i>	1:1	9 %	36 %	0,25
3T3 / 9L- <i>tk</i>	1:1	2 %	44 %	0,5
9L / 9L- <i>tk</i>	1:1	2 %	39 %	0,5
9L- <i>tk</i>		1 %		

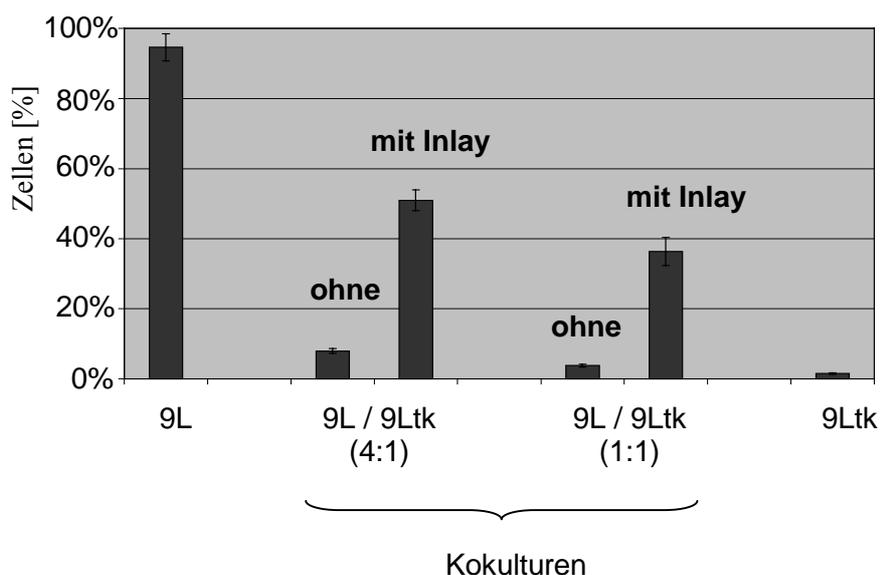
Zelllinien	Mischungsverhältnis	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		73 %		
3T3		90 %		
9L		79 %		
U87 / U87- <i>tk</i>	4:1	20 %	58 %	0,35
3T3 / U87- <i>tk</i>	4:1	49 %	72 %	0,68
9L / U87- <i>tk</i>	4:1	58 %	63 %	0,92
U87 / U87- <i>tk</i>	1:1	6 %	37 %	0,16
3T3 / U87- <i>tk</i>	1:1	20 %	45 %	0,44
9L / U87- <i>tk</i>	1:1	45 %	40 %	1,13
U87- <i>tk</i>		1 %		

Zelllinien	Mischungsverhältnis	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		72 %		
3T3		87 %		
9L		78 %		
U87 / 3T3- <i>tk</i>	4:1	39 %	58 %	0,67
3T3 / 3T3- <i>tk</i>	4:1	41 %	70 %	0,57
9L / 3T3- <i>tk</i>	4:1	39 %	62 %	0,63
U87 / 3T3- <i>tk</i>	1:1	13 %	36 %	0,36
3T3 / 3T3- <i>tk</i>	1:1	13 %	44 %	0,30
9L / 3T3- <i>tk</i>	1:1	14 %	39 %	0,36
3T3- <i>tk</i>		2 %		

Tab. 14: Ergebnisse der Untersuchungen zum Bystander-Effekt der mit dem HSV-*tk*-Gen transduzierten Zelllinien 9L-*tk*, U87-*tk* und 3T3-*tk*. 10^5 Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 und 1:1 (nicht transduzierte : transduzierte Zellen) ausgesät und 96 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ GCV behandelt. Parallel dazu wurden auch reine Kulturen sowie unbehandelte Kulturen untersucht (Kap. II. B 3.2.2). Alle Werte wurden als Triplikate angesetzt und die Tests in zwei voneinander unabhängigen Meßreihen wiederholt. Die gemessenen Zellzahlen beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrollprobe, deren Ergebnis gleich 100% gesetzt wurde. Als „erwartete“ Zellzahl wird derjenige Prozentsatz bezeichnet, der sich bei Fehlen eines Bystander-Effektes rein rechnerisch aus dem Anteil der behandelten nicht transduzierten Zellen ergibt. Der verbliebene Anteil überlebender transduzierter Zellen kann vernachlässigt werden, da er nur zwischen 1-2% beträgt. Das Verhältnis („V“) der tatsächlich gemessenen Zellzahl zur rechnerisch erwarteten Zellzahl zeigt, ob ein Bystander-Effekt vorliegt, und vermittelt einen Eindruck von dessen Stärke ($V \approx 1$, kein Bystander-Effekt, V signifikant < 1 , Bystander-Effekt).

Bei den *tk*-transduzierten Zelllinien ließ sich der Bystander-Effekt nur dann demonstrieren, wenn transduzierte und nicht transduzierte Zellen gemeinsam, in enger Nachbarschaft (d.h. ab einer Zelldichte, die Zell-Zell-Kontakte ermöglichte) kultiviert wurden. Wurden transduzierte und parentale Zellen jedoch in geringerer Dichte ($\leq 10^4$ Zellen unter den genannten Versuchsbedingungen, Kap. II. B 3.2.2) ausgesät oder mittels Schaleneinsätzen („Inlays“) mit zellundurchlässiger Porengröße während der Kultivierung räumlich voneinander getrennt (Abb. 4), so war dieser Effekt deutlich reduziert oder blieb aus (Tab. 14, Abb. 41).

Abb. 41: Der Bystander-Effekt im HSV-*tk*/GCV-System wird durch räumliche Trennung von transduzierten und parentalen Zellen aufgehoben. Im Vergleich wurden hier Kokulturen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen mit und ohne räumliche Trennung voneinander (mittels Inlays) über einen Zeitraum von 4 Tagen unter GCV-Behandlung (10 µg/ml) untersucht.



Insgesamt wurden jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Ansatz in Triplikaten ausgesät. Dargestellt sind jeweils nur die Ergebnisse der behandelten Zellen, die entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden für jede Kohorte gleich 100% gesetzt. Die Zellzählung erfolgte im Anschluß an die Inkubationszeit und wurde in voneinander unabhängigen Test-reihen reproduziert. Die Standardabweichung innerhalb der Gruppen ist als Fehlerbalken markiert. 9L-*tk*-Zellen induzieren signifikante Bystander-Effekte nur in der Kokultur ohne Inlays.

Zelllinien	Mischungsverhältnis	Kokultur			räumliche Trennung		
		gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		73 %			73 %		
3T3		88 %			88 %		
9L		95 %			95 %		
U87 / U87- <i>tk</i>	4:1	23 %	58 %	0,4	52 %	58 %	0,9
3T3 / 3T3- <i>tk</i>	4:1	32 %	70 %	0,46	72 %	70 %	1,03
9L / 9L- <i>tk</i>	4:1	8 %	76 %	0,11	51 %	76 %	0,67
U87 / U87- <i>tk</i>	1:1	13 %	37 %	0,35	25 %	37 %	0,68
3T3 / 3T3- <i>tk</i>	1:1	17 %	44 %	0,39	52 %	44 %	1,18
9L / 9L- <i>tk</i>	1:1	4 %	48 %	0,8	36 %	48 %	0,75
U87- <i>tk</i>		3 %			3 %		
9L- <i>tk</i>		2 %			2 %		
3T3- <i>tk</i>		2 %			2 %		

Tab. 15: Ergebnisse der Untersuchungen zur Abhängigkeit des Bystander-Effekts im HSV-*tk*/GCV-System von Zell-Zell-Kontakten. 10^5 Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 und 1:1 (nicht transduzierte : transduzierte Zellen) als Kokultur in 6-Well-Platten und als separierte Kulturen in 6-Well-Platten mit Schalen-einsätzen (räumlich getrennt) ausgesät und 96 h mit 10 µg/ml GCV behandelt. Parallel dazu wurden auch unvermischte Kulturen sowie unbehandelte Kulturen untersucht (Kap. II. B 3.2.3). Alle Werte wurden als Triplikate angesetzt und die Tests in zwei voneinander unabhängigen Meßreihen wiederholt. Die gemessenen Zellzahlen beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrollprobe, deren Ergebnis gleich 100% gesetzt wurde. Erklärungen zu „erwarteter“ und „gemessener“ Zellzahl, sowie zum Verhältnis „V“ können den Erläuterungen zur

Tab. 14 entnommen werden. Der verbliebene Anteil überlebender transduzierter Zellen in den Zellmischungen kann vernachlässigt werden, da er hier nur zwischen 2-3% beträgt. Der Bystander-Effekt ist in den Ansätzen, in denen transduzierte und parentale Zellen räumlich voneinander getrennt wurden deutlich reduziert bzw. ganz aufgehoben ($V \approx 1$).

Ein Bystander-Effekt wurde im *E.coli-cd/5-FC*-System, insbesondere in Zellmischungen mit nur einem geringen Anteil transduzierter Zellen (4:1), effektiver als im *HSV-tk/GCV*-System bewirkt. Dies galt für *U87-cd* und *9L-cd* gleichermaßen (Tab. 16, Abb. 42). In der Reinkultur wurde die Proliferation der nicht transduzierten Zellen durch die Behandlung mit 5-FC nicht beeinflusst (98 bis 107% der unbehandelten Kontrollen). Die transduzierten Zellen wurden durch die gleiche Behandlung effektiv abgetötet (0,4 bis 5% der unbehandelten Kontrollzellzahl). Nach weiteren 2-3 Inkubationstagen waren die transduzierten Zellen vollständig eliminiert. Der Bystander-Effekt war am deutlichsten ausgeprägt in *9L/9L-cd*-Mischungen ($V = 0,07$ bis $0,08$). *U87-cd*-Zellen induzierten in *U87*-Zellen ebenfalls einen deutlichen Bystander-Effekt ($V = 0,1$ bis $0,28$). Bemerkenswerterweise konnte in xenogenen Mischungen sowohl *9L-cd* den Zelltod von nicht transduzierten *U87*-Zellen ($V = 0,12$ bis $0,18$) als auch *U87-cd* den Tod von *9L*-Zellen ($V = 0,2$ bis $0,22$) effektiv induzieren. Im *HSV-tk/GCV*-System galt dies nur für Mischungen von *9L-tk* mit *U87*-Zellen, nicht jedoch für *U87-tk* und *9L*-Mischungen.

Wie beim *HSV-tk/GCV*-System ließ sich auch beim *E.coli-cd/5-FC*-System tendenziell eine höhere Ausprägung des Bystander-Effektes beobachten, wenn *9L*-Zellen als nicht-transduzierte Bystander-Zellen eingesetzt werden. *U87*-Zellen wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen weniger stark vom zytotoxischen Bystander-Effekt betroffen.

Zelllinien	Mischungsverhältnis	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		103 %		
9L		102 %		
U87 / 9L-cd	4:1	15 %	82 %	0,18
9L / 9L-cd	4:1	6 %	82 %	0,07
U87 / 9L-cd	1:1	6 %	52 %	0,12
9L / 9L-cd	1:1	4 %	51 %	0,08
9L-cd		4 %		

Zelllinien	Mischungsverhältnis	gemessene Zellzahl	erwartete Zellzahl	V
U87		103 %		
9L		102 %		
U87 / U87-cd	4:1	23 %	82 %	0,28
9L / U87-cd	4:1	16 %	82 %	0,2
U87 / U87-cd	1:1	5 %	52 %	0,1
9L / U87-cd	1:1	11 %	51 %	0,22
U87-cd		0,4 %		

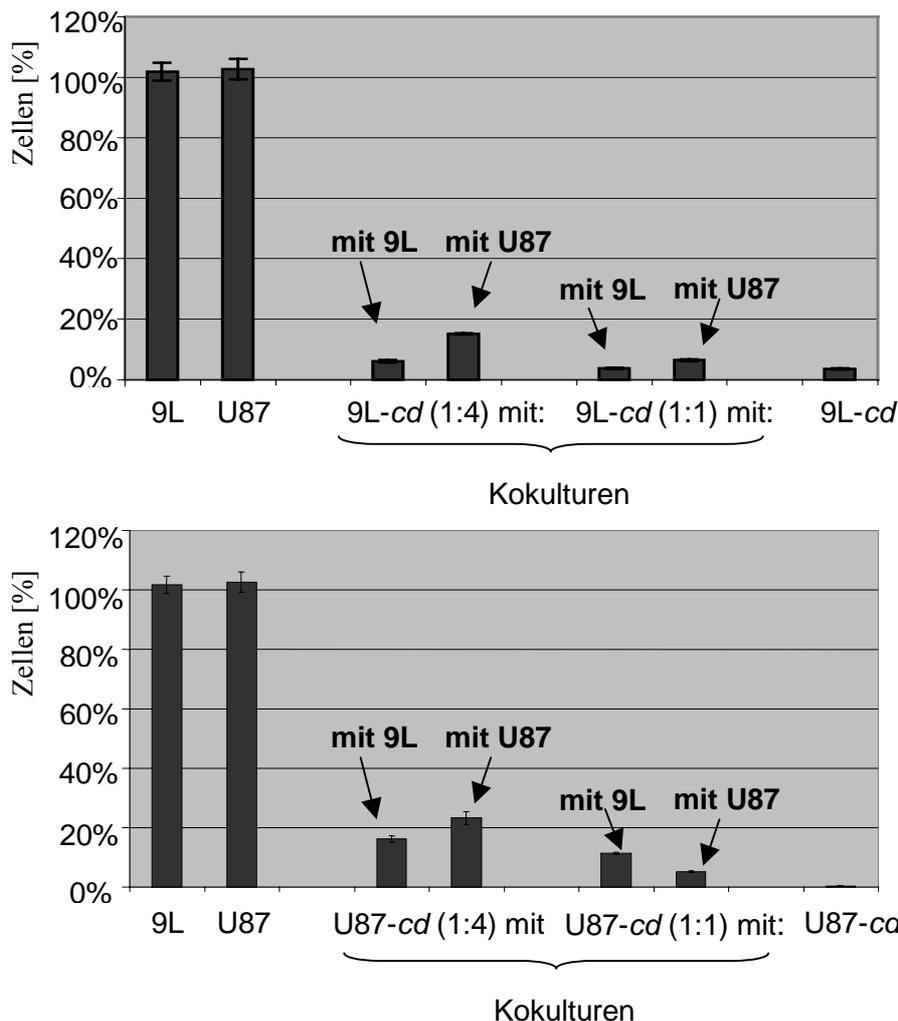
entnommen werden. Der verbliebene Anteil überlebender transduzierter Zellen kann vernachlässigt werden, da er hier nur zwischen 0,4-4% beträgt. Sowohl *9L-cd*- als auch *U87-cd*-Zellen induzieren in nicht transduzierten *9L*- und *U87*-Zellen starke Bystander-Effekte.

Tab. 16: Ergebnisse der Untersuchungen zum Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System. 10^5 Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 und 1:1 (nicht transduzierte : transduzierte Zellen) in 6-Well-Platten ausgesät und 96 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC behandelt. Parallel dazu wurden auch Reinkulturen sowie unbehandelte Kulturen untersucht (Kap. II. B 3.2.2). Alle Werte wurden als Triplikate und in zwei voneinander unabhängigen Meßreihen ermittelt. Die gemessenen Zellzahlen beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrollprobe, deren Ergebnis gleich 100% gesetzt wurde. Erklärungen zu „erwarteter“ und „gemessener“ Zellzahl, sowie zum Verhältnis „V“ können den Erläuterungen zur Tab. 14

Abb. 42: 9L-*cd* induziert Bystander-Effekte nicht nur in der parentalen 9L-Zelllinie, sondern auch in der xenogenen Zelllinie U87. U87-*cd* induziert ebenfalls effizient Bystander-Effekte sowohl in der nicht transduzierten U87-Zelllinie als auch in 9L-Zellen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der behandelten Zellen, die entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden für jede Kohorte als 100%-Wert zur Grundlage der Berechnung der behandelten Zellen genommen. Es wurden jeweils 10^5 Zellen in den jeweiligen Mischungsverhältnissen ausgesät und 96 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ 5-FC behandelt. Die Zellzählung erfolgte im Anschluß an die Inkubationszeit.

Sie wurde in Triplikaten in zwei voneinander unabhängigen Testreihen durchgeführt, von denen hier eine dargestellt ist (Standardabweichungen der Triplikate als Fehlerbalken).



Im Gegensatz zum HSV-*tk*/GCV-System zeigte sich der Bystander-Effekt im E.coli-*cd*/5-FC-System unabhängig von direktem Zellkontakt: Zur Überprüfung der Bedeutung der Zell-Zell-Kontakte für den Bystander-Effekt in diesem System wurden analog zu den Versuchen im HSV-*tk*/GCV-System transduzierte und nicht transduzierte Zellen während der Behandlung räumlich durch Einsätze getrennt und die Ergebnisse mit den entsprechenden Kokulturen verglichen (Tab. 17, Abb. 43).

Die nicht transduzierten Zelllinien erreichten in Reinkultur nach 5-FC-Behandlung Zellzahlen, die 78-102% der unbehandelten Kontrollen entsprachen. Die transduzierten Zelllinien U87-*cd* und 9L-*cd* zeigten erwartungsgemäß nur 0,3-5% der Zellzahlen der unbehandelten Kontrollen. In allen Zellmischungen, d.h. in Kokultur sowie in separierten Ansätzen, wurden mit $V \leq 0,16$ deutliche Bystander-Effekte induziert. Zwischen den Bystander-Effekten in Kokultur ($V = 0,01$ bis $0,16$) und nach räumlicher Separierung ($V = 0,02$ bis $0,16$) gab es keine signifikanten Unterschiede.

Es wurde sowohl im HSV-*tk*/GCV als auch im E.coli-*cd*/5-FC-System kontrolliert, ob die Bystander-Zellzählungen eventuell durch verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten beeinflusst wurden. Hierzu wurden parallel zu den Bystander-Ansätzen auch unvermischte nicht transduzierte Ausgangszellen nicht nur als 100%-Kontrollen ausgesät, sondern auch in 80% bzw. 50%-Ansätzen („100%“ = 10^5 Zellen, 80% = 8×10^4 Zellen, 50% = 5×10^4 Zellen). Diese wurden am Tag der Auszählung dahingehend überprüft, ob das

angegebene prozentuale Verhältnis noch stimmt. Wie immer wurden diese Proben als Triplikate ausgesät und sowohl behandelt als auch unbehandelt untersucht.

Diese Ansätze zeigten, daß die Populationen innerhalb eines Schwankungsbereiches von maximal $\pm 8\%$ entsprechend dieser Prozentvorgaben proliferierten und auch von der Behandlung mit Prodrugs nicht wesentlich beeinflusst wurden (nicht gezeigt). Die gemessenen Bystander-Effekte wurden also durch Proliferationseffekte nicht signifikant beeinflusst.

Zelllinien	Mischungsverhältnis	Kokultur			Räumliche Trennung		
		Gemessene Zellzahl	Erwartete Zellzahl	V	Gemessene Zellzahl	Erwartete Zellzahl	V
U87		78 %			78 %		
9L		102 %			102 %		
U87 / U87cd	4:1	5 %	62 %	0,8	10 %	62 %	0,16
9L / 9Lcd	4:1	6 %	82 %	0,7	8 %	82 %	0,1
U87 / U87cd	1:1	1 %	39 %	0,3	1 %	39 %	0,3
9L / 9Lcd	1:1	4 %	51 %	0,8	3 %	51 %	0,6
U87cd		0,3 %			0,3 %		
9Lcd		4 %			4 %		

Tab. 17: Ergebnisse der Untersuchungen zur Abhängigkeit des Bystander-Effekts im *E.coli-cd/5-FC*-System von Zell-Zell-Kontakten. 10^5 Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 und 1:1 (nicht transduzierte : transduzierte Zellen) als Kokultur in 6-well-Platten und als separierte Kulturen in 6-well-Platten mit Schalen-einsätzen (räumliche Trennung) ausgesät und 96 h mit $100 \mu\text{g/ml}$ 5-FC behandelt. Parallel dazu wurden auch unvermischte Kulturen sowie unbehandelte Kulturen untersucht (Kap. II. B 3.2.3). Alle Werte wurden als Triplikate angesetzt und die Tests in zwei voneinander unabhängigen Meßreihen wiederholt. Die gemessenen Zellzahlen beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Kontrollprobe, deren Ergebnis gleich 100 % gesetzt wurde. Erklärungen zu „erwarteter“ und „gemessener“ Zellzahl, sowie zum Verhältnis „V“ können den Erläuterungen zur Tab. 14 entnommen werden. Der verbliebene Anteil überlebender transduzierter Zellen kann vernachlässigt werden, da er nur zwischen 0,3-4 % beträgt. Der Bystander-Effekt ist in den Ansätzen, wo transduzierte und nicht transduzierte Zellen räumlich voneinander getrennt wurden nicht geringer als in den kokultivierten Proben. Die Ergebnisse dieser Meßreihen mit den zugehörigen Standardabweichungen sind in der Abb. 43 graphisch dargestellt.

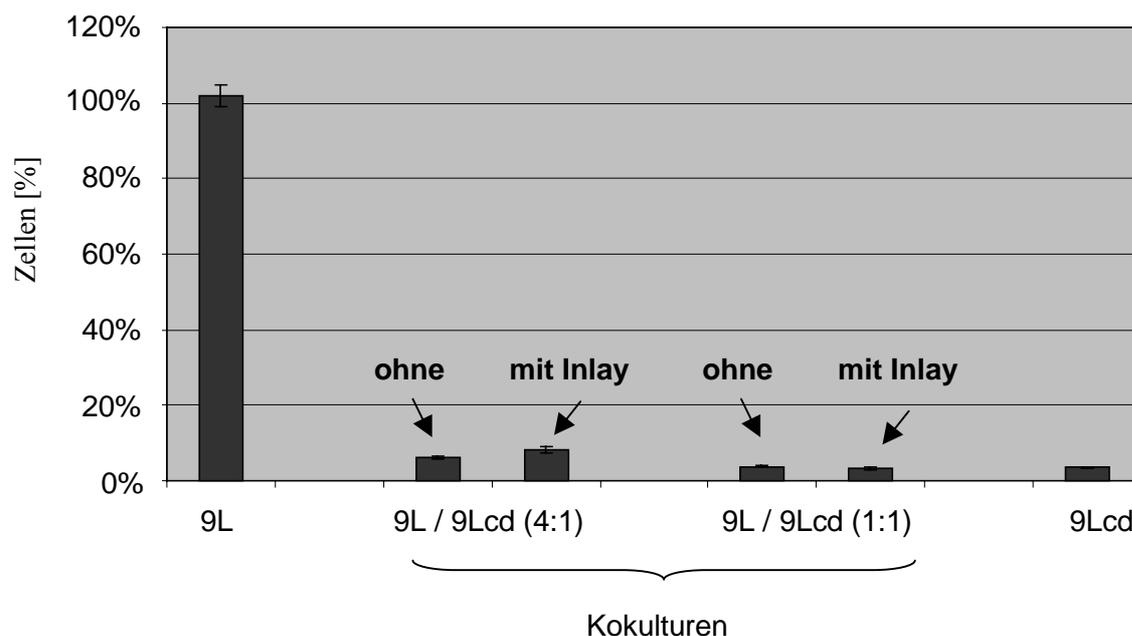


Abb. 43: Der Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System wird durch räumliche Trennung von transduzierten und nicht transduzierten Zellen nicht beeinträchtigt. Im Vergleich wurden kokultivierte und räumlich getrennte Ansätze von *cd*-transduzierten und den entsprechenden nicht transduzierten Zellen ($1 \cdot 10^4$ pro Ansatz, in Triplikaten) über einen Zeitraum von 4 Tagen unter 5-FC-Behandlung (100 $\mu\text{g/ml}$) untersucht. Zur Kontrolle wurden auch unbehandelte Zellen und die entsprechenden Mischungen untersucht und diese Zählergebnisse gleich 100% gesetzt. Dargestellt sind jeweils nur die Ergebnisse der behandelten Zellen, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen. Die Standardabweichung innerhalb dieser Gruppe ist als Fehlerbalken markiert. 9L-*cd*-Zellen induzieren signifikante Bystander-Effekte unabhängig von Zellkontakten.

9.2 Durchflußzytometrische und immunfluoreszenzmikroskopische Analysen

Untersuchungen von Samejima und Meruelo legten einen apoptotischen Bystander-Tod im HSV-*tk*/GCV-System nahe (1995). Zur Zeit fehlen jedoch noch Studien, die die beteiligten Signalwege näher beleuchten. Auch im *E.coli-cd/5-FC*-System sind diese noch nicht untersucht worden.

In Anlehnung an die in vorherigen Kapiteln dargestellten durchflußzytometrischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in Reinkulturen wurde hier versucht, die Bedeutung der verschiedenen Apoptose-Parameter in Bystander-Zellen zu bestimmen (vgl. Kap. III. 3). Isolierungen von Bystander-Zellen zur Analyse sind jedoch problematisch. Daher wurden verschiedene Vorgehensweisen ausgetestet, um Bystander-Populationen unabhängig von transduzierten Zellen zu analysieren: Analyse von Kokulturen, Untersuchung von räumlich getrennten Kulturen sowie Analysen nach spezifischer Markierung von Zellen.

9.2.1 Analyse apoptotischer Merkmale beim Bystander-Effekt im HSV-*tk*/GCV-System

Die durchflußzytometrischen Analysen wurden zunächst an gemischten Zellpopulationen durchgeführt. In der Literatur sind deutliche Bystander-Effekte auch schon bei sehr geringen Anteilen transduzierter Zellen gezeigt worden. Daher war zu hoffen, daß Apoptose-typische Merkmale in Bystander-Zellen indirekt auch in kokultivierten Zellmischungen gezeigt werden können. Dies sollte dann gelingen, wenn in Zellmischungen transduzierter und nicht transduzierter Zellen die Apoptose-typischen Merkmale bei einem Anteil der Zellen nachgewiesen werden kann, der denjenigen der transduzierten Zellen deutlich übersteigt.

Für die entsprechenden Untersuchungen wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei den Reinkulturexperimenten beschrieben (Kap. II. B 2.2.). Dabei wurden jeweils Zellmischungen von transduzierten

und nicht transduzierten in den Verhältnissen 1:1 und 4:1 analysiert. Ansätze von je $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden als Duplikate angefertigt und bis zu 3 Tagen mit GCV behandelt.

Im HSV-*tk*/GCV-System konnte auf diese Weise keine signifikante Ausprägung apoptotischer Merkmale bei Bystander-Zellen gezeigt werden (Tab. 18). Weder die PS-Exposition, der Zusammenbruch des MTPs noch der Sub-G₁-DNA-Gehalt konnte bei einem deutlich höheren Anteil der Zellen gezeigt werden als es dem Anteil transduzierter Zellen entsprechen würde. Dies galt für 9L- und U87-abgeleitete Zellen gleichermaßen. Die Ergebnisse faßt die Tab. 18 zusammen.

Die Resultate dieser Untersuchung schließen nicht aus, daß die gemessenen Parameter nicht doch zu einem gewissen Teil bei den nicht transduzierten Bystander-Zellen auftraten. Um diese Parameter direkt bei Bystander-Zellen im HSV-*tk*/System zu untersuchen, wurde die durchflußzytometrische Analyseverfahren variiert. Vor dem Ansetzen der Kokulturen wurden die transduzierten Zellen zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DiIC₁₈(3)) markiert (Abb. 44). Dieser lipophile Farbstoff integriert sich in die Zellmembran, hat keinen Einfluß auf die Zellphysiologie und bleibt aufgrund seiner hohen Fluoreszenzintensität auch nach Tagen noch detektierbar (Honig und Hume 1986). Nach der Markierung ($3 \cdot 10^6$ Zellen wurden 30 min in 6 ml RPMI-Medium mit 10 µM DiIC₁₈(3) gefärbt) wurden die Kokulturen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen erneut und analysiert. Die Abb. 44 zeigt einen typischen Ausschnitt aus einer solchen Kokultur nach 3 Tagen GCV-Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch vereinzelte vitale 9L-*tk*-Zellen zu entdecken, und morphologische Apoptosemerkmale wie z.B. Nukleuskondensation und -fragmentierung traten auch bei Bystander-Zellen auf.

Zellen (Mischungs- verhältnisse)	Behandlung	Dauer [Tage]	vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub G ₁ [%]
9L	unbehandelt	3	96	3	2	5
	GCV	1	94	5	4	5
		2	95	4	3	6
		3	95	4	3	5
9L- <i>tk</i>	unbehandelt	3	88	6	3	5
	GCV	1	78	15	5	7
		2	68	29	6	15
		3	32	31	13	13
9L/9L- <i>tk</i> (4:1)	unbehandelt	3	96	3	2	3
	GCV	1	94	5	2	4
		2	91	10	3	8
		3	89	8	2	9
9L/9L- <i>tk</i> (1:1)	unbehandelt	3	96	3	2	5
	GCV	1	92	7	5	7
		2	85	17	6	16
		3	81	16	3	15
U87	unbehandelt	3	92	8	3	4
	GCV	1	91	9	3	4
		2	92	10	4	5
		3	93	8	7	6
U87- <i>tk</i>	unbehandelt	3	91	10	3	4
	GCV	1	87	16	13	15
		2	77	40	21	56
		3	74	45	39	64
U87/U87- <i>tk</i> (4:1)	unbehandelt	3	85	9	5	5
	GCV	1	87	12	4	6
		2	86	15	8	14
		3	85	15	7	14
U87/U87- <i>tk</i> (1:1)	unbehandelt	3	86	9	4	5
	GCV	1	91	12	11	9
		2	84	23	14	39
		3	85	25	14	44

Tab. 18: Vitalität, PS-Exposition („PS-pos.“), Depolarisation der Mitochondrienmembran („MTP_{red.}“) und Verringerung des DNA-Gehalts („sub G₁“) von Rein- und Kokulturen nach Behandlung mit GCV. Für die Untersuchungen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie für die Reinkultur beschrieben (Kap. II. B 2.2). Neben den Reinkulturen wurden jeweils Zellmischungen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen in den Verhältnissen 1:1 und 4:1 analysiert. Ansätze von je $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden als Duplikate angefertigt und bis zu 3 Tage mit GCV (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt bzw. als Kontrolle unbehandelt gelassen. Im HSV-*tk*/GCV-System zeigte sich keine signifikante Ausprägung apoptotischer Merkmale bei Bystander-Zellen. Der Anteil positiver Zellen beschränkte sich weitgehend auf den prozentualen Anteil der transduzierten Zellen. (Weitere Erklärungen zur Tabelle können der Tab. 7 entnommen werden.)

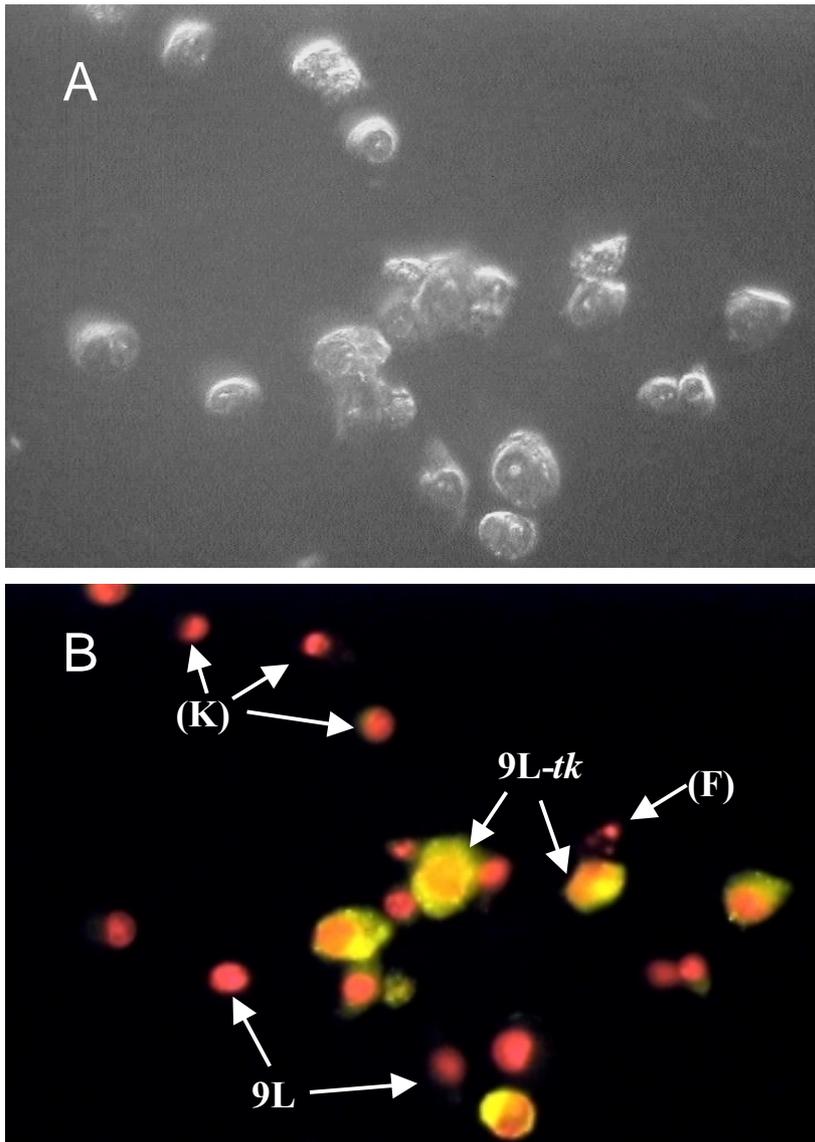


Abb. 44: Experiment zum Bystander-Effekt mit Fluoreszenz-markierten 9L-*tk*-Zellen, im Verhältnis von 1:4 mit nicht transduzierten 9L-Zellen gemischt. Vor der Aussaat der Zellen wurden 9L-*tk*-Zellen mit dem Membranfarbstoff DiIC₁₈ markiert (gelbe Fluoreszenz). Die kokultivierten 9L- und 9L-*tk*-Zellen wurden drei Tage lang mit GCV (10 µg/ml) behandelt und anschließend durchflußzytometrisch auf PS-Exposition und MTP-Veränderungen untersucht. Hier dargestellt ist die DNA-Färbung mit PI (rote Fluoreszenz) nach Ethanol-Fixierung und RNase-Verdau. Aufgrund der Überlappung der Fluoreszenzspektren von PI und DiIC₁₈ kann dieser Parameter (Zellzyklusanalyse) nicht durchflußzytometrisch untersucht werden. Fluoreszenzmikroskopisch ist eine Unterscheidung der beiden Farbstoffe jedoch gut möglich.

(A) zeigt die durchlichtmikroskopische Aufnahme des Ausschnitts, der in (B) fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen wurde (400x Vergrößerung).

Die Nuclei der Bystander-Zellen (9L, nur rote Fluoreszenz) zeigten apoptotische Veränderungen wie z.B. Kondensation und Fragmentierung.

Erklärung der Pfeile: (F) Nukleusfragmentierung, (K) Kondensation, außerdem sind 9L- und 9L-*tk*-Zellen gekennzeichnet.

DiIC₁₈(3) ist ein fluoreszierender Farbstoff, dessen Fluoreszenzspektrum teilweise mit dem von PI überlappt. Die für die Untersuchung der Phosphatidylserin (PS)-Exposition oder des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, DiOC₆(3)) besitzen aber hiervon deutlich differenzierbare Fluoreszenzspektren.

Durch die spezifische Fluoreszenzmarkierung (Abb. 45) der transduzierten Zellen konnten die Apoptoseparameter PS-Exposition und MTP-Verringerung bei den ungefärbten Bystander-Zellen direkt analysiert werden. Wie sich hier zeigte, war auch ein Teil der 9L-Bystander-Zellen AnnexinV-positiv, d.h. apoptotisch. Eine Verringerung des MTPs spielte beim Bystander-Effekt im 9L-Zellmodell (wie auch bei den reinen, transduzierten 9L-*tk*-Zellen) anscheinend keine wesentliche Rolle bzw. trat erst sehr spät auf.

Die Abb. 45 und 46 zeigen typische Ergebnisse des AnnexinV-Bindungstests im 9L-Modell nach Fluoreszenzmarkierung der transduzierten 9L-*tk*-Zellen. In Abb. 45. A, B ist zunächst die AnnexinV-FITC/PI-Färbung von nicht markierten transduzierten 9L-*tk*-Zellen gezeigt. Diese reagierten auf 3-tägige GCV-Behandlung (wie bereits in Kap. 3.2 beschrieben) mit der Exposition von PS, was zu einer deutlichen Bindung des Fluoreszenz-gekoppelten Annexin V und damit zu einer Zunahme der grünen Fluoreszenz der Zellen führte. 54% aller transduzierten Zellen waren AnnexinV-positiv (apoptotisch), 38% waren nicht mehr vital und nur 8% waren noch vital, aber nicht AnnexinV-positiv (Abb. 45. B). Reine 9L-Zellen waren selbst nach 3-tägiger GCV-Behandlung nur zu 3% AnnexinV-positiv, 11% der Zellen waren nicht mehr vital und 86% waren vital und banden AnnexinV nicht (Abb. 45. F). Dieses Ergebnis war dem der unbehandelten 9L-Zellen sehr ähnlich: 88% der Zellen waren vital und nicht apoptotisch, nur 1% AnnexinV-bindend und 11% der Zellen waren nicht vital (Abb. 44. E). Nach der Fluoreszenzmarkierung der transduzierten Zellen zeigten diese deutlich in den Bereich der PI-Fluoreszenz (Abb. 45. C, D). Auch nach Färbung mit AnnexinV-FITC waren von diesen transduzierten Zellen nur 2% in dem für die Messung der Bystander-Zellen entscheidenden Quadranten (unten rechts) zu detektieren. Die Analyse der Zellmischungen zeigte einen (wenn auch relativ geringen) Anteil (11%) nicht transduzierter Zellen nach der GCV-Behandlung in diesem Quadranten (Abb. 46. B, D). Hierbei handelte es sich also um apoptotische 9L-Bystander-Zellen. Die unbehandelten Kontrollen zeigten in diesem Quadranten nur 1-2% AnnexinV-positiv Zellen (Abb. 46. A, C).

Die Abb. 46. E und F zeigen diese Ergebnisse nur auf die vitalen Bystander-Zellen bezogen. Die transparente Kurve im Histogramm zeigt unbehandelte Zellen nach AnnexinV-FITC-Färbung: Diese waren nur schwach und unspezifisch fluoreszent. Die grau unterlegte Kurve zeigt das Ergebnis der Bystander-9L-Zellen nach GCV-Behandlung: Bei einer 4:1-Mischung mit 9L-*tk*-Zellen waren 15% der 9L-Zellen hoch AnnexinV-FITC-fluoreszent (= apoptotisch), bei einer 1:1-Mischung waren es sogar 20%.

Diese Ergebnisse konnten in einer unabhängigen Wiederholung des Versuches bestätigt werden.

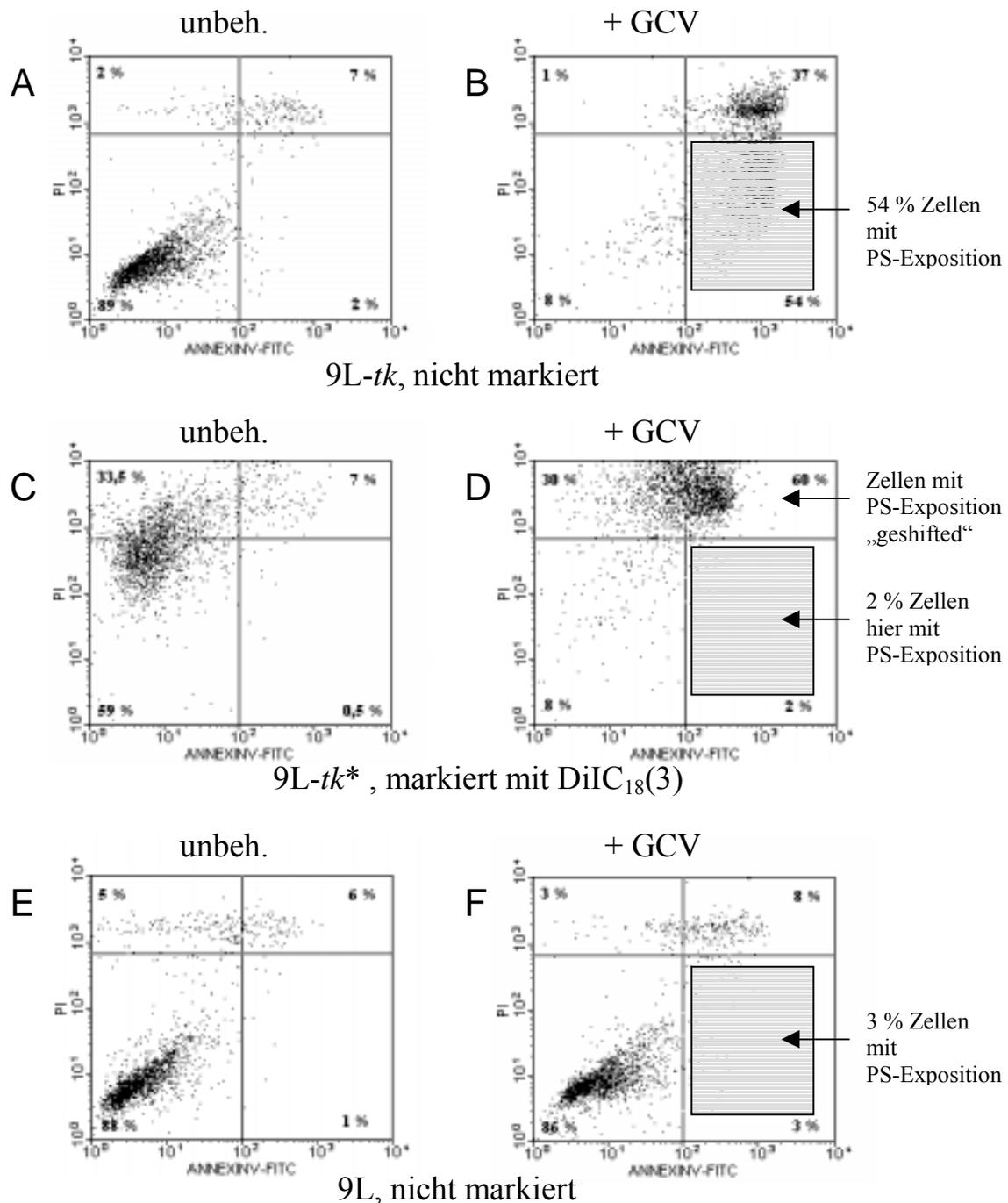


Abb. 45: Kontrollansätze zur Analyse der PS-Exposition bei Bystander-Zellen nach Fluoreszenzmarkierung. Transduzierte nicht markierte 9L-*tk*-Zellen zeigen nach GCV-Behandlung eine deutliche Annexin V-Bindung (= PS-Exposition, s. Pfeil) (B), dies ist bei unbehandelten 9L-*tk*-Zellen nicht festzustellen (A). Nach Markierung (C, D) mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiIC₁₈(3) „shiften“ die transduzierten Zellen in die oberen Quadranten, aufgrund der Überlappung der Fluoreszenzspektren von PI und DiIC₁₈(3). Selbst nach Behandlung mit GCV bleibt jedoch der untere rechte Quadrant, der dementsprechend AnnexinV-positive Bystander-Zellen repräsentiert, frei von 9L-*tk*-Zellen (nur 2%, s. Pfeil) (D). 9L-Zellen zeigen als Reinkultur weder unbehandelt (E) noch nach GCV-Behandlung (F) eine signifikante PS-Exposition. Die Zellen (je $4 \cdot 10^5$) wurden 3 Tage mit GCV (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Die zugehörigen Ergebnisse der Bystander-Kokulturen zeigt die folgende Abbildung.

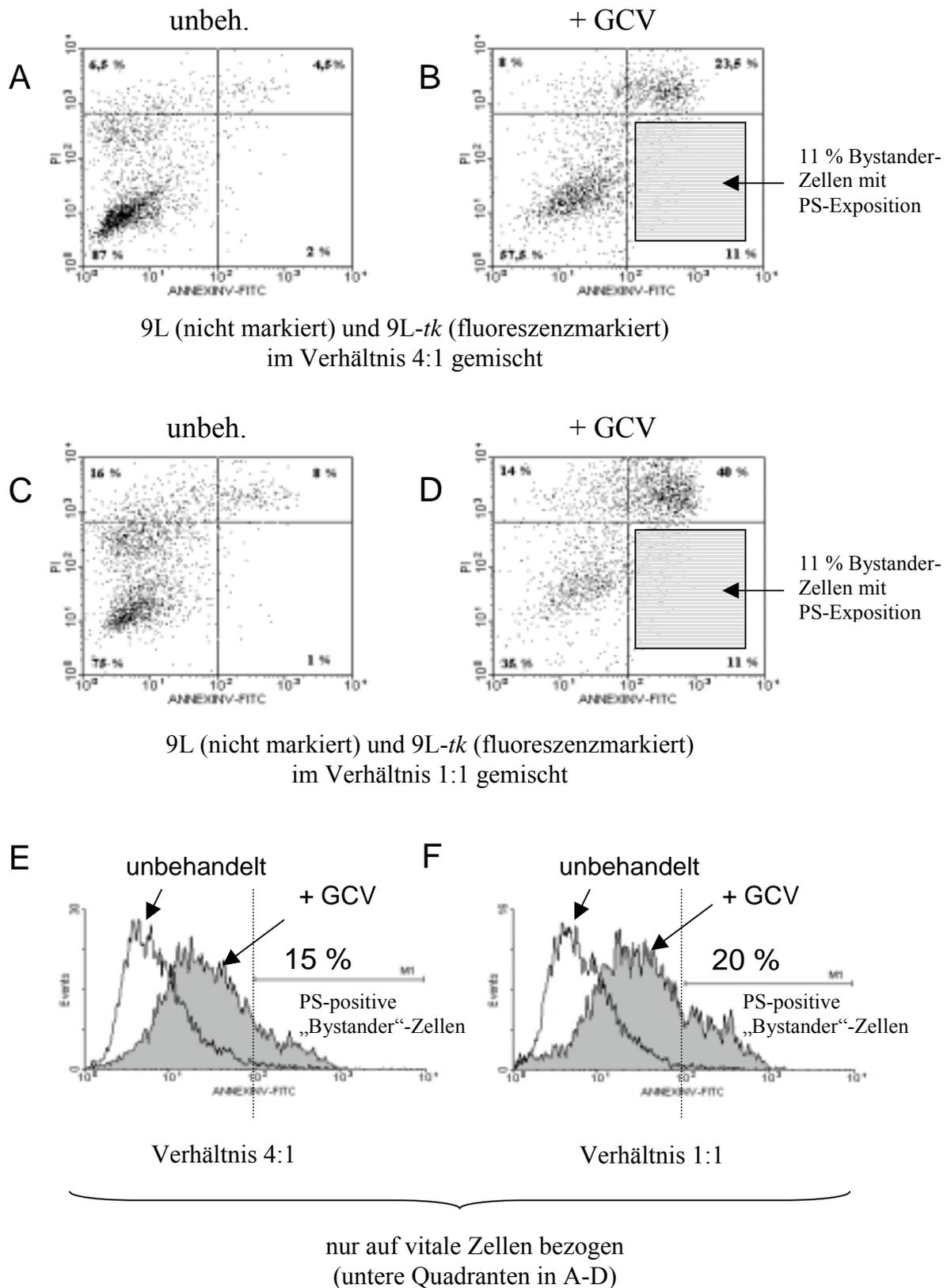


Abb. 46: Fortsetzung des in Abb. 44 dargestellten Experimentes. Nicht transduzierte 9L-Zellen wurden in den Mischungsverhältnissen 4:1 (A, B) und 1:1 (C, D) mit fluoreszenzmarkierten transduzierten 9Ltk-Zellen gemischt und 3 Tage lang kokultiviert. In den mit GCV-behandelten Ansätzen (B, D) zeigt sich nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI ein Anteil von 11% der Zellen im unteren rechten Quadranten (s. Pfeil), d.h. mit hoher AnnexinV-Bindung. Diese Zellen haben also infolge von Apoptose PS auf ihrer Außenseite exponiert, wo es nun

AnnexinV binden kann. Es handelt sich hierbei um Bystander-9L-Zellen, da die fluoreszenzmarkierten transduzierten Zellen nur in den oberen Quadranten detektiert werden (Abb. 45). Die unbehandelten Kontrollen zeigen 1-2% AnnexinV-positiver, PI-negativer Zellen (A,C). Betrachtet man diese Ergebnisse im Histogramm (E, F) bezogen auf die vitalen Zellen der Analyse, so sind in der 4:1-Mischung 15% der vitalen Zellen Annexin V-positiv (= apoptotisch). In der 1:1-Mischung sind es 20%. Die transparente Kurve zeigt die unbehandelten vitalen Zellen nach Färbung mit Annexin V-FITC, die grau unterlegte Kurve die mit GCV-behandelten. Der Marker M1 sowie die gestrichelte Linie demonstrieren den Schwellenwert, ab dem im Vergleich zur Kontrolle signifikante AnnexinV-Bindung auftrat.

Zumindest ein Teil der Bystander-9L-Zellen scheint also apoptotisch zu sterben.

Die Untersuchung des Mitochondrientransmembranpotentials (MTP) zeigten, daß Bystander-9L-Zellen nur vereinzelt und dann sehr spät (d.h. kurz vor Beginn der PI-Durchlässigkeit) depolarisierte Mitochondrien aufweisen (Abb. 47). Der größte Teil der Zellen mit geringem MTP hatte vermutlich erst sekundär nach dem Verlust der Vitalität die Fähigkeit verloren, ein Transmembranpotential aufrechtzuerhalten. In (A, B) sind die mit dem Membranfarbstoff DiIC₁₈(3) fluoreszenzmarkierten transduzierten 9L-*tk*-Zellen dargestellt. Für die Untersuchung des MTPs wurden die Zellen mit dem MTP-Farbstoff DiOC₆(3) und PI gefärbt. Insbesondere nach GCV-Behandlung (B) interferierten die so markierten Zellen nicht mit dem für die Analyse der Bystander-Zellen wichtigen Bereich (als grau unterlegtes Rechteck markiert). Reine nicht markierte 9L-Zellen (C, D) zeigten weder unbehandelt noch nach GCV-Behandlung einen Rückgang der DiOC₆(3)-Fluoreszenz, der eine Depolarisierung von Mitochondrien anzeigen würde. Auch bei den Mischkulturen von markierten 9L-*tk*-Zellen und nicht markierten Bystander-9L-Zellen war kein signifikanter Rückgang dieser Fluoreszenz zu beobachten, weder unbehandelt (E, G) noch nach GCV-Behandlung (F, H). Die vitalen Zellen mit depolarisierten Mitochondrien, die sich in dem gekennzeichneten Bereich (graues Rechteck) befinden müßten, betrogen hier nur wenige Prozent der Gesamtpopulation. Der überwiegende Teil der Zellen verlor seine Vitalität (wurde PI-positiv), ohne seine DiOC₆(3)-Fluoreszenz zu verringern. Ein kleinerer Teil der Population verlor gleichzeitig seine Vitalität und zeigte ein verringertes MTP, dies wurde dann als ein spätes Ereignis gewertet.

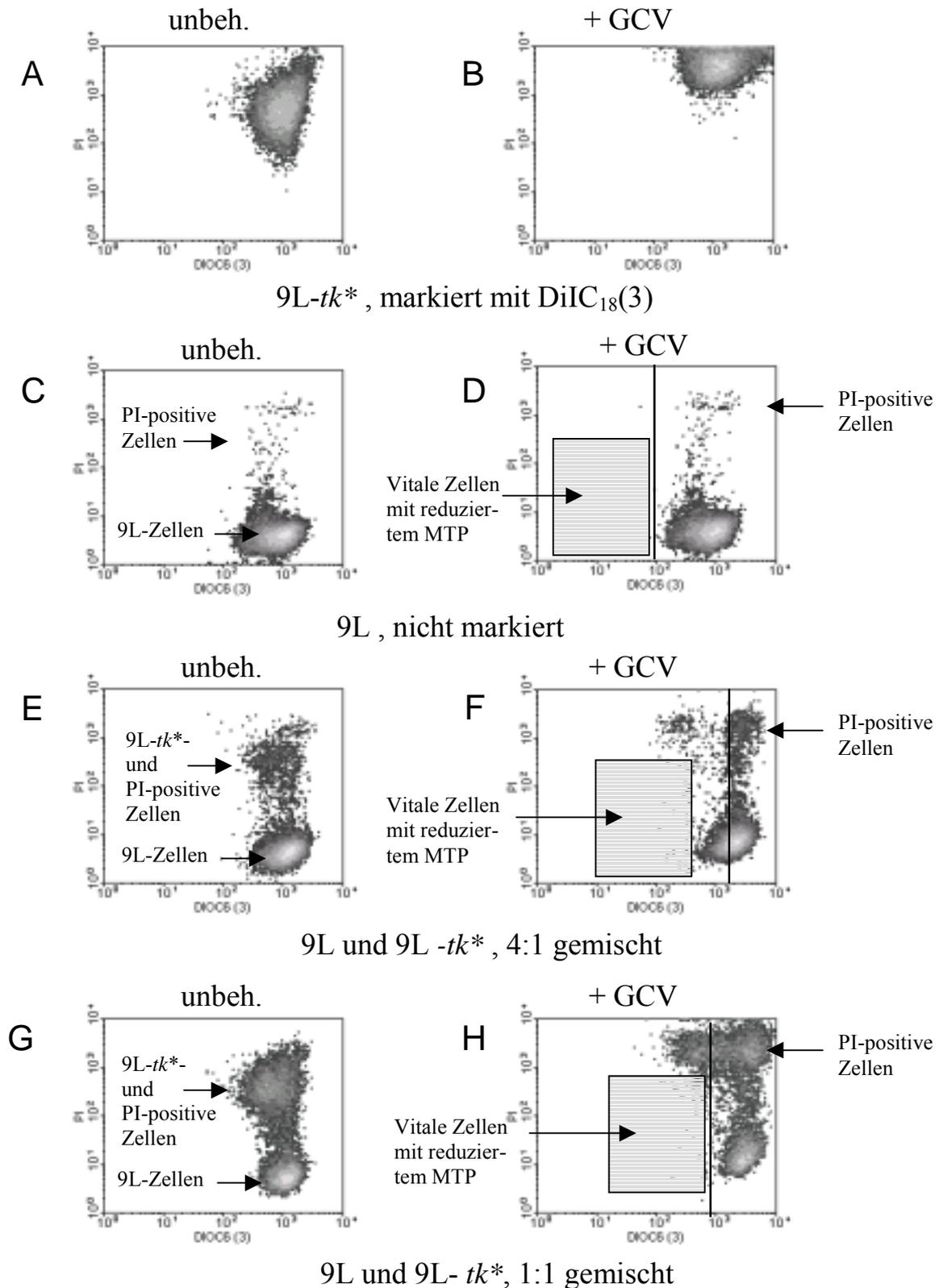


Abb. 47: Die durchflußzytometrische Analyse des Mitochondrientransmembranpotentials (MTP) zeigt, daß By-stander-9L-Zellen nur vereinzelt (und dann sehr spät) depolarisierte Mitochondrien aufwiesen. In (A, B) sind die reinen, mit dem Membranfarbstoff DiOC₆(3) fluoreszenzmarkierten („*“) transduzierten 9Ltk-Zellen dargestellt. Für die Untersuchung des MTPs wurden die Zellen mit dem MTP-Farbstoff DiOC₆ und PI gefärbt. Diese störten den für die Analyse der Bystander-Zellen wichtigen Analysebereich nicht (graue Rechtecke). Reine nicht transdu-

zierte und nicht markierte 9L-Zellen zeigen weder unbehandelt (C) noch nach GCV-Behandlung (D) einen Rückgang der DiOC₆(3)-Fluoreszenz, der eine Depolarisierung von Mitochondrien anzeigen würde. Auch bei den Mischkulturen von markierten 9L-*tk*-Zellen und nicht markierten Bystander-9L-Zellen (in den Verhältnissen 1:4 und 1:1) ist kein signifikanter Rückgang dieser Fluoreszenz zu beobachten, weder unbehandelt (E, G) noch nach GCV-Behandlung (F, H). In diesen Mischkulturen sind in den unbehandelten Proben exemplarisch die 9L und 9L-*tk*-Zellen markiert (s. Pfeile). Die vitalen Zellen mit depolarisierten Mitochondrien, die sich in dem gekennzeichneten Bereich (graues Rechteck) befinden würden, sind hier nicht signifikant vertreten. Der überwiegende Teil der Zellen verliert seine Vitalität (wird PI-positiv), ohne seine DiOC₆(3)-Fluoreszenz zu verringern. Ein kleinerer Teil der Population verliert seine Vitalität und zeigt dabei ein verringertes MTP, dies wurde als ein spätes Ereignis gewertet. (Aufgrund der erniedrigten Zellzahl je Probe in den GCV-behandelten und zytotoxisch davon betroffenen Proben ergibt sich dort eine artifizielle leichte Erhöhung der DiOC₆(3)-Fluoreszenz (B, F, H), die die Analyse jedoch nicht beeinträchtigt.)

Aufgrund der Überlappung der Fluoreszenzspektren des Markierungsfarbstoffes DiIC₁₈(3) und PI konnten Zellzyklusstudien nicht nach Markierung der transduzierten Zellen durchgeführt werden. Die im folgenden dargestellten Zyklusuntersuchungen beziehen sich daher auf nicht markierte Mischkulturen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen.

Nach Mischung transduzierter und nicht transduzierter Zellen wurde die Auswirkung dieser Vermischung auf den Zyklus der Zellen nach GCV-Behandlung untersucht. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit GCV (10 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Die durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse wurde im Anschluß an die Fixierung der Zellen direkt durchgeführt.

GCV-Behandlung bewirkte bei transduzierten 9L-*tk*-Zellen bereits nach 24 h einen vollständigen Arrest der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (wie auch in Kap. 5 beschrieben). Während nicht transduzierte 9L-Zellen nach GCV-Behandlung keine solche Reaktion zeigten: Hier wurden nur 5-10% mehr S-Phase-Zellen beobachtet als bei unbehandelten Zellen. Nach Mischung von transduzierten und nicht transduzierten Zellen schienen auch die nicht transduzierten 9L-Zellen nach GCV-Behandlung vermehrt in der S-Phase zu akkumulieren: Bei einem Anteil von nur 20% transduzierter Zellen (4:1-Mischung) waren nach 24 h 62% aller Zellen in der S-Phase, im unbehandelten Zustand waren es nur 35%. Bei einem Anteil von 50% transduzierter Zellen fanden sich sogar 84% der GCV-behandelten Zellen und nur 33% der unbehandelten Zellen in der S-Phase. Diese Akkumulation von Zellen in der S-Phase war signifikant höher als anhand des jeweiligen Mischungsverhältnis von 9L und 9L-*tk*-Zellen zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis wurde in unabhängigen Tests bestätigt. Der durch die GCV-Behandlung bei transduzierten Zellen induzierte Effekt „S-Phase-Akkumulation“ schien sich daher nach Mischung mit nicht transduzierten Zellen auf diese zu übertragen. Die Stärke des Effektes schien dann abhängig von dem Mengenverhältnis der beiden Populationen zueinander zu sein. Die Ergebnisse faßt die folgende Tabelle zusammen:

Zellen (Mischungsverhältnisse)	Zyklusphase	unbeh.	24 h GCV	48 h GCV	72 h GCV
9L	G ₁ /G ₀	47,8 %	48,2 %	44,1 %	41,6 %
	S	46,8 %	47 %	50,9 %	50,4 %
	G ₂ /M	5,4 %	4,8 %	5 %	8,1 %
9L- <i>tk</i>	G ₁ /G ₀	58,8 %	0 %	0 %	38,2 %
	S	33,2 %	98,5 %	100 %	61,8 %
	G ₂ /M	8 %	1,5 %	0 %	0 %
9L/9L- <i>tk</i> (4:1)	G ₁ /G ₀	49,9 %	28 %	22,2 %	30,4 %
	S	35,2 %	62,6 %	69,4 %	69,6 %
	G ₂ /M	14,9 %	9,4 %	8,4 %	0 %
9L/9L- <i>tk</i> (1:1)	G ₁ /G ₀	48 %	15,3 %	18,7 %	28,8 %
	S	32,9 %	84,7 %	81,3 %	71,2 %
	G ₂ /M	9,1 %	0 %	0 %	0 %

Tab. 19: Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten 9L-*tk*- und nicht transduzierten 9L-Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit GCV (10 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-Software (Vers. 2.0) analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelproben dar. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₁/G₀, S und G₂/M, die anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100 %. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. 24 h nach Behandlung mit GCV zeigt sich sowohl bei den transduzierten als auch bei den Zellen in Mischungskulturen ein S-Phase-Arrest. In den Mischungskulturen fällt diese Akkumulation von Zellen in der S-Phase deutlich höher aus, als aufgrund des Anteils der transduzierten Zellen zu erwarten wäre. Bei reinen nicht transduzierten 9L-Zellen ist kein signifikanter S-Phase-Arrest festzustellen.

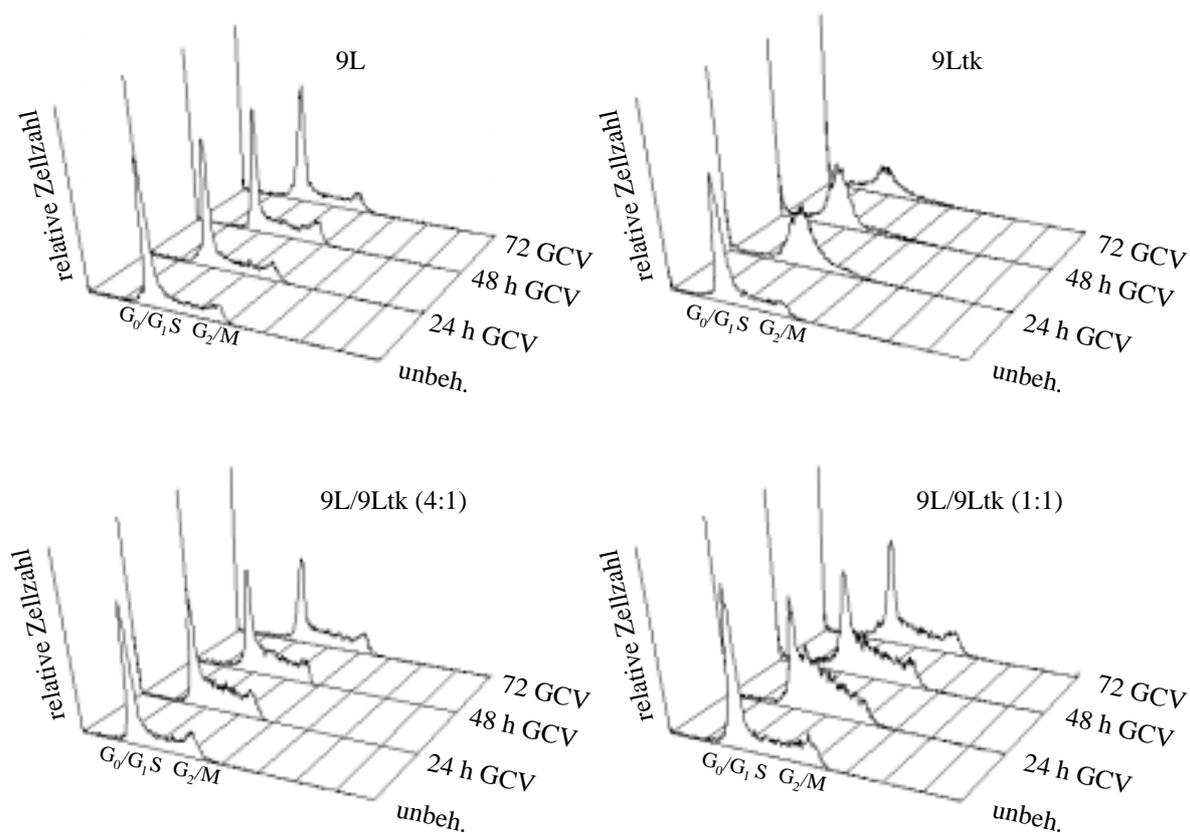


Abb. 48: Darstellung der Ergebnisse der vorherigen Tabelle (Tab. 19). Rein- bzw. Kokulturen von 9L- und 9L-*tk*-Zellen wurden einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse unterzogen. Nähere Angaben zur Probenpräparation können der Tab. 19 entnommen werden.

Die Histogrammgruppen fassen jeweils eine unbehandelte sowie drei unterschiedlich lange (24-72 h) mit GCV-behandelte Zellproben zusammen. Diese Gruppen sind zum einen die Reinkulturen 9L (oben links) und 9L-*tk* (oben rechts) sowie die Kokulturen von 9L und 9L-*tk* in den Verhältnissen 4:1 (unten links) bzw. 1:1 (unten rechts). Das Histogramm zeigt jeweils die PI-Fluoreszenz (x-Achse) in Relation zur Zellzahl (y-Achse). Die Lage der einzelnen Zellzyklusphasen (G_0/G_1 , S, G_2/M) entlang der x-Achse sind gekennzeichnet. Die Akkumulation der 9L-*tk*-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus bereits nach 24 h GCV-Behandlung wird hier deutlich. Auch die relative Unverändertheit der Zellzyklusverteilung der nicht transduzierten 9L-Zellen nach GCV-Behandlung wird ersichtlich. Bei den Kokulturen ist zwar eine S-Phase-Akkumulation ersichtlich, zur Beurteilung des Ausmaßes mußten diese jedoch mittels ModFit-Software einer genaueren Analyse (Tab. 19) unterzogen werden. Diese zeigt, daß zumindest ein Teil der Bystander-9L-Zellen in Kokultivierung mit den 9L-*tk*-Zellen einen S-Phase-Arrest aufweisen.

Die Auswertung der Mischungsexperimente von nicht transduzierten U87- und transduzierten U87-*tk*-Zellen zeigte, daß ebenso wie im 9L-Modell auch ein Teil der U87-Bystander-Zellen nach Behandlung mit GCV einen S-Phase-Arrest eingehen (Tab. 20, Abb. 49). Dieser Effekt war deutlicher, als anhand des Mischungsverhältnisses der Zellen zu erwarten gewesen wäre, wenn ausschließlich transduzierte Zellen vermehrt in der S-Phase akkumulieren würden. Die Akkumulation von Zellen in der S-Phase ist bei den verschiedenen Mischungskulturen (4:1 bzw. 1:1) nach 24 h nicht so unterschiedlich, wie aufgrund des

Anteils transduzierter Zellen zu erwarten wäre: Bei einem Anteil von nur 20% transduzierter Zellen akkumulierten nach 24 h schon 25% mehr Zellen in der S-Phase als in der unbehandelten Kontrolle, bei einem Anteil von 50% waren dies 24% und bei reinen transduzierten U87-*tk*-Zellen waren es 32%. Bei reinen, nicht transduzierten U87-Zellen war ebenfalls ein leichter S-Phase-Arrest festzustellen, dieser betrug nach 24 h jedoch nur 9%. Zumindest in den 4:1-gemischten Kokulturen war ein größerer Anteil an Zellen in der S-Phase zu detektieren, als zu erwarten gewesen wäre, wenn lediglich U87-*tk*-Zellen nach GCV-Behandlung hier akkumulieren würden. Ein Unterschied der verschiedenen Mischungskulturen zueinander bestand aber im Ausmaß an zu beobachtender Apoptose. Apoptotische Zellen wurden hier als „Sub-G₁-Ereignisse“ verstanden, da apoptotische Zellen typischerweise einen Teil ihrer DNA verlieren und dann einen subdiploiden, also Sub-G₁-DNA-Gehalt aufweisen. Bestimmte man den Anteil dieser Ereignisse, so zeigte sich bei den 1:1 gemischten Kulturen nach 2-tägiger GCV-Behandlung ein Anteil von 40% apoptotischer Zellen. Nach 3 Tagen Behandlung waren es weiterhin noch 40%. Bei den Mischungen mit einem geringeren Anteil transduzierter Zellen (20%, 4:1) waren nur 12% der Zellen nach 2 Tagen und 10% nach 3 Tagen apoptotisch.

Die Ergebnisse der Zyklusanalysen faßt die folgende Tabelle zusammen:

Zellen (Mischungs- verhältnisse)	Zyklusphase	unbeh.	24 h GCV	48 h GCV	72 h GCV
U87	G ₁ /G ₀	63,1 %	54,2 %	53,3 %	47,4 %
	S	29,2 %	38,2 %	40,4 %	45,4 %
	G ₂ /M	7,7 %	7,6 %	6,3 %	7,2 %
U87- <i>tk</i>	G ₁ /G ₀	54,2 %	31,5 %	60,1 %	77,7 %
	S	36,0 %	68,5 %	39,9 %	22,3 %
	G ₂ /M	9,8 %	0 %	0 %	0 %
U87/U87- <i>tk</i> (4:1)	G ₁ /G ₀	62,1 %	43,8 %	45,9 %	49,8 %
	S	28,3 %	53,4 %	49,1 %	45,3 %
	G ₂ /M	9,6 %	2,8 %	5 %	4,9 %
U87/U87- <i>tk</i> (1:1)	G ₁ /G ₀	59,3 %	40,6 %	40,5 %	50,5 %
	S	33,2 %	57,2 %	58,5 %	48,4 %
	G ₂ /M	7,5 %	2,2 %	1 %	1,1 %

Tab. 20: Dargestellt sind Ergebnisse der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse im U87-Zellmodell. Nach Mischung transduzierter (U87-*tk*) und nicht transduzierter (U87) Zellen wurde die Auswirkung dieser Vermischung auf den Zyklus der Zellen nach GCV-Behandlung untersucht. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit GCV (10 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-Software (Vers. 2.0) analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelproben dar. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₁/G₀, S und G₂/M, die anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100%. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. 24h nach Behandlung mit GCV zeige sich sowohl bei den transduzierten als auch bei den Zellen in Mischungskulturen ein S-Phase-Arrest. Hierbei ist die Akkumulation von Zellen in der S-Phase zumindest bei der 4:1-Mischungskultur nach 24 h ausgeprägter als zu erwarten gewesen wäre, wenn lediglich transduzierte und nicht auch Bystander-U87-Zellen vermehrt in die S-Phase eingetreten wären.

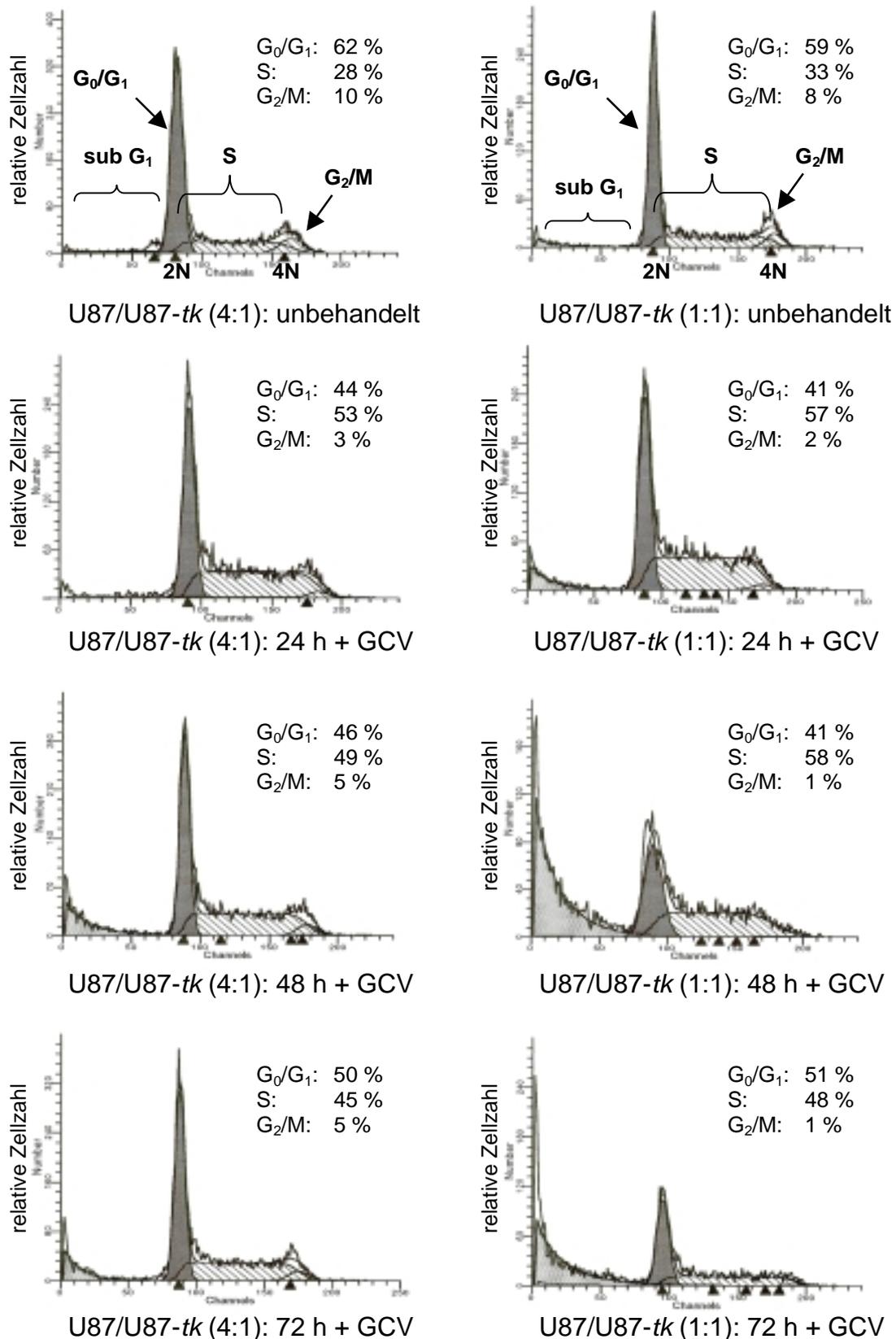


Abb. 49: Durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse von gemischten Kulturen, die sich aus nicht transduzierten U87- und transduzierten U87tk-Zellen in zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen zusammensetzen (4:1, Abb. links bzw. 1:1, Abb. rechts). (Zum Vergleich: Die Ergebnisse der reinen U87- bzw. U87tk-Zellen sind in der Abb. 20 dargestellt.) Jeweils $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden

Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit GCV (10 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-„Software“ (Vers. 2.0) analysiert. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₁/G₀, S und G₂/M, die anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100%. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. 24 h nach Behandlung mit GCV zeigt sich bei den Zellen in Mischungskulturen ein S-Phase-Arrest, der zumindest im 4:1-Mischungsverhältnis höher ausfällt als zu erwarten gewesen wäre, wenn nur der transduzierte Zellanteil betroffen wäre. Die besondere Auswirkung eines höheren Anteils transduzierter Zellen in der Mischung zeigt sich am Ausmaß des zu beobachtenden apoptotischen Zellsterbens, hier in Form von Sub-G₁-Ereignissen meßbar. Bei einem Anteil von 50% transduzierter Zellen sind nach 2 Tagen GCV-Behandlung 40% der gemessenen Zellen apoptotisch (besaßen einen Sub-G₁-DNA-Gehalt). Bei einem geringeren Anteil von transduzierten Zellen (20%) sind dies nur 12%.

9.2.2 Analyse apoptotischer Merkmale beim Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System

Der Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System ist - wie auch in dieser Studie gezeigt wurde (Kap. 9.1) - unabhängig von Zell-Zell-Kontakten. Daher wurde wie in den entsprechenden Bystander-Zytotoxizitätsstudien auf die Kultur in 6-Well-Platten mit zellundurchlässigen Schaleneinsätzen (0,4 µm Porengröße) zurückgegriffen (Abb. 4). Die Zellen kommunizieren lediglich über das Medium miteinander. Die transduzierten Zellen wurden in die Einsätze ausgesät und konnten daher nach Beendigung der Inkubationsphase unkompliziert und vollständig entnommen werden, so daß hier reine Bystander-Zellen in den 6-Well-Platten zurückbleiben, die dann für die durchflußzytometrische Untersuchung zur Verfügung stehen. Außerdem wurden diese Analysen mit den Ergebnissen von gemischt kultivierten Zellproben verglichen. Wie im HSV-*tk*/GCV-System wurden jeweils zwei Mischungsverhältnisse untersucht: 1:1- und 4:1-Mischungen nicht transduzierter und transduzierter Zellen sowie die entsprechenden Reinkulturen. Ansätze von je 4·10⁵ Zellen wurden als Duplikate angefertigt und bis zu 3 Tagen mit 100 µg/ml 5-FC behandelt bzw. unbehandelt gelassen.

Die Abb. 50 zeigt eine typische Messung der PS-Exposition im 9L-Zellmodell. Dargestellt sind die Ergebnisse für die isolierten 9L-Bystander-Zellen nach Entnahme der transduzierten 9L-*cd*-Zellen. Die 9L-Zellen wurden mit AnnexinV-FITC und PI gefärbt und direkt durchflußzytometrisch analysiert. Bei den nicht mit 5-FC behandelten Zellen erhielt man einen Hintergrund von 3% AnnexinV-positiven, d.h. apoptotischen Zellen. Nach 24 h Inkubation mit 5-FC zeigte sich eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen (17 bzw. 19%). Nach 48 h wurden 11% bzw. 12% detektiert. Erst nach 72 h wurde ein deutlicherer Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen in den verschiedenen Mischungsverhältnissen beobachtet: 13% bei einem 4:1 und 22% bei einem 1:1-Verhältnis. Wiederholung dieser Tests zeigten ähnliche Ergebnisse. Der Einfluß des Mischungsverhältnisses von parentalen und transduzierten Zellen auf den Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System war, wie auch bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen zu sehen war, geringer als im HSV-*tk*/GCV-System.

Verglich man die Ergebnisse dieser isolierten Bystander-Zellen mit den Ergebnissen aus den Reinkulturen und den gemischten Kokulturen, so zeigte sich, daß reine 9L-*cd*-Zellen sowie Kokulturen mit 9L-*cd* an Tag 2 die maximale PS-Exposition erreichten, während isolierte Bystander-Zellen eher einen kontinuierlichen Anstieg über die Inkubationszeit von 3 Tagen zeigten (Abb. 51).

Die Ergebnisse im U87-Modell sind vergleichbar (Abb. 51). Nicht transduzierte Zellen sowie die unbehandelten Zellproben wiesen nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung einen Anteil apoptotischer Zellen von 5-8% auf. Nach 24 – 72 h Inkubation mit 100 µg/ml 5-FC zeigte sich jedoch sowohl bei den reinen U87-*cd*-Kulturen, als auch bei den 4:1- bzw. 1:1-Mischung mit und ohne räumliche Trennung ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Hierbei wiesen reine transduzierte Zellen einen hohen Anteil apoptotischer Zellen auf, gefolgt von den 1:1-Mischungen

transduzierter und nicht transduzierter Zellen. Die 4:1-Mischungen von U87- und U87-*cd*-Zellen zeigten weniger apoptotische Zellen als die entsprechenden (getrennte oder gemischte) 1:1-Mischungen. Der zeitliche Verlauf zeigte eine von Tag 1 zu Tag 2 zunehmende Anzahl apoptotischer Zellen, an Tag 3 fiel diese (außer bei den reinen transduzierten Zellen) wieder etwas hinter den maximalen Tag 2-Wert zurück. Die isolierten U87-Bystander-Kulturen zeigten einen leicht höheren Anteil dieser Zellen als die gemischt untersuchten Zellen, dieser liegt jedoch, vergleicht man die entsprechenden Mischungsverhältnisse an den jeweiligen Tagen miteinander nur bei etwa 5-10% und war wahrscheinlich eher auf experimentelle Ursachen zurückzuführen als statistisch signifikant. 9L-*cd*-Zellen induzierten auch bei Bystander-U87-Zellen nach 5-FC-Behandlung eine PS-Exposition (= Apoptose), ebenso U87-*cd*-Zellen bei 9L-Zellen (nicht gezeigt).

9L-Zellen

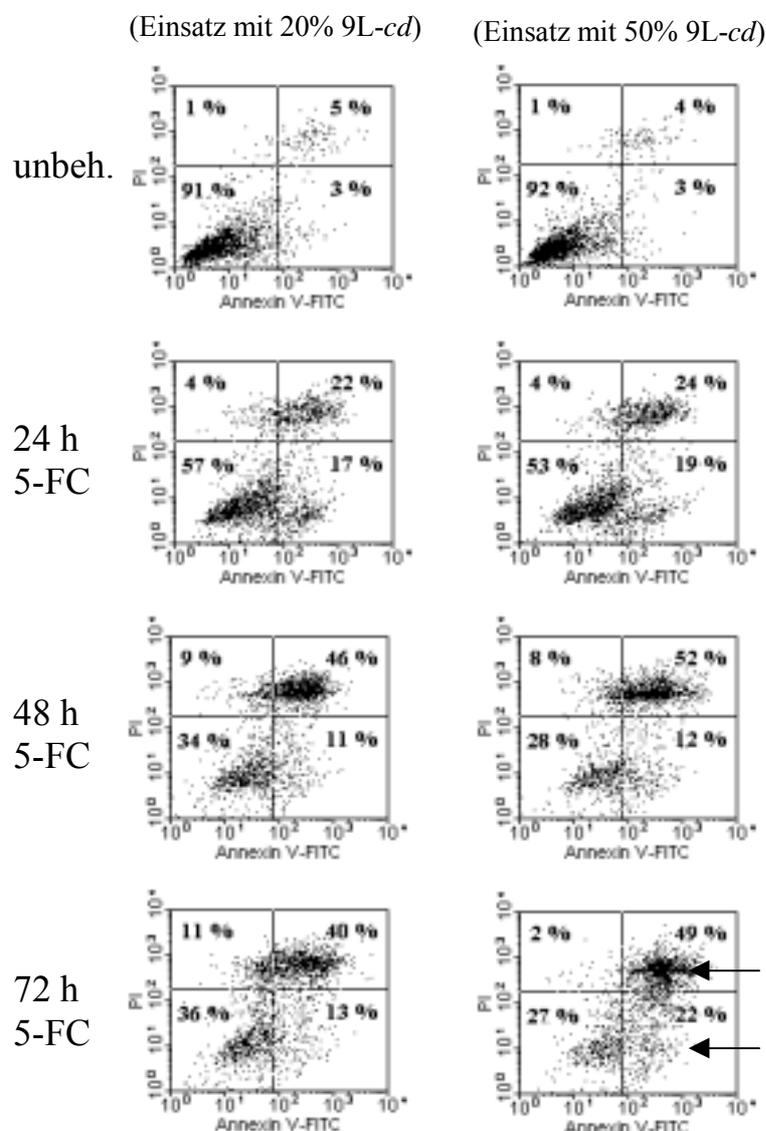


Abb. 49: PS-Exposition bei 9L-„Bystander“-Zellen. Nicht transduzierte 9L- und transduzierte 9L-*cd*-Zellen wurden während der Inkubation mit 100 µg/ml 5-FC durch Einsätze voneinander getrennt (vgl. Abb 39). Für die durchflußzytometrische Analyse der PS-Exposition wurden die transduzierten Zellen mit den Einsätzen entfernt und nur die verbliebenen 9L-Bystander-Zellen mit Annexin V-FITC/PI gefärbt und analysiert. Ein Teil der 9L-Bystander-Zellen ist deutlich AnnexinV-positiv, d.h. hat Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche exponiert (= apoptotisch, s.a. Pfeil). Ein Unterschied im Ausmaß der PS-Exposition bei Inkubation von 9L-Zellen mit 9L-*cd*-Zellen in den verschiedenen Mengenverhältnissen (4:1, 1:1) zeigt sich hier jedoch erst spät (72 h 5-FC). Ein höherer Anteil transduzierter Zellen scheint dann eine effektivere Apoptoseinduktion zu bewirken als ein geringerer.

PI-positive (= tote) Zellen
 AnnexinV-positive Bystander-Zellen (=apoptotisch)

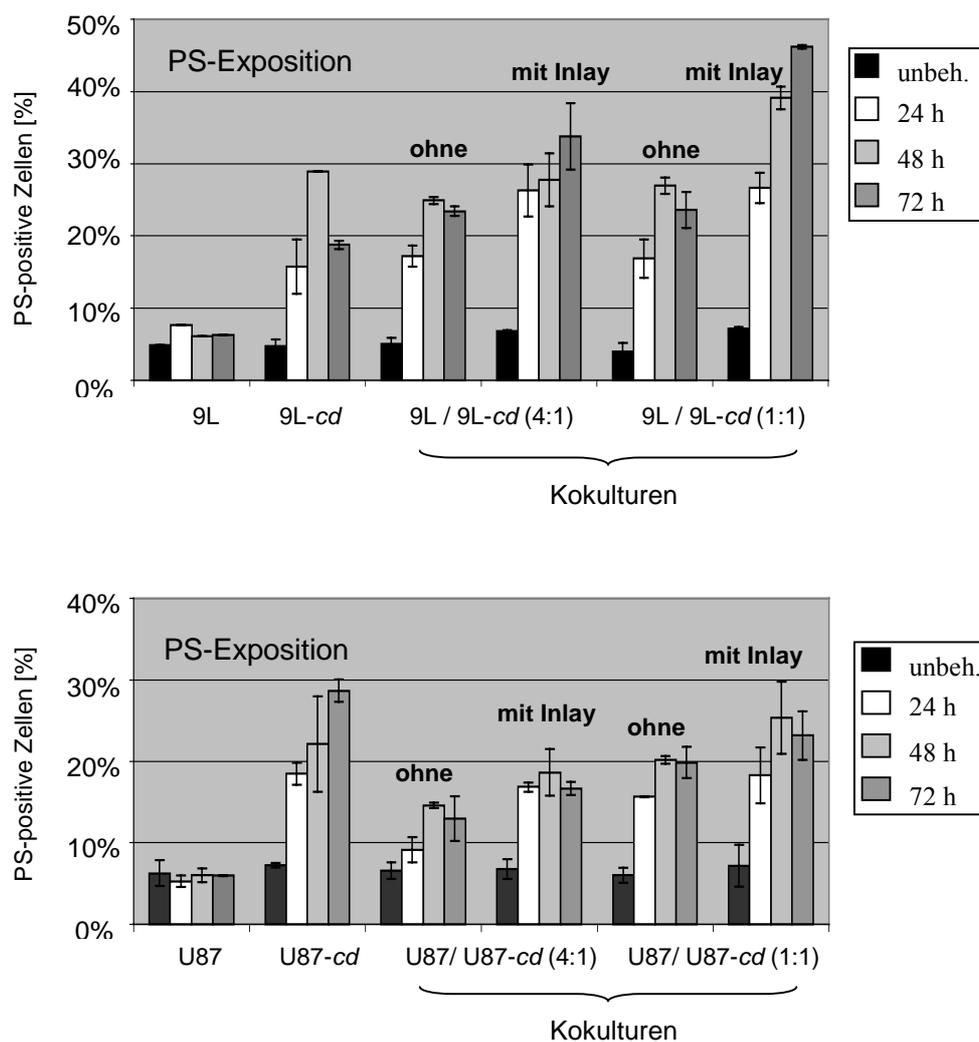


Abb. 50: PS-Exposition bei U87- bzw 9L-Bystander-Zellen. Bystander- und transduzierte Zellen (U87-cd, 9L-cd) wurden während der Inkubation mit 100 µg/ml 5-FC durch Einsätze („Inlays“ mit 0,4 µm Porengröße) räumlich voneinander getrennt. Nach Entfernung der transduzierten Zellen wurden die reinen Bystander-Zellen durchflußzytometrisch auf PS-Exposition untersucht. Zum Vergleich wurden auch die reinen nicht transduzierten U87-Zellen, die transduzierten U87-cd-Zellen sowie räumlich nicht voneinander getrennte Kokulturen (Mischungen 1:1 und 4:1) untersucht. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil PS-positiver Zellen an der vitalen Gesamtpopulation. Apoptotische Zellen sind bei unbehandelten oder bei nicht transduzierten Zellen nach 5-FC-Behandlung kaum zu detektieren (4-8%). Reine transduzierte Zellen sowie alle Kokulturen (sowohl räumlich getrennte als auch gemischte Kulturen) zeigen nach 5-FC-Behandlung eine signifikante Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen, beginnend nach 24 h und weiter steigend nach 48 h. Nach 72 h ist z.T. eine weitere Steigerung (bei U87-cd und den räumlich getrennten 9L/9L-cd-Kulturen), in der Mehrheit jedoch ein leichter Rückgang zu verzeichnen. Die Inlay-Kulturen, die nach der Abtrennung der transduzierten Zellen nur noch aus Bystander-Zellen bestehen, zeigen eine deutliche PS-Exposition und damit den apoptotischen Zelltod bei Bystander-Zellen. Dieser fällt hier z.T. etwas deutlicher aus als in den übrigen Kulturen.

Eine Reduktion des Mitochondrientransmembranpotentials (MTP) war im U87-Zellmodell wie bei den U87-cd-Reinkulturen auch bei Bystander-Zellen nach Behandlung mit 5-FC festzustellen. Dies war

ebenfalls unabhängig von zellulären Kontakten zu beobachten. Die folgende Abb. 51 faßt die Ergebnisse im U87-Modell zusammen:

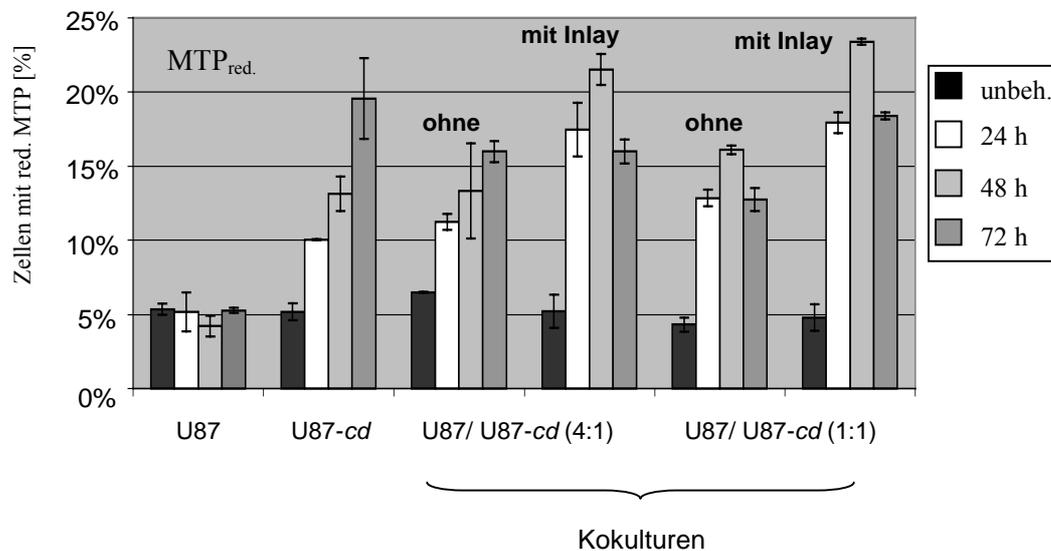


Abb. 51: Eine Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) fand im U87-Modell in reinen transduzierten U87-cd-Zellen sowie in Bystander-Zellmischungen mit und ohne Zellkontakt nach Behandlung mit 5-FC statt.

U87-Bystander- und transduzierte U87-cd-Zellen wurden während der Inkubation mit 100 µg/ml 5-FC durch Einsätze („mit Inlay“) mit 0,4 µm Porengröße räumlich voneinander getrennt. Hierbei wurden die Verhältnisse 1:1 und 4:1 (nicht transduzierte zu transduzierte Zellen) gewählt. Nach Entfernung der transduzierten Zellen wurden die verbliebenen reinen U87-Bystander-Zellen durchflußzytometrisch auf MTP-Reduktion untersucht. Zum Vergleich wurden auch die reinen nicht transduzierten U87-Zellen, die transduzierten U87-cd-Zellen sowie räumlich nicht voneinander getrennte Kokulturen („ohne“, Mischungen 1:1 und 4:1) untersucht. Die Prozentzahlen beziehen sich jeweils auf den Anteil von Zellen mit reduziertem MTP an der vitalen Gesamtpopulation („= 100%“). Zellen mit depolarisierten Mitochondrien sind bei unbehandelten oder bei nicht transduzierten Zellen nach 5-FC-Behandlung kaum zu detektieren (4-7%). Reine transduzierte Zellen sowie alle Kokulturen (sowohl räumlich getrennte als auch gemischte Kulturen) zeigen nach 5-FC-Behandlung eine signifikante Steigerung des Anteils von Zellen mit verringertem MTP, beginnend nach 24 h und weiter steigend nach 48 h. Nach 72 h ist z.T. eine weitere Steigerung (bei U87-cd- und der räumlich getrennten 4:1-U87/U87-cd-Kultur) z.T. ein leichter Rückgang zu verzeichnen (restliche Kokulturen). Die Inlay-Kulturen, die nur aus Bystander-Zellen bestehen, zeigen eine deutliche Reduktion des MTPs. Auch hier fällt wie bei der PS-Exposition dieser Parameter z.T. etwas deutlicher aus als in den übrigen Kulturen (5-10% mehr Zellen mit depolarisierten Mitochondrien verglichen mit den entsprechenden Werten in den analysierten gemischten Kulturen).

Anders als im HSV-*tk*/GCV-System ist im E.coli-*cd*/System auch bei 9L-Zellen an Tag 1 bei einem Teil der Zellen ein MTP-Rückgang zu verzeichnen. Dieser ist nicht nur nach Behandlung von reinen 9L-*cd*-Zellen, sondern auch in kokultivierten Bystander-Mischungen sowie in isolierten 9L-Bystander-Zellen nachzuweisen. Allerdings scheint dies erst kurz vor dem Verlust der Vitalität aufzutreten, also ein relativ spätes Ereignis darzustellen. In der folgenden Abbildung sind exemplarische Messungen dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen des MTPs, der PS-Exposition und der Identifizierung apoptotischer Zellen anhand ihres verringerten DNA-Gehalts (sub-G₁-DNA-Gehalt) sind in der folgenden Tab. 21 zusammengefaßt.

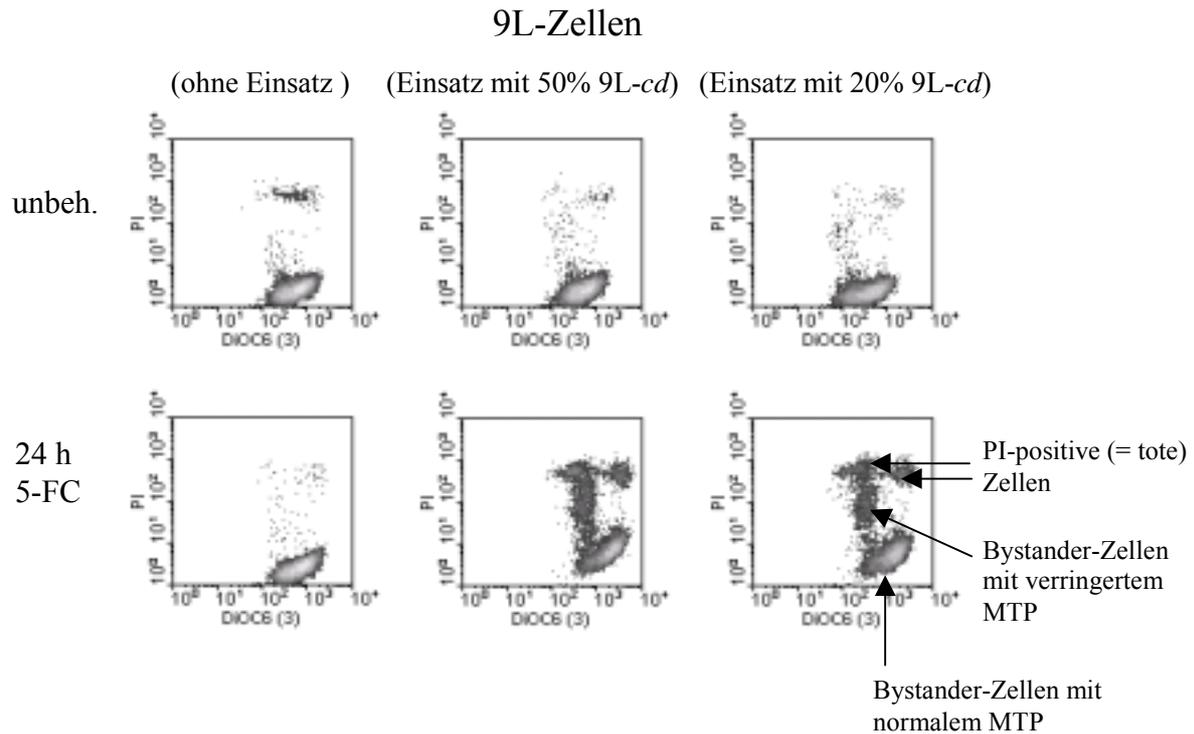


Abb. 52: Darstellung einer durchflußzytometrischen Messung des MTPs bei 9L-Zellen und Bystander-9L-Zellen, d.h. 9L-Zellen, die mit 9L*cd*-Zellen in herausnehmbaren Einsätzen kokultiviert wurden. Die Fluoreszenz des MTP-Farbstoffes DiOC₆(3) nimmt nur bei Bystander-9L-Zellen nach 5-FC-Behandlung ab, nicht bei unbehandelten oder allein kultivierten 9L-Zellen. Die depolarisierten 9L-Zellen haben eine ebenso niedrige Fluoreszenz wie Proben, die zuvor mit einem MTP-Entkoppler (mCICCP) behandelt wurden (nicht gezeigt). Eine Kontrolle der Größe dieser Zellen mittels FSC/SSC zeigte, daß es sich hier um durchschnittlich große und nicht einfach nur verkleinerte Zellen handelte. Der Verlust des MTPs scheint jedoch erst kurz vor bzw. gleichzeitig mit der Aufnahme von PI aufzutreten, d.h. die Zellen sind kaum noch als vital zu bezeichnen, der MTP-Verlust ein spätes Ereignis.

Zellen (Mischungs- verhältnisse)	Behandlung	Dauer [Tage]	vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub G ₁ [%]
9L	unbehandelt	3	93	5	4	3
	5-FC	1	93	8	3	3
		2	94	6	3	2
		3	95	6	4	3
9L- <i>cd</i>	unbehandelt	3	96	5	7	3
	5-FC	1	86	16	16	18
		2	74	29	10	25
		3	61	22	8	29
9L/9L- <i>cd</i> (4:1)	unbehandelt	3	95	5	4	4
	5-FC	1	81	17	14	14
		2	71	25	11	18
		3	56	24	11	29
9L/9L- <i>cd</i> (1:1)	unbehandelt	3	95	4	5	6
	5-FC	1	82	17	14	15
		2	79	27	10	19
		3	59	24	9	30
9L (Eins. 20% 9L- <i>cd</i>)	unbehandelt	3	93	5	4	3
	5-FC	1	71	27	15	13
		2	48	39	18	18
		3	46	34	15	23
9L (Eins. 50% 9L- <i>cd</i>)	unbehandelt	3	93	5	4	3
	5-FC	1	73	26	16	14
		2	43	36	15	22
		3	49	45	18	30

Tab. 21: Vitalität, PS-Exposition („PS-pos.“), Depolarisation der Mitochondrienmembran („MTPred.“) und Verringerung des DNA-Gehalts („sub G₁“) von Rein- und Kokulturen nach Behandlung mit 5-FC. Für die Untersuchungen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie für die Reinkultur beschrieben (Kap. II. B 2.2). Neben den Reinkulturen wurden jeweils Zellmischungen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen in den Verhältnissen 1:1 und 4:1 analysiert. Zusätzlich wurden Kulturen untersucht, bei denen transduzierte und nicht transduzierte Zellen durch Einsätze („Eins.“) räumlich voneinander getrennt wurden (Abb. 39). Nach Entfernung der Einsätze mit den transduzierten Zellen konnten die verbliebenen Bystander-Zellen getrennt analysiert werden. Ansätze von je $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden als Duplikate angefertigt und bis zu 3 Tagen mit 5-FC (100 µg/ml) behandelt bzw. als Kontrolle unbehandelt gelassen. (Weitere Erläuterungen zur Tabelle und den gemessenen Parametern können der Tab. 7 entnommen werden.)

Zellen (Mischungs- verhältnisse)	Behandlung	Dauer [Tage]	vital [%]	PS-pos. [%]	MTP _{red.} [%]	sub G ₁ [%]
U87	unbehandelt	3	96	6	5	3
	5-FC	1	97	5	5	4
		2	95	6	4	7
		3	94	6	5	8
U87- <i>cd</i>	unbehandelt	3	95	7	5	6
	5-FC	1	86	18	10	20
		2	85	22	13	23
		3	80	29	20	38
U87/U87- <i>cd</i> (4:1)	unbehandelt	3	94	7	7	7
	5-FC	1	89	9	11	15
		2	89	15	13	21
		3	90	13	16	15
U87/U87- <i>cd</i> (1:1)	unbehandelt	3	95	6	4	6
	5-FC	1	89	16	13	18
		2	88	20	16	29
		3	80	20	13	19
U87 (Eins. 20% U87- <i>cd</i>)	unbehandelt	3	96	7	5	3
	5-FC	1	85	17	18	21
		2	83	19	22	45
		3	84	17	16	33
U87 (Eins. 50% U87- <i>cd</i>)	unbehandelt	3	96	7	5	3
	5-FC	1	86	18	18	33
		2	81	25	23	52
		3	80	23	18	33

Tab. 22: Vitalität, PS-Exposition („PS-pos.“), Depolarisation der Mitochondrienmembran („MTP_{red.}“) und Verringerung des DNA-Gehalts („sub G₁“) von U87 und U87-*cd* in Rein- und Kokulturen nach Behandlung mit 5-FC. Für die durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie für die Reinkultur beschrieben (Kap. II. B 2.2). Neben den Reinkulturen wurden jeweils Zellmischungen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen in den Verhältnissen 1:1 und 4:1 analysiert. Zusätzlich wurden Kulturen untersucht, bei denen transduzierte und nicht transduzierte Zellen räumlich durch Einsätze („Eins.“) voneinander getrennt waren (Abb. 39). Ansätze von je $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden als Duplikate angefertigt und bis zu 3 Tagen mit 5-FC (100 $\mu\text{g/ml}$) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Im *E.coli-cd/5-FC*-System zeigten sich signifikante Apoptosemerkmale nicht nur in U87-*cd*-Reinkulturen nach 5-FC-Behandlungen sondern auch bei allen Kokulturen. Diese traten in einem Ausmaß auf, das darauf hin deutet, daß auch U87-Bystander-Zellen apoptotisch sterben. (Weitere Erläuterungen zur Tabelle und den gemessenen Parametern können der Tab. 7 entnommen werden.)

Zellzyklusuntersuchungen konnten im *E.coli-cd/5-FC*-System mit Hilfe der räumlichen Trennung von transduzierten und nicht transduzierten Zellen direkt an isolierten Bystander-Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden (wie bei der Analyse der PS-Exposition oder der MTP-Untersuchung) die transduzierten Zellen in Einsätzen ausgesät, die ohne Zellkontakt den Substanz Austausch über das Medium mit den nicht transduzierten Zellen ermöglichen. Die transduzierten Zellen sind im Anschluß an die Inkubationszeit leicht und vollständig entnehmbar (Abb. 4). Die verbliebenen Bystander-Zellen wurden dann fixiert und nach RNase-Verdau mit Propidiumiodid gefärbt und einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse unterzogen. Alle Proben wurden als Doppelwerte angesetzt und analysiert. Außerdem wurden jeweils auch die reinen Kulturen sowie gemischte Kokulturen transduzierter bzw. nicht transduzierter Zellen untersucht. Es wurden jeweils unbehandelte sowie über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 5-FC-behandelte Proben verglichen.

In der Tab. 23 ist eine typische Meßreihe im U87-Zellmodell zusammengefaßt. Die Abb. 53 zeigt daraus die Zyklusanalyse der isolierten Bystanderzellen. Während die nicht transduzierten U87-Zellen keine Änderung des Zellzyklus nach 5-FC-Behandlung zeigten, war bei den reinen transduzierten Zellen ein deutlicher S-Phasearrest bereits nach 24h 5-FC-Behandlung festzustellen. Der fast immer detektierbare leichte G_0/G_1 -Arrest (5-10% der Zellen) war hier nicht zu detektieren. Bei allen Kokulturen zeigte sich jedoch ein deutlicher Arrest in der G_0/G_1 -Phase. Nach 24h Behandlung waren ca. 12-20% mehr Zellen in dieser Phase zu detektieren als bei unbehandelten Proben. Dieser Arrest hielt über den gesamten Behandlungszeitraum an bzw. stieg noch geringfügig weiter an. Die Ergebnisse für die isolierten U87-Bystanderzellen sowie die U87/U87-*cd*-Mischkulturen unterschieden sich nicht signifikant. Apoptotische, subdiploide Zellen nahmen im Verlauf der Behandlung bei transduzierten sowie bei allen Kokulturen, nicht jedoch bei reinen nicht transduzierten Zellen zu.

Ähnliche Ergebnisse erhielt man im 9L-Modell (Tab. 24, Abb. 54). Der Zellzyklus der reinen nicht transduzierten Zellen wurde von der 5-FC-Behandlung nicht beeinflusst. Die reinen transduzierten Zellen reagierten auf eine solche Behandlung nach 24 h mit einem leichten G_0/G_1 -Phasenarrest (10% mehr Zellen in dieser Phase als bei der unbehandelten Kontrolle). Im weiteren Verlauf dieser Behandlung war dieser nicht mehr festzustellen, dagegen verdoppelt sich nahezu der Anteil an Zellen in der S-Phase. Wie im U87-Modell zeigten auch hier alle Kokulturen nach 24 h einen G_0/G_1 -Phasenarrest in etwa gleicher Stärke (ca. 10-19% mehr Zellen in dieser Phase als bei den unbehandelten Vergleichsproben). Dieser Arrest ließ jedoch an den Folgetagen der Behandlung nach. Bei den gemischten Kokulturen wurde ein S-Phasenarrest deutlich, dessen Ausprägung in der Mischung mit einem größeren Anteil von 9L-*cd*-Zellen (1:1) etwas größer war als bei der mit einem geringeren Anteil (4:1). Dieser S-Phasearrest war in den isolierten 9L-Bystanderzellen nicht festzustellen, und der Rückgang des G_0/G_1 -Phasenarrests war weniger stark (ca. 9% weniger Zellen nach 72 h) verglichen mit den gemischten Kulturen (ca. 30% weniger Zellen nach 72 h). Die entscheidende Zyklusbeeinflussung bei Bystander-Zellen im *E.coli-cd/5-FC*-System scheint also ein G_0/G_1 -Phasenarrest zu sein. Auch hier nahmen apoptotische subdiploide Zellen im Verlauf der Behandlung bei transduzierten sowie bei allen Kokulturen zu. Bei reinen nicht transduzierten 9L-Zellen blieb dieser Effekt aus.

Zellen (Mischungsverhältnis)	Zyklusphase	unbeh.	24 h 5-FC	48 h 5-FC	72 h 5-FC
U87	G₀/G₁	60,7 %	60,7 %	61,3 %	62,3 %
	S	26,5 %	23,8 %	25,6 %	23,3 %
	G ₂ /M	12,9 %	15,5 %	13,1 %	14,4 %
U87-cd	G₀/G₁	64,5 %	37,4 %	34,0 %	39,7 %
	S	24,0 %	48,8 %	48,5 %	28,9 %
	G ₂ /M	11,5 %	13,8 %	17,5 %	31,4 %
U87/U87-cd (4:1)	G₀/G₁	63,7 %	81,5 %	84,4 %	79,5 %
	S	23,3 %	12,2 %	11,7 %	14,6 %
	G ₂ /M	13,0 %	6,3 %	3,9 %	5,9 %
U87/U87-cd (1:1)	G₀/G₁	63,1 %	75,2 %	74,7 %	72,8 %
	S	26,5 %	17,1 %	21,2 %	20,2 %
	G ₂ /M	10,4 %	7,7 %	4,1 %	6,9 %
U87 (Eins. U87-cd 4:1)	G₀/G₁	60,7 %	75,3 %	87,3 %	85,4 %
	S	26,9 %	14,6 %	10,2 %	11,3 %
	G ₂ /M	12,4 %	10,1 %	2,5 %	3,3 %
U87 (Eins. U87-cd 1:1)	G₀/G₁	61,2 %	82,0%	88,9 %	87,6 %
	S	27,2 %	11,4 %	8,1 %	8,4 %
	G ₂ /M	11,6 %	6,6 %	3,0 %	4,0 %
U87 (Eins. 9L-cd 4:1)	G₁/G₀	61,5 %	75,2 %	86,0 %	82,4 %
	S	25,4 %	14,2 %	10,3 %	11,7 %
	G ₂ /M	12,1 %	10,6 %	3,7 %	5,9 %
U87 (Eins. 9L-cd 1:1)	G₁/G₀	61,8 %	81,4 %	92,3 %	85,8 %
	S	26,6 %	11,0 %	5,6 %	9,2 %
	G ₂ /M	11,6 %	7,6 %	2,1 %	5 %

Tab. 23: Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse im U87-Modell. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit 5-FC (100 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Bei den Kokulturen wurden sowohl räumlich voneinander getrennte als auch miteinander vermischte transduzierte und nicht transduzierte Zellen ausgesät. Die räumliche Trennung von U87 und den transduzierten U87-cd bzw. 9L-cd-Zellen ermöglichte die Analyse isolierter U87-Bystander-Zellen: U87-cd- und 9L-cd-Zellen wurden mitsamt den Einsätzen („Eins.“) nach der Inkubationsphase entnommen, die U87-Bystander-Zellen dann isoliert analysiert (Abb. 4). Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-Software (Vers. 2.0) analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelproben dar. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M, die anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100%. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Bei reinen nicht transduzierten Zellen hat eine 5-FC-

Behandlung keinen Einfluß auf den Zellzyklus. Bei reinen transduzierten Zellen akkumulieren diese nach 5-FC-Behandlung in der S-Phase. Alle Kokulturen zeigen nach Behandlung mit 5-FC einen G_0/G_1 -Arrest.

U87-Zellen

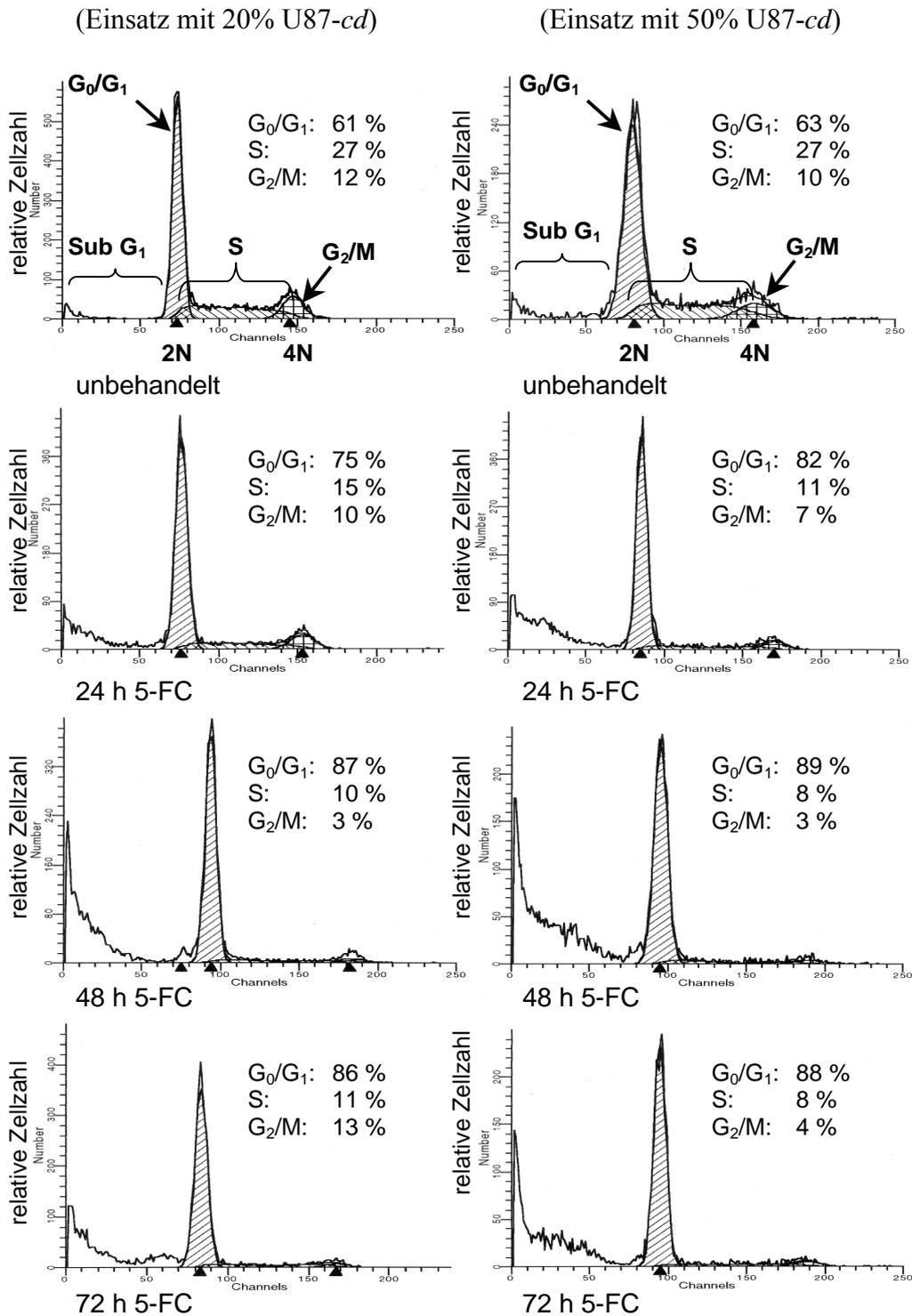


Abb. 53: Dargestellt ist ein Teil der Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse im U87/U87-cd-Bystander-Modell, die in der Tab. 23 zusammengefaßt sind. Abgebildet sind hier die Zellzyklusanalysen der isolierten U87-Bystander-Zellen. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit 5-FC

(100 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Transduzierte und nicht transduzierte Zellen waren während der Kultur durch Einsätze („Eins.“) räumlich voneinander getrennt (Abb. 39). Vor der Probenaufbereitung für die Zyklusanalyse wurden die transduzierten U87*cd*-Zellen vollständig entfernt, die verbliebenen reinen U87-Bystander-Zellen getrennt analysiert. Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-Software (Vers. 2.0) analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelp Proben dar. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M, die anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100%. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt. Die U87-Bystander-Zellen zeigen einen ausgeprägten G₀/G₁-Phasen-Arrest nach 5-FC-Behandlung, der in U87-Reinkulturen nicht nachweisbar ist (Tab. 23, Abb. 25).

Zellen	Zyklusphase	unbeh.	24 h 5-FC	48 h 5-FC	72 h 5-FC
9L	G₀/G₁	54,8 %	54,1 %	53,8 %	54,6 %
	S	35,6 %	29,4 %	33,4 %	30,1 %
	G ₂ /M	9,35 %	16,5 %	12,9 %	15,4 %
9L- <i>cd</i>	G₀/G₁	66,4 %	75 %	54,3 %	38,6 %
	S	28,3 %	29,1 %	42,2 %	58,3 %
	G ₂ /M	5,3 %	0 %	3,5 %	3 %
9L/9L- <i>cd</i> (4:1)	G₀/G₁	62,7 %	72,4 %	61,8 %	40,1 %
	S	25,2 %	25,6 %	37,8 %	45,2 %
	G ₂ /M	12,1 %	2,1 %	0,4 %	14,7 %
9L/9L- <i>cd</i> (1:1)	G₀/G₁	65,5 %	74,2 %	69,6 %	43,1 %
	S	20,3 %	25,7 %	30,4 %	50,6 %
	G ₂ /M	14,1 %	0 %	0 %	6,3 %
9L (Eins. 9L- <i>cd</i> 4:1)	G₀/G₁	54,8 %	69,4 %	62,3 %	60,1 %
	S	35,6 %	30,6 %	37,7 %	40 %
	G ₂ /M	9,35 %	0 %	0 %	0 %
9L (Eins. 9L- <i>cd</i> 1:1)	G₀/G₁	54,8%	74 %	67,8 %	65,3 %
	S	35,6%	26 %	32,2 %	32,8 %
	G ₂ /M	9,35 %	0 %	0 %	1,8 %

Tab. 24: Dargestellt sind die Ergebnisse einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse im 9L/9L-*cd*-Bystander-Modell. Die Zellen (jeweils $4 \cdot 10^5$) wurden in Reinkultur bzw. in den entsprechenden Mischungsverhältnissen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen (1:4 und 1:1) ausgesät und bis zu 3 Tagen mit 5-FC (100 µg/ml) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Bei den Kokulturen wurden sowohl räumlich voneinander getrennte als auch miteinander vermischte transduzierte und nicht transduzierte Zellen ausgesät. Die räumliche Trennung von 9L und den transduzierten 9L-*cd*-Zellen ermöglichte die Analyse isolierter 9L-Bystander-Zellen: 9L-*cd*-Zellen wurden mitsamt den Einsätzen („Eins.“) nach der Inkubationsphase entnommen, die 9L-Bystander-Zellen dann isoliert analysiert. Nach Ethanol-Fixierung, RNase-Verdau und Färbung mit Propidiumiodid wurden die Proben durchflußzytometrisch mit Hilfe von ModFit-Software (Vers. 2.0) analysiert. Die Werte stellen Mittelwerte von Doppelp Proben dar. Die Prozentanteile der Zyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M, die anhand ihres

unterschiedlichen DNA-Gehalts identifiziert wurden, ergänzen sich jeweils zu 100%. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Bei reinen, nicht transduzierten Zellen hat eine 5-FC-Behandlung keinen Einfluß auf den Zellzyklus. 24 h nach 5-FC-Behandlung zeigen *cd*-transduzierte und 9L-Bystander-Zellen in der Zellzyklusanalyse einen deutlichen Arrest in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus. Dieser ist bei Bystanderzellen, die räumlich von den transduzierten Zellen getrennt wurden, nicht geringer ausgeprägt als bei Bystanderzellen aus der Kokultur. An Tag 3 der Behandlung ist dieser bei den isolierten Bystander-Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den Mischkulturen.

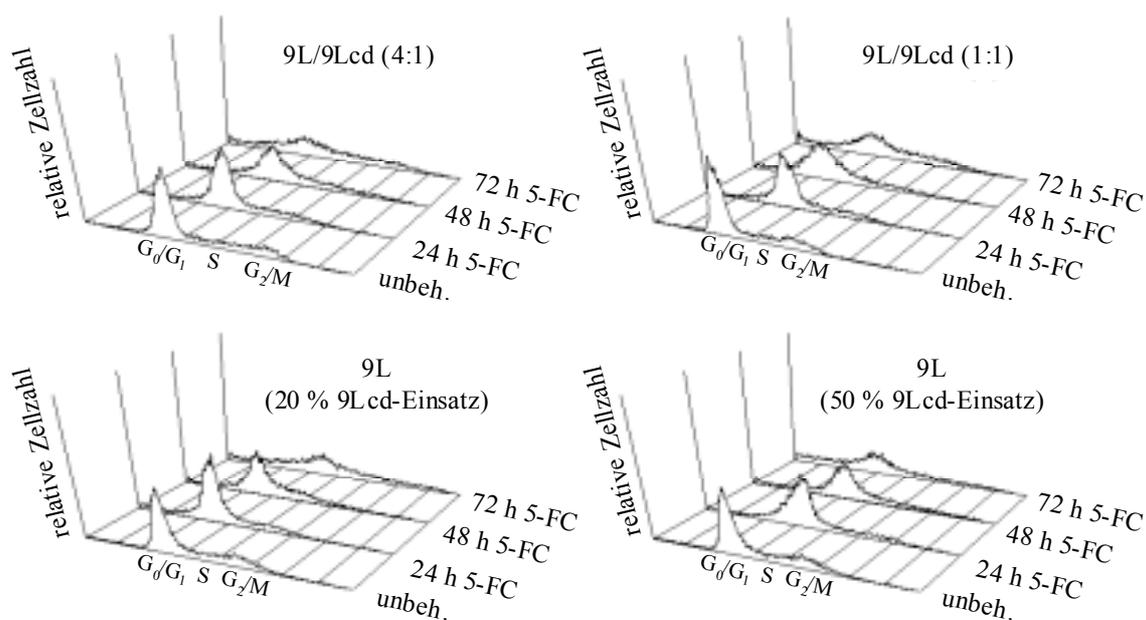


Abb. 54: Darstellung eines Teils der Ergebnisse der vorherigen Tabelle (Tab. 24). 9L/9L-*cd*-Kokulturen und reine 9L-Bystander-Zellen (mit einem Einsatz von 20 bzw. 50% 9L-*cd*-Zellen kultiviert) wurden einer durchflußzytometrischen Zellzyklusanalyse unterzogen. Nähere Angaben zur Probenpräparation können der Tab. 24 entnommen werden.

Die Histogrammgruppen fassen jeweils eine unbehandelte sowie drei unterschiedlich lange (24-72 h) mit 5-FC behandelte Zellproben zusammen. Diese Gruppen sind zum einen die Kokulturen von 9L und 9L-*cd* in den Mischungsverhältnissen 4:1 (oben links) und 1:1 (oben rechts) sowie die isolierten 9L-Bystander-Zellen mit einem unterschiedlichem Anteil in getrennten Einsätzen mitkultivierter 9L-*cd*-Zellen (20%, unten links, bzw. 50%, unten rechts). Das Histogramm zeigt jeweils die PI-Fluoreszenz (x-Achse) in Relation zur Zellzahl (y-Achse). Die Lage der einzelnen Zellzyklusphasen (G_0/G_1 , S, G_2/M) entlang der x-Achse ist gekennzeichnet. Die Akkumulation der Zellproben in der späten G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus wird bereits nach 24 h 5-FC-Behandlung deutlich. Die Histogrammdarstellung veranschaulicht, daß es kaum Unterschiede zwischen den isolierten 9L-Bystander-Zellen und den kokultivierten 9L/9L-*cd*-Zellmischungen gibt und daß auch das Mischungsverhältnis eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

9.3 Colorimetrische Detektion der Caspase 3-Aktivität

Caspase 3-Aktivität wurde in Bystander-Zellmischungen an den Tagen 2-4 der Gentherapien im Modell der 9L-Zellen untersucht (Abb. 55). Bei HSV-*tk*/GCV zeigte sich eine zeitliche Verzögerung des Einsetzens meßbarer Aktivität bei Bystanderzellen im Vergleich zu reinen transduzierten 9L-*tk*-Zellen. Während 9L-*tk*-Zellen bereits an Tag 2 die maximale Aktivität (0,2) erreichten, die in diesen Versuchsreihen an Tag 3 wieder auf 0,15 absank, zeigten die Kokultur-Ansätze mit einem überwiegenden Anteil 9L-Zellen einen Anstieg der Caspase 3 Aktivität auf maximale Werte erst an Tag 3. In Mischungsverhältnissen ab 50% 9L-*tk*-Zellen glich sich der Wert zusehends dem für die reinen 9L-*tk*-Zellen an. Diese Caspase 3-Aktivität konnte bei nachträglich gemischten Zellpopulationen nicht detektiert werden, hier entsprach das Ausmaß der gemessenen Enzymaktivität jeweils dem Anteil beigefügter transduzierter Zellen.

Im E.coli-*cd*/5-FC-System war eine solche zeitliche Verzögerung nicht festzustellen. Es zeigte sich an Tag 3 eine relativ gleichmäßige Caspase 3-Aktivität in kokultivierten Zellmischungen, die der erzielten maximalen Enzymaktivität der 9L-*cd*-Zellen gleichkam, unabhängig vom Prozentanteil zugesetzter transduzierter Zellen. In den nachträglich gemischten Zellpopulationen entsprach das Ausmaß gemessener Enzymaktivität wiederum nur dem Prozentsatz zugesetzter transduzierter Zellen.

In allen Tests zeigten unbehandelte oder vor Substratzusatz mit Caspase 3-Inhibitor behandelte Proben keine signifikante Caspase 3-Enzymaktivität.

Caspase 3 scheint demnach an der Effektor-Phase des Bystander-Zelltodes, ausgelöst durch HSV-*tk*/GCV oder E.coli-*cd*/5-FC beteiligt zu sein. Die Kinetik wies im HSV-*tk*/GCV-System eine zeitliche Verzögerung gegenüber den transduzierten Zellen auf, welche im E.coli-*cd*/5-FC-System nicht festzustellen war.

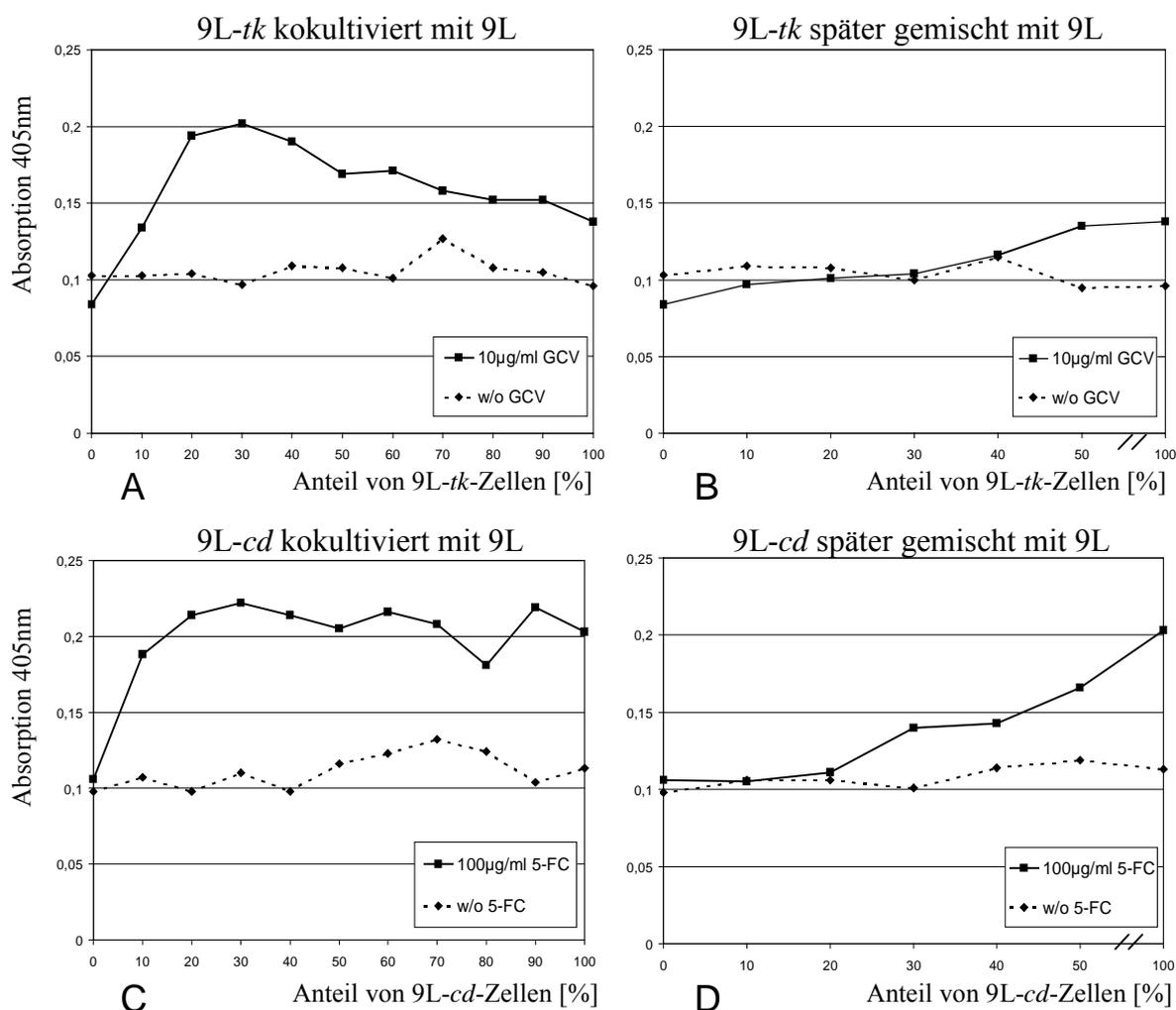


Abb. 55: Caspase 3-Aktivität in Zelllysaten von kokultivierten (A) bzw. nachträglich gemischten (B) 9L- und 9L-*tk*-Zellen sowie 9L- und 9L-*cd*-Zellen (C und D). Die Mischungsverhältnisse (in %) sind auf der Ordinate bezogen auf den Anteil transduzierter Zellen eingetragen und ergänzen sich mit nicht transduzierten Zellen zu jeweils 100% („80%“ entspricht 80% transduzierter Zellen, z.B. 9L-*tk*, gemischt oder kokultiviert mit 20% 9L-Zellen). „Kokultivierte Proben“ wurden an Tag 0 in den entsprechenden Mischungsverhältnissen ausgesät und zusammen über den Zeitraum von drei Tagen kultiviert, wohingegen „gemischte Proben“ als reine Zellpopulationen drei Tage lang inkubiert wurden und erst am Tag der Herstellung der Zelllysate in den entsprechenden Verhältnissen gemischt wurden. Durchgezogene Linien bezeichnen die Messungen in Anwesenheit der Prodrugs GCV (10 µg/ml) bzw. 5-FC (100 µg/ml), gestrichelte Linien entsprechende Parallelmessungen von unbehandelten Zellen. Alle Zelllysate wurden nach 3 Tagen Inkubation hergestellt und gemessen. Die Abszisse zeigt die Caspase 3-Aktivität als Zunahme der Absorption bei 405 nm infolge der Bildung des Produktes pNA aus dem Substrat DEVD-pNA in relativen Einheiten. Absorptionsmessungen von Proben zusammengehörender Versuchsreihen wurden stets gleichzeitig in einer 96-Well-Platte untersucht. Bei beiden Gentherapie-Systemen zeigt sich in den kokultivierten Proben eine signifikant höhere Caspase 3-Aktivität als bei den entsprechenden nachträglich gemischten Kulturen. Die zusätzliche Caspase 3-Aktivität müßte daher zumindest z.T. aus den kokultivierten Bystander-9L-Zellen stammen.

IV. Diskussion

1. Zelltodinduktion nach Suizidgentherapie: Apoptose oder Nekrose?

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die Mechanismen und Signaltransduktionswege des Zelltodes unter Suizidgentherapie mit den etablierten HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-Systemen näher zu untersuchen. Hierzu muß jedoch zunächst die Art des Zelltodes unter Suizidgentherapie identifiziert werden. Für HSV-*tk*/GCV gibt es hierzu schon eine Reihe, z.T. allerdings widersprüchlicher Untersuchungsergebnisse. In Bezug auf das E.coli-*cd*/5-FC-System gab es bisher nur wenige Einzelberichte, die jeweils nur kleine Teilaspekte der durch dieses Suizidgensystem induzierten Zelltodmechanismen näher beleuchteten.

In Bezug auf die HSV-*tk*/GCV-Gentherapie zeigte die Mehrheit der bisher durchgeführten Studien einen apoptotischen Zelltod der *tk*-transduzierten, mit GCV behandelten Zellen (Freeman et al. 1993, Kato et al. 1994, Colombo et al. 1995, Samejima und Meruelo 1995, Hamel et al. 1996, Wei et al. 1998). Daneben gibt es jedoch auch Untersuchungen, die von nekrotischem Zelltod (Kaneko und Tsukamoto 1995, Vile et al. 1997) bzw. von einem parallelem Auftreten von Apoptose und Nekrose (Craperi et al. 1999) bei dem durch HSV-*tk*/GCV induzierten Zelltod berichten. Insbesondere in vivo sind nekrotische Areale im behandelten Gewebe beobachtet worden (Vile et al. 1997).

Für das E.coli-*cd*/5-FC-System existieren deutlich weniger Studien, die sich mit der Art des induzierten Zelltodes auseinandersetzen. Auch hier wird ein apoptotischer Zelltodmechanismus beschrieben: Wang et al. (1998) untersuchten das E.coli-*cd*/5-FC-System in Gliomzelllinien, verwendeten dabei als Apoptosemarker allerdings ausschließlich den TUNEL-Assay. Ebenso wie Bentires-Alj et al. (2000), die das E.coli-*cd*/5-FC-System in colorectalen Karzinomzelllinien analysierten. Diese positiven TUNEL-Tests weisen jedoch lediglich DNA-Fragmentierung nach und sind daher, insbesondere als alleiniger Apoptose-Nachweis, nur bedingt zuverlässig (Bryson et al. 1994). Zhang et al. (2000) dagegen untersuchten den durch E.coli-*cd*/5-FC ausgelösten Zelltod elektronenmikroskopisch (Zellmorphologie), durchflußzytometrisch (DNA-Gehalt) sowie mittels Gelelektrophorese (DNA-Laddering) in Tumorzellen des Pankreas und wiesen in diesem Modell einen apoptotischen Zelltod nach. Ichikawa et al. (2000) zeigten jedoch in vivo nach E.coli-*cd*/5-FC-Suizidgentherapie in 9L-Rattenhirntumoren sowohl nekrotische als auch apoptotische Areale.

Da der cytotoxische Effekt dieses Systems wahrscheinlich hauptsächlich auf der Wirkung des neugebildeten 5-Fluorouracil (5-FU) beruht, können auch Untersuchungen zur Art des durch 5-FU-Behandlung induzierten Zelltodes zum Vergleich herangezogen werden: Hier ist gezeigt worden, daß 5-FU in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration Apoptose auslösen kann (Oka et al. 1997, Guchelaar et al. 1998, Nita et al. 1998, Ikebukuro 2000, Melen-Mucha 2001). Es wurde aber auch nekrotischer Zelltod beobachtet (Yoshikawa et al. 2001). Also auch für das E.coli-*cd*/5-FC-System erscheinen die bisher gewonnenen Informationen widersprüchlich.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Art des jeweilig ausgelösten Zelltodes nach Suizidgentherapie bzw. Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Actinomycin D (ActoD) in Gliomzelllinien mittels verschiedener, einander ergänzender und überprüfender Nachweismethoden analysiert. Diese Methoden erfassen spezifisch Apoptose-typische Merkmale, die sich in verschiedenen zellulären Organellen bzw. Kompartimenten (Plasmamembran, Nukleus, Mitochondrien, Cytoplasma) manifestieren und somit auch einen Überblick über die möglicherweise beteiligten zellulären Vorgänge gewähren. Die Identifizierung nekrotischer Zellen kann aufgrund morphologischer Merkmale, veränderter Lichtstreuungseffekte sowie der unspezifischen DNA-Fragmentierung vorgenommen werden. Zur Zeit stehen leider noch keine spezifischeren Untersuchungsmarker für den Nachweis und die Charakterisierung des nekrotischen Zelltodes zur Verfügung (Übersicht: Darzynkiewicz 1997).

Apoptose definiert zunächst eine initial nach rein morphologischen Kriterien beschriebene Art des Zelltodes (Kerr et al. 1972). Die typischen morphologischen Veränderungen sind ausführlich charakterisiert

und gelten als eines der zuverlässigsten Merkmale zur Identifizierung apoptotischer Zellen (Übersicht: Wylie et al. 1980, Walker et al. 1988, Arends und Wyllie 1991, Kerr et al. 1994). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Zellmorphologie untersucht. Hier konnte festgestellt werden, daß die Suizidgentherapiensysteme HSV-*tk*/GCV und E.coli-*cd*/5-FC ebenso wie die Behandlung mit ActoD in den jeweiligen Zielzellen eine Apoptose-typische Morphologie induzierten. Diese morphologischen Merkmale waren Membran-„Blebbing“, Abschnürung von z.T. DNA-haltigen Vesikeln, Kondensation des Cytoplasmas, Kondensation und Fragmentierung des Nucleus, sowie insgesamt eine Abrundung der Zellen einhergehend mit dem Verlust der Anheftung an das Substrat. Diese Morphologie wurde bei transduzierten, mit der falschen Prodrug behandelten Zellen nicht beobachtet. Nicht transduzierte Zellen zeigten diese apoptotischen Merkmale ebenfalls nicht in signifikantem Ausmaß, und zwar unabhängig davon, ob sie mit Prodrugs behandelt oder nicht behandelt wurden. Die Chemotherapeutika Doxorubicin, Vincristin und Etoposid induzierten sowohl in 9L- als auch in U87-Zellen Apoptose-typische morphologische Veränderungen. Nach Behandlung mit Nekrose-induzierenden Ethanol-Konzentrationen blieben solche Veränderungen aus, dagegen zeigten die Zellen dann Nekrose-typische Merkmale wie Zellschwellung und Berstung.

Mittels durchflußzytometrischer Analyse des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichts (SSC) konnten Apoptose-typische Veränderung von Zellgröße und Granularität im Verlauf der Suizidgentherapie sowie der Chemotherapie gezeigt werden. Die transduzierten und mit den richtigen Prodrugs behandelten Zellen zeigten eine Reduktion der Intensität des Vorwärtsstreulichts sowie eine vorübergehende Erhöhung der Intensität der Seitwärtsstreuung, was als eine Abnahme der relativen Zellgröße und eine Zunahme der Granularität interpretiert werden kann. Diese Veränderungen sind als Apoptose-typisch beschrieben worden (Swat et al. 1981, Ormerod et al. 1995). Wiederum waren solche Veränderungen bei transduzierten, aber unbehandelt belassenen und bei nicht transduzierten Zellen (behandelt oder unbehandelt) nicht in signifikantem Ausmaß zu beobachten. Auch nach Behandlung mit den Chemotherapeutika traten diese Merkmale sowohl bei U87- als auch bei 9L-Zellen auf. Bei nekrotischem Zelltod wäre dagegen eine anfängliche Zunahme der Vorwärtsstreuung aufgrund der Zellschwellung und anschließend eine rapide Abnahme in FSC und SSC mit gleichzeitiger Berstung der Membran zu erwarten gewesen. Dies war aber in den vorliegenden Versuchen weder nach Suizidgentherapie noch nach Chemotherapie zu beobachten.

Einer der meistverwendeten und etabliertesten Apoptosenachweise ist die durchflußzytometrische Messung von Phosphatidylserin („PS“-Exposition auf der Außenseite der Zellmembran. Normalerweise befindet sich PS asymmetrisch verteilt nur in der dem Cytoplasma zugewandten Phospholipidschicht. Nach Induktion von Apoptose wird PS auf der Außenseite der Zelle exponiert und kann dort nachgewiesen werden. Auch nach Suizidgentherapie sowie nach Chemotherapie konnte eine signifikante PS-Exposition demonstriert werden. Das Ausmaß der PS-Exposition war dabei abhängig von der Prodrug- bzw. Chemotherapeutika-Konzentration sowie der Einwirkzeit. In geringer Konzentration lösten Prodrugs nur in den entsprechend transduzierten Zelllinien PS-Umlagerungen aus, nicht jedoch in nicht transduzierten Zellen oder in Zellen mit irrelevantem Suizidgen. PS-Exposition blieb aus nach Behandlung mit hohen, Nekrose-induzierenden Ethanolkonzentrationen aus.

Als typisches, aber nicht obligat bei apoptotischem Zelltod auftretendes Merkmal gilt die Depolarisation von Mitochondrien (Übersicht: Green und Reed 1998, Kroemer und Reed 2000). Der Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) kann zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren führen und damit den Apoptosevorgang induzieren bzw. beschleunigen. Dies ist von Beltinger et al. (2000) als ein Amplifizierungsmechanismus im HSV-*tk*/GCV-System gedeutet worden, der zur Ausbreitung des apoptotischen Signals nach dessen Induktion beiträgt. Im E.coli-*cd*/5-FC-System sind solche Untersuchungen noch nicht berichtet worden. Nach 5-FU-Behandlung colorectaler Adenocarcinome jedoch zeigten sich Mitochondriendepolarisation erst spät (Ikebukuro et al. 2000). Der MTP-Zusammenbruch kann mittels spezieller Fluoreszenzfarbstoffe durchflußzytometrisch gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit

zeigten entsprechende Untersuchungen abhängig von Prodrug-Konzentration und -Einwirkzeit durchaus eine Depolarisierung der Mitochondrien in den suizidtherapeutisch behandelten 9L- und U87-Zellen, wobei dieses Merkmal in den U87-Zelllinien allerdings deutlicher ausgeprägt war als in den 9L-Zelllinien. 9L-Zellen zeigten erst in spät-apoptotischem Zustand eine MTP-Reduktion, wohingegen U87-Zellen bereits früh eine stabile, noch vitale Population mit reduziertem MTP aufwiesen. Dieser Unterschied zwischen 9L- und U87-Zellen war nach Behandlung mit ActoD noch deutlicher als nach Suizidtherapie. Unbehandelte oder nicht transduzierte Zellen zeigten hingegen durchweg ein normal hohes Potential. Bei nekrotischem Zelltod ist das Transmembranpotential zunächst erhöht, die Mitochondrien schwellen an und die Plasmamembran zerreißt (Darzynkiewicz et al. 1982). Eine Erhöhung des Membranpotentials konnte hier jedoch weder nach Suizidtherapie noch nach Chemotherapie festgestellt werden.

Ein anderes typischerweise mit Apoptose assoziiertes Merkmal ist die Fragmentierung der DNA in regelmäßige 180-200bp-lange Sequenzabschnitte sowie Vielfache hiervon (Wyllie 1990). Nach nekrotischem Zelltod zeigt sich zwar ebenfalls eine Degradierung der DNA, jedoch ist diese willkürlich und erzeugt nach Auftrennung im Agarosegel eine „Schmierspur“ unterschiedlich langer Fragmente (Duke et al. 1997). Die Apoptose-typische, spezifische Fragmentierung der DNA kann außer durch DNA-Gelelektrophorese auch mittels TUNEL-Test demonstriert werden, wobei mittels TUNEL-Test nicht immer eindeutig zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden kann (Bryson et al. 1994). Im Vergleich zur Gelelektrophorese isolierter DNA, die bei Apoptose ein leiterartiges Muster von DNA-Fragmenten zeigt, können mittels TUNEL-Test nur ganz allgemein DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. In den vorliegenden TUNEL-Tests konnten tatsächlich bei den genterapeutisch behandelten 9L- und U87-Zelllinien DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. Diese entstehen im HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-System allerdings auch durch den Einbau der aktivierten Prodrugs in die DNA (Elion 1983, Parker et al. 1987, Faulds und Heel 1990, Grem 1996). Die resultierenden Strangbrüche erfolgen dann jedoch willkürlich, unregelmäßig und insgesamt in geringerem Ausmaß. Die Menge an Strangbrüchen bedingt durch DNA-schädigende Agenzien oder Nekrose liegt i.A. um eine Größenordnung niedriger als die durch Apoptose erzeugte (Gorczyca et al. 1992). Zur Kontrolle des Ergebnis wurde jedoch die Apoptose-typische DNA-Fragmentierung zusätzlich mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft. In diesem Test zeigten nur die entsprechend transduzierten und mit der zugehörigen Prodrug behandelten Zellen ein leiterartiges Muster von 180-200bp-Fragmenten und Vielfachen hiervon. Unbehandelte oder nicht transduzierte Zellen wiesen keine DNA-Fragmentierung auf.

Apoptotische Zellen verlieren aufgrund der DNA-Fragmentierung und der Abspaltung DNA-haltiger Vesikel einen Teil ihres DNA-Gehalts. Dies kann durch präparative Methoden verstärkt und nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Solche Zellen können dann anhand ihres „subdiploiden“ (oder „sub G_1 “-) DNA-Gehalts in Zellzyklusstudien identifiziert werden (Nicoletti et al. 1991, Elstein et al. 1994, 1995). Die in diesem Bereich gemessenen Ereignisse (Zellen und Vesikel) nahmen während der genterapeutischen Behandlung von U87- und 9L-Zellen abhängig von Konzentration und Einwirkzeit signifikant zu. Wiederum blieb dieser Parameter bei nicht transduzierten oder unbehandelten Zellen auf einem konstant geringen Hintergrundniveau. Nach Behandlung mit ActoD konnten ebenfalls vermehrt Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt nachgewiesen werden.

Außerdem typisch für apoptotischen Zelltod ist die Aktivierung sog. Caspasen. Dies sind Cystein-Proteasen, die unter normalen physiologischen Bedingungen als inaktive Pro-Enzyme in der Zelle vorliegen und erst nach Apoptose-Induktion spezifisch aktiviert werden (Übersicht: Thornberry und Lazebnik 1998). Hier wurde die Aktivität der Effektor-Caspase 3 untersucht, der eine zentrale Rolle bei der Ausführung des Apoptose-Programms zukommt. Eine erhöhte Caspase 3-Aktivität konnte spezifisch in genterapeutisch behandelten 9L- und U87-Zellen sowie nach ActoD-Behandlung nachgewiesen werden. Caspase 3-Aktivität konnte dagegen nicht in unbehandelten oder nicht transduzierten Zellen detektiert werden.

All diese Untersuchungsergebnisse zur Unterscheidung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod zeigen, daß die Suizidtherapiesysteme HSV-*tk*/GCV und E.coli-*cd*/5-FC ebenso wie die Behandlung mit ActoD in den hier verwendeten Gliomzelllinien 9L und U87 Apoptose induzieren. Eine zusätzliche Beteiligung nekrotischer Vorgänge konnte hier nicht demonstriert werden und scheint in den hier untersuchten Modellen keine bedeutsame Rolle zu spielen.

2. Auswirkung der Suizidtherapie auf Bystander-Zellen

Die transduzierten Zelllinien üben nach Behandlung mit der zugehörigen Prodrug zytotoxische Bystander-Effekte auf nicht transduzierte Zellen aus. Die Signaltransduktionswege, die zur Zelltodinduktion in Bystander-Zellen führen, sind noch kaum erforscht. Im HSV-*tk*-System wurde ein apoptotischer Zelltod vermutet (Colombo et al. 1995, Samejima und Meruelo 1995, Hamel et al. 1996). Bisher beschränkten sich diese Analysen jedoch auf den Nachweis von DNA-Degradierung. Weitere Elemente der apoptotischen Signaltransduktion wurden noch nicht untersucht. Für das E.coli-*cd*/5-FC-System sind hierzu nach umfangreichem Literaturstudium keine entsprechenden Voruntersuchungen gefunden worden.

Analog zu den oben dargestellten Untersuchungen von Reinkulturen der jeweiligen U87- und 9L-Zelllinien wurden auch Mischkulturen von transduzierten und nicht transduzierten Zellen auf die Apoptoseparameter PS-Exposition, Mitochondriendepolarisation und Sub-G₁-DNA-Gehalt getestet. Im HSV-*tk*/GCV-System konnte in den Kokulturen keine signifikante Ausprägung apoptotischer Merkmale bei Bystander-Zellen gezeigt werden. Der Anteil apoptotischer Zellen war nicht deutlich höher als der jeweilige Anteil transduzierter Zellen an der Zellmischung. Erst nach spezifischer Markierung der transduzierten Zellen konnte zu einem gewissen Anteil PS-Externalisation auch bei Bystander-Zellen nachgewiesen werden. Mitochondriale Membrandepolarisation spielte im 9L-System auch bei den Bystander-Zellen keine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion, sondern stellt wie bei den Reinkulturen ein spätes, eher sekundäres Ereignis dar. Bei U87-Zellen scheint die mitochondriale Membrandepolarisation bei Bystander-Zellen ebenso wie in den U87-Reinkulturen während der Zelltodinduktion früher aufzutreten und könnte hier zur Amplifizierung des apoptotischen Signals dienen. Die Parameter Zellzyklus und Sub-G₁-DNA-Gehalt konnten bei diesen Bystander-Untersuchungen nur in nicht markierten Kokulturen analysiert werden, da das Fluoreszenzspektrum des Markierungsfarbstoffs mit dem des DNA-färbenden Propidiumiodids überlappen. In den Kokulturen konnte jedoch auch ohne spezifische Markierung nachgewiesen werden, daß der Anteil von Bystander-Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt im Verlauf der Behandlung von 9L- und U87-Zellen zunimmt, d.h. die Anzahl apoptotischer Zellen steigt. In Bezug auf den Zellzyklus konnte gezeigt werden, daß Bystander-Zellen und transduzierte Zellen unter HSV-*tk*/GCV-Suizidtherapie gleichermaßen einen S-Phase-Arrest eingehen. In der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich die gelbe, membranständige Fluoreszenz des Markierungsfarbstoffs DiIC₁₈(3) und die orange-rote, Nukleus-assoziierte Fluoreszenz des Propidiumiodids voneinander unterscheiden. Dies ermöglichte die morphologische Untersuchung der Bystanderzellen im HSV-*tk*/GCV-System. Hier zeigten sich Apoptose-typische Merkmale, wie die Kondensation und die Fragmentierung des Nukleus, Membran-Blebbing, Abrundung der Zellen und Kondensation des Chromatins auch bei Bystander-Zellen in beiden Zellmodellen. Alle diese Untersuchungen belegen also, daß auch die Bystander-Zellen genauso wie die transduzierten Zellen unter Suizidtherapie eines apoptotischen Zelltodes sterben.

Der Bystander-Zelltod involvierte dabei eine Caspase 3-Aktivierung wie colorimetrische Analysen von Kokulturen im Vergleich zu nachträglich in den gleichen Anteilen gemischten Kulturen zeigten: Hier waren die gemessenen Caspase 3-Aktivitäten in 9L/9L-*tk*-Bystander-Kokulturen deutlich höher als in den nachträglich gemischten Kulturen. Es zeigte sich eine um einen Tag verzögerte Caspase 3-Aktivierung im Vergleich zu behandelten 9L-*tk*-Reinzellkulturen. Dies könnte auf der Abhängigkeit des HSV-*tk*-Bystander-Effektes von Zell-Zell-Kontakten beruhen (Freeman et al. 1993, Wu et al. 1994), was die Verbreitung toxischer Metabolite innerhalb der Zellpopulation wahrscheinlich verlangsamt.

Im *E.coli-cd/5-FC*-System wurden die gleichen Parameter für die Bystander-Zellen untersucht. In Kokulturen waren apoptotische Merkmale wie PS-Exposition und Depolarisierung der Mitochondrien deutlicher als beim *HSV-tk/GCV*-System auch bei Bystander-Zellen zu zeigen. Hier übertraf die Anzahl apoptotischer Zellen jeweils den Anteil an transduzierten Zellen im Gemisch signifikant. Die Mitochondrien-Depolarisation war im U87-Modell wiederum ausgeprägter (oder länger andauernd) als im 9L-Modell. Da der Bystander-Effekt im *E.coli-cd/5-FC*-System wahrscheinlich im Wesentlichen auf der Wirkung des gebildeten toxischen Metaboliten 5-FU beruht, der frei diffundiert, konnten außerdem Untersuchungen an räumlich isolierten Bystander-Zellen durchgeführt werden, die während der Prodrug-Behandlung nur über das Medium mit transduzierten Zellen korrespondierten. Diese isolierten Bystander-Zellen zeigten typische, morphologische Apoptosemerkmale. PS-Exposition konnte bei diesen Bystander-Zellen nachgewiesen werden und ebenso eine Depolarisierung der Mitochondrien, welche wie bei unvermischten transduzierten Zellen im U87-Modell früher auftrat als im 9L-Modell. Die isolierten Bystander-Zellen konnten mittels Propidiumiodid-Färbung auf Sub-G₁-DNA-Gehalt und Zyklusveränderungen analysiert werden. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der Bystander-Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt, d.h. apoptotischer Bystander-Zellen, im Verlauf der Behandlung mit 5-FC. Der Zellzyklus zeigte bei Bystander-Zellen eine noch deutlichere Arretierung in der G₁-Phase, als dies bei den reinen transduzierten Zellen der Fall war. Dies könnte auf den Unterschied in der intrazellulären 5-FU-Konzentration bei transduzierten (höhere Konzentration) und Bystanderzellen (geringere Konzentration) zurückzuführen sein, wobei geringere 5-FU-Konzentrationen vermutlich eher in Zellzyklusarrest und Reparatur als in Zelltod resultieren (vgl. Kap. 3, 5).

Die Caspase 3-Aktivität wurde hier ebenso wie im *HSV-tk/GCV*-System zunächst an Kokulturen und in nachträglich in den gleichen prozentualen Verhältnissen gemischten Kulturen von 9L- und 9L-*cd*-Zellen untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere Caspase 3-Aktivität in den Bystander-Kokulturen als in den nachträglich gemischten Kulturen. Im Gegensatz zum *HSV-tk/GCV*-System war jedoch in den Bystander-Kokulturen keine zeitliche Verzögerung in der Enzymaktivierung zwischen Bystander- und transduzierten Zellen ersichtlich. Die Caspase 3-Aktivität war in den Mischungen mit geringerem Anteil an transduzierten Zellen (10%-Anteil) ebenso hoch wie bei Mischungen mit höherem Anteil (90%-Anteil). Dies paßt zu den Zytotoxizitätsanalysen: Hier waren die zytotoxischen Effekte in Mischungen mit einem geringerem Anteil transduzierter Zellen (20%-Anteil) nicht weniger deutlich ausgeprägt als bei denen mit einem höheren Anteil (50%-Anteil). Dies erklärt sich vermutlich durch die freie Diffusion des intrazellulär gebildeten und dann frei diffundierenden toxischen Metaboliten 5-FU. Der Parameter Zellzyklus-Arretierung, der bei Bystander-Zellen stärker ausgeprägt war als bei nicht transduzierten Zellen, beruht auf wesentlich sensitiveren Messungen. Hier wurden einzelne Zellen und nicht Zellpopulationen oder Lysate solcher Populationen gemessen, wodurch ein Sensitivitätsunterschied der Methoden resultiert, der die gemessenen Unterschiede zwischen transduzierten und Bystander-Zellen insbesondere in den ersten 24 h der Behandlung erklären könnte.

Nekrotische Zellen traten in den Bystander-Kulturen nicht in signifikantem Maße auf, wie anhand morphologischer, DNA-Fragmentierungs- und Lichtstreuungsuntersuchungen festgestellt wurde.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß der Bystander-Zelltod in den Suizidtherapiesystemen *HSV-tk/GCV* und *E.coli-cd/5-FC* in den hier untersuchten Zellmodellen im wesentlichen über Apoptose verläuft. Die Apoptose-typischen Merkmale prägten sich ähnlich wie bei den transduzierten Zellen jedoch in geringerem Ausmaß aus.

Ein noch ungeklärtes Phänomen stellt die Bystander-Resistenz der nicht transduzierten 9L-Zellen gegenüber den *tk*-transduzierten U87-Zellen unter GCV-Behandlung dar. Die reziproke Mischungen von U87- und 9L-*tk*-Zellen hingegen zeigten deutliche Bystander-Effekte. Bystander-Resistenzen sind bereits berichtet worden, jedoch waren diese eher eine grundlegende Eigenschaft der Zelllinie (Ishii-Morita et al. 1997). Dies ist hier nicht der Fall, da die 9L-Zellen sehr effektiv durch 9L-*tk*-Zellen eliminiert werden

können. Das Bystander-Effekte auch zwischen Zelllinien verschiedener Spezies stattfinden, ist bereits gezeigt worden (Wu et al. 1994, Ishii-Morita et al. 1997, Vrionis et al. 1997) und wurde hier mit Zelllinien der Maus, der Ratte und des Menschen bestätigt. Resistenzen sind bisher zumeist auf unzureichende interzelluläre Kommunikation bedingt durch fehlende oder verringerte Zell-Zell-Kanäle („Gap-Junctions“) zurückgeführt worden (Elshami et al. 1996, Vrionis et al. 1997). Daß sowohl 9L- als auch U87-Zellen über funktionierende Gap Junctions verfügen ist, bereits gezeigt worden (Huang et al. 1998, Touraine et al. 1998, Zhang et al. 1999). Immunfluoreszenzfärbungen der hier verwendeten U87- und 9L-Zellen mittels anti-Connexin43-Antikörpern bestätigten das Vorhandensein dieser Kanäle hier (nicht gezeigt). Die Bystander-Resistenz von 9L-Zellen in Kokultur mit U87-*tk*-Zellen beruht also nicht bloß auf dem Fehlen von Gap Junctions. Ob es aber zwischen diesen unterschiedlichen Zelltypen zu einer funktionellen Kopplung der Gap Junctions kommt, wurde noch nicht untersucht. Dies erscheint jedoch mehr als wahrscheinlich, da es in der umgekehrten Kombination (9L-*tk*/U87) zu einem deutlichen Bystander-Effekt kommt und dieser abhängig von Zell-Zell-Kontakten sein soll. Daher scheinen 9L-Zellen eine intrazelluläre Resistenz gegenüber U87-*tk*-vermittelter Apoptose aufzuweisen, während im umgekehrten Fall (9L-*tk*/U87) U87-Zellen nicht resistent gegenüber 9L-*tk*-vermittelter Apoptose sind. Hier könnten anti-apoptotische Faktoren z.B. der Bcl-2-Proteinfamilie eine Rolle spielen. Auch die vermutlich geringere Beteiligung mitochondrialer Apoptosefaktoren in 9L-Zellen könnte hiermit zusammenhängen. Die Stärke des Bystander-Effektes wird außerdem durch die *tk*-Enzymaktivität beeinflusst (Chen et al. 1995, Kim et al. 2000), diese könnte bei U87-*tk*-Zellen geringer als bei 9L-*tk*-Zellen sein. Dann müßten U87-Zellen zudem sensitiver gegenüber der Prodrug als 9L-Zellen, was zumindest für die Behandlung mit Chemotherapeutika zutrifft (vgl. Kap. 5).

Der Bystander-Effekt wird zusätzlich durch den Austausch apoptotischer Vesikel beeinflusst (Freeman et al. 1993). Die unterschiedliche Ausprägung der Vesikelproduktion (Zeitpunkt und Ausmaß der Vesikel-Abgabe, Gehalt an Apoptose-auslösenden Faktoren usw.) könnte zu verschieden stark auftretenden zytotoxischen Effekte führen und ist auch vereinbar mit der eingeschränkten räumlichen Reichweite des Effektes (limitierte Verbreitung der Vesikel). Im 9L-System könnte die Vermittlung des Bystander-Effektes Zelltyp-spezifisch stärker als bei U87-Zellen von Vesikelübertragungen abhängig sein. Dies böte auch eine Erklärung für die nur unvollständige Inhibierung des Bystander-Effektes durch räumliche Separierung bei 9L/9L-*tk*-Zellen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß 9L- und U87-Bystander-Zellen im HSV-*tk*/GCV- und im *E.coli-cd/5-FC*-System apoptotisch sterben und zeigt erste Einblicke in die Apoptose-Signalkaskade dieser Zellen. Aufbauend auf die dabei entwickelten Methoden können in Zukunft weitere Aspekte des Bystander-Zelltodes untersucht werden.

3. Die Expression des Tumorsuppressors p53 in 9L- und U87-Zellen

Ein wichtiger Apoptose-Kontrollpunkt ist der Tumorsuppressor p53 (Vogelstein und Kinzler 1992). Nach DNA-Schädigung akkumuliert p53-Protein im Nukleus der Zelle, bedingt durch posttranskriptionelle Mechanismen (Maltzman and Czyzyk 1984, Kastan et al. 1991). Dies führt zu Apoptose (Yonish-Rouach et al. 1991, Shaw et al. 1992) oder zu einem Wachstumsstop der Zelle, der vermutlich Zeit für Reparaturvorgänge ermöglichen soll (Michalovitz et al. 1990, Martinez et al. 1991, Kuerbitz et al. 1992, Cox et al. 1995). Mehr als 50 % aller menschlichen Tumore weisen p53-Mutationen auf (Nigro et al. 1989, Hollstein et al. 1991). Diese Mutationen bewirken häufig eine Resistenz gegenüber p53-abhängiger Apoptose-induktion. p53-Mutationen werden auch in Gliomen und Astrocytomen gefunden (Frankel et al. 1992, Fults et al. 1992, Porter et al. 1992, von Deimling et al. 1992, Kraus et al. 1994, Louis 1994).

Das 9L-Zellmodell ist daher ein typisches Tumormodell: Es trägt eine p53-„Missense“-Punktmutation und hat außerdem die zweite p53-Genkopie verloren (Asai et al. 1994). Eine G zu A Transition an Position 2

des Codons 277 (äquivalent zum humanen Codon 279¹) führt zur Substitution von Glycin durch Glutamat. Dieses Codon ist Teil der evolutionär hoch konservierten Region V des Proteins und liegt in einem Bereich des Proteins, der durch Ausbildung von Kontakten zum Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA und zu einzelnen Basen in der großen DNA-Furche essentiell für die DNA-Bindung ist (Assai et al. 1994, Soussi et al. 1990, Cho et al. 1994). Die meisten p53-Mutationen, welche in humanen Tumoren gefunden wurden, treten im Bereich dieser DNA-Bindungsdomäne auf (Übersicht: Koshland 1993).

In Tumoren gefundene Mutationen verleihen ihren Zellen i.d.R. Selektionsvorteile. Bei p53 geschieht dies durch den Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit und damit durch den Verlust der transkriptionsaktivierenden Eigenschaft. Für die funktionelle/strukturelle Bedeutung des Glycins an dieser Stelle spricht die evolutionäre Konservierung: Sowohl Ratte (Codon 277) als auch Mensch und Affe (beide Codon 279), Maus (Codon 273), Huhn (Codon 265), *Xenopus* (Codon 260) und Regenbogenforelle (Codon 269) besitzen an entsprechender Stelle Glycin (Soussi et al. 1990). Nach Cho et al. (1994) ist der Verlust der DNA-bindenden Eigenschaft von p53 bei Mutationen, welche nicht direkt für DNA-Kontakte verantwortliche Aminosäurereste betreffen, auf einer allgemeinen Störung der strukturellen Integrität der DNA-bindenden Domäne zurückzuführen. Für eine sterische Beeinträchtigung spricht die Nähe des Codons 279 (human) zu den hochkonservierten, DNA-Kontakte ausbildenden Aminosäureresten 273, 277 und 280².

p53-Mutationen resultieren meist (aufgrund posttranslationaler Stabilisierung) in einer Akkumulation des Proteins im Nukleus der Zelle, wodurch p53 immunhistochemisch nachweisbar wird (Übersicht: Lane und Benchimol 1990, Levine et al. 1991). 9L-Zellen weisen eine deutliche Akkumulation von p53 auf, die hier immunhistochemisch gezeigt werden konnte. Trotz dieser hohen p53-Proteinkonzentration kommt es nicht zu einer verstärkten Expression potentieller p53-Zielgene, wie z.B. Bax, p21, mdm2 oder CD95 (Kap. 4-7). Die typischerweise mit p53-Aktivierung assoziierten Merkmale Zellzyklusarrest bzw. Apoptose sind bei unbehandelten 9L-Zellen ebenfalls nicht festzustellen: Diese Zellen weisen eine hohe Proliferationsaktivität auf und apoptotische Zellen sind kaum zu detektieren. p53 scheint daher im 9L-Modell tatsächlich transkriptionsinaktiv zu sein.

p53 wird bei 9L-Zellen sowie den transduzierten 9L-Derivaten in zwei Varianten exprimiert, die sich in ihrem Laufverhalten in der SDS-PAGE voneinander unterscheiden lassen. Die beiden Isoformen weisen vermutlich unterschiedliche posttranslationale Veränderungen auf (dies sind hier im Wesentlichen Phosphorylierungen und Acetylierungen). Die Variante mit höherer Beweglichkeit korreliert hier mit dem Auftreten von S-Phase-Zellen z.B. nach genterapeutischer Behandlung. Verschiedenen p53-Varianten wurden auch schon in murinen Lymphozyten mit speziellen Zyklusphasen assoziiert (mit ruhenden G₀-Zellen zum einen und Mitogen-stimulierten Zellen zum anderen; Milner 1984, Gamble und Milner 1988). Da bekannt ist, daß p53 im Verlauf des Zellzyklus unterschiedlich posttranslational verändert wird, könnten diese Zellzyklus-spezifische Veränderungen den Unterschied in der Beweglichkeit bedingen (Übersicht: Giaccia und Kastan 1998).

¹ Codon 279 (human) ist kein ausgesprochener Mutations-Hot-Spot, obwohl es in einer allgemein hoch konservierten Region liegt (Region V: Codons 270-286 human). Von den 14051 bisher katalogisierten p53-Mutationen (Hernandez-Boussard et al. 1999) betreffen 46 Codon 279 (nicht eingeschlossen sind hierbei Deletionen längerer Abschnitte, die auch Codon 279 umfassen). Auffallend ist, daß Glycin in fast 50% der gefundenen Tumormutationen gegen Glutamat ausgetauscht ist (21 Fälle), gefolgt von Deletionen (14 Fälle). Der Austausch von Glycin durch Glutamat ist auch bei Gliomen festgestellt worden (Kyritsis et al. 1996, Kraus et al. 1994). Glycin hat keine Seitenkette, was zu großer Flexibilität der Polypeptidkette an dieser Stelle führt. Aufgrund der Seitenkette des Glutamats wird die Flexibilität der Polypeptidkette eingeschränkt verglichen mit Glycin. Außerdem weist Glutamat bei physiologischem pH eine negative Nettoladung auf. Sowohl die Flexibilität als auch die Neutralität an dieser Stelle scheinen hier wichtig für die normale p53-Funktion zu sein.

² Codon 273 (human) bildet vermutlich einen direkten Phosphatkontakt in der großen DNA-Furche und ist in 8,8% aller p53-Mutationen betroffen, nur noch übertroffen von dem Hot Spot-Codon 248 (Arginin), welches in 9,6% mutiert ist. Codon 277 und 280 sind außerdem nach diesem Strukturmodell direkt involviert in die DNA-Bindung (Cho et al. 1994).

Die U87-Zelllinie ist hingegen ein wt-p53 exprimierendes Tumormodell (Van Meir et al. 1994, Asai et al. 1994). Dementsprechend konnte immunhistochemisch kein p53-Protein in unbehandelten U87-Zellen nachgewiesen werden, da wt-p53 in Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze der Immunhistochemie exprimiert wird. Erst nach Behandlung mit Apoptose-auslösendem ActinomycinD oder Doxorubicin wurde wt-p53 auch in den U87-Zellen immunhistochemisch detektierbar. Im Verlauf dieser offensichtlichen p53-Akkumulation traten auch Transkriptionsaktivierungen von p53-Zielgenen auf (Kap. 4, 6). Nach Behandlung mit niedriger Actinomycin D-Konzentration war ein deutlicher G₀/G₁-Arrest zu beobachten, bei höheren Konzentrationen wurde Apoptose induziert. Alle diese Ergebnisse sprechen für eine wt-p53-Funktion in U87-Zellen.

4. Analyse der Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswege CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α

p53 ist ein Transkriptionsfaktor und seine Apoptose-induzierende und Zellzyklus-arrestierende Aktivität wird in erster Linie mit der direkten Transkriptionsaktivierung von Genen in Verbindung gebracht (Sabbatini et al. 1995, Attardi et al. 1996). Aber auch von Transkriptions-unabhängigen Mechanismen ist schon berichtet worden (Caelles et al. 1994, Haupt et al. 1995). Eines der Gene, die durch p53 transkriptionell aktiviert werden können, ist CD95 (Owen-Schaub et al. 1995, Reinke und Lozano 1997).

CD95 (syn. Fas oder APO-1) gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)/Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptorfamilie (Itoh et al. 1991). Die über CD95 und TNF-Rezeptor-I induzierten Apoptose-Signaltransduktionswege gehören zu den zur Zeit am besten verstandenen (Übersicht: Hengartner 2000, Krammer 2000).

Eine Beteiligung von CD95/CD95L an der Signaltransduktion bei der HSV-*tk*/GCV-Gentherapie wurde bereits in Voruntersuchungen vermutet (Wei et al. 1999, Beltinger et al. 1999). Daher wurde die Expression der Todesrezeptoren CD95 und TNF-RI auch in der vorliegenden Arbeit durchflußzytometrisch in den Zellmodellen U87 und 9L nach Suizidgentherapie sowie Chemotherapie (Actinomycin D, Etoposid, Vincristin) untersucht. Zellen der 9L-Zelllinien zeigten keinerlei detektierbare Oberflächenproteinexpression von CD95 oder TNF-RI, weder unbehandelt noch nach Behandlung mit einer der angeführten Therapien. Zusätzlich wurde mittels eines ultrasensitiven ELISA-Tests die Sekretion des Liganden TNF α bei 9L- und 9L-*tk*-Zellen nach GCV-Behandlung untersucht. Es konnte keinerlei Sekretion von TNF α nachgewiesen werden. Untersuchungen im U87-Modell zeigten ebenfalls keine detektierbare Erhöhung der Proteinexpression von CD95 oder TNF-RI auf der Zelloberfläche bei keiner der untersuchten Therapien.

Zur Klärung der Frage, ob in dem untersuchten, p53-mutierten Modellsystem 9L die Expression auf transkriptionaler Ebene induziert wird und lediglich der posttranslationale Proteintransport von CD95 (Bennett et al. 1998, Müller et al. 1998) aufgrund der p53-Inaktivierung nicht stattfindet, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die Expressionshöhe von CD95/CD95L und TNF-RI/TNF α war bei 9L- und 9L-*tk*-Zellen sehr gering und veränderte sich nicht über den GCV-Behandlungszeitraum.

Die Todesrezeptor/Ligand-Signaltransduktionswege CD95/CD95L und TNF-RI/TNF- α scheinen daher nicht an der Apoptose-Auslösung oder -Exekution nach Suizidgentherapie oder Behandlung mit den Chemotherapeutika Actinomycin D, Etoposid und Vincristin in den hier untersuchten Zellmodellen beteiligt zu sein.

Es gibt nur wenige Studien, die die Expression von CD95/CD95L bzw. TNF-RI/TNF α im Verlauf der Suizidgentherapie untersucht haben. Die Ergebnisse dieser Studien sind außerdem nicht einheitlich. Eine Beteiligung von CD95/CD95L an der Apoptose-Induktion durch HSV-*tk*/GCV-Therapie wird von Beltinger et al. (1999), Wei et al. (1999), Glaser et al. (2001) und Krohne et al. (2001) vorgeschlagen. Die Bedeutung und das Ausmaß dieser Beteiligung wird jedoch unterschiedlich bewertet: Wei et al. untersuchten u.a. mittels Western Blot die Expressionshöhe von CD95 und CD95L sowie mittels MTT-Test die Inhibition der Apoptose durch Inkubation mit CD95L-Antisense-Oligonukleotiden oder rekombinanten CD95/FC-

Chimären während HSV-*tk*/GCV-Therapie bei vier Maustumorzelllinien³. Die Zunahme von CD95 und CD95L im Verlauf der Therapie, der Nachweis von CD95L in therapierten Tumorabschnitten sowie die Reduktion der Zytotoxizität der Behandlung nach Einsatz der erwähnten Inhibitoren führte zu dem Schluß, daß zumindest 50% des beobachteten Zelltodes über den CD95/CD95L-Signaltransduktionsweg initiiert wird. Beltinger et al. (1999) hingegen sahen keine Beteiligung von CD95L, sondern eine CD95L-unabhängige, p53-induzierte Zunahme der Fas-Expression auf der Zelloberfläche und eine Ligand-unabhängige Aggregation dieses Rezeptors als initiales Moment bei der HSV-*tk*/GCV-vermittelten Zytotoxizität. Den Aussagen lagen Untersuchungen an einer stabil mit *tk*-transduzierten Neuroblastom-Zelllinie (SHEP) zu grunde. Mittels Immunoblot wurde ein deutlicher Rückgang der CD95-Proteinkonzentration bereits 2 h nach GCV-Applikation und eine Zunahme der Fluoreszenz nach Färbung GCV-behandelter Zellen mittels anti-CD95-Antikörper in der durchflußzytometrischen Analyse gezeigt. Dies zeigte sich nicht, wenn zuvor der Golgi-Apparat durch Inkubation mit Brefeldin A geschädigt wurde. In den Dictyosomen sequestriertes CD95 sollte demnach nach p53-Aktivierung aus den Organellen an die Zelloberfläche befördert werden und dort Ligand-unabhängig aggregieren. CD95L wurde nur basal exprimiert. Glaser et al. (2001) dagegen untersuchten zwei Gliomzelllinien: LN-18 und LN-229. Sie fanden die CD95/CD95L-Expression unverändert in *tk*-transduzierten und GCV-behandelten Zellen. Caspase 8-Inhibitoren inhibierten zwar die CD95L-vermittelte Apoptose nicht jedoch GCV-induzierte Toxizität. LN-18-Zellen, welche auf CD95-Resistenz selektioniert wurden, zeigten keine verminderte GCV-Zytotoxizität. Allerdings schienen HSV-*tk*/GCV-Therapie und CD95L-Behandlung synergistisch zu wirken. Krohne et al. (2001) postulierten wiederum eine CD95/CD95L-Abhängigkeit des HSV-*tk*/GCV-Systems nach Untersuchungen an zwei Hepatokarzinomzelllinien (HepG2, Hep3B). Sie beobachteten eine Zunahme der CD95-Proteinexpression in wt-p53-Zellen (HepG2) und von CD95L sowohl in HepG2- als auch in Hep3B-(mt-p53)-Zellen. Zusammenfassend deuten diese Publikationen gemeinsam mit den hier vorgestellten Ergebnissen daraufhin, daß grundsätzlich HSV-*tk*/GCV-Therapie unabhängig von CD95/CD95L funktionieren kann, da Inhibition dieses Signalwegs die zytotoxische Wirkung der Therapie nicht oder nicht vollständig aufhebt. Daß trotzdem mitunter ein „Cross-talk“ zwischen den Zelltodsignalwegen besteht, welcher zu Synergismen führen kann, die sicherlich in bestimmten Zelltypen (Hepatozyten, Lymphozyten) eine größere Rolle spielen als in anderen (z.B. bei den hier vorgestellten Gliomzelllinien), schließt dies nicht aus.

Zur Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Zelltodinduktion nach E.coli-*cd/5*-FC-Gentherapie ist nach Recherche der vorliegenden Literatur zur Zeit noch keine Veröffentlichung erschienen. Untersuchungen zur Signaltransduktion induziert durch 5-FU zeigten eine Hochregulation von CD95/CD95L nach 5-FU-Behandlung (Backus et al. 2001, Eichhorst et al. 2001), aber auch unabhängige Apoptoseinduktion durch 5-FU z.B. in einer Hepatomzelllinie, die Fas nicht exprimierte (Jiang et al. 1999) und in einer colorectalen Adenokarzinom-Zelllinien, deren Zelltod durch Blockierung des CD95/CD95L-Signalwegs nicht inhibiert werden konnte (Adachi et al. 1999). Diese und die hier vorgelegten Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, daß auch das E.coli-*cd/5*-FC-Therapieregime ohne Beteiligung von CD95/CD95L funktionieren kann und schließt die Wirksamkeit von Synergismen in anderen Zellmodellen dabei nicht aus.

In Bezug auf den TNF-RI/TNF α -Signalweg ist noch wenig veröffentlicht. Beltinger et al. (1999) zeigten in der oben erwähnten Studie, daß auch die Zelloberflächenexpression von TNF-RI nach GCV-Behandlung in der Neuroblastomzelllinie steigt. HSV-*tk*/GCV-Therapie sensitivierte die Zellen gegenüber einer Behandlung mit TNF α . Intrazellulär konnte jedoch keine Erhöhung der TNF α -mRNA nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß 9L-Zellen durch HSV-*tk*/GCV-Behandlung nicht für TNF α -vermittelte Toxizität sensitiviert werden. Die Zelllinie U87MG ist außerdem bekannt für ihre TNF α -Resistenz (Moriuchi et al. 1998). Daraus kann man schließen, daß TNF-RI/TNF α wahrscheinlich bei Gliomen (zumindest in den hier vorgestellten Modellen), vielleicht anders als bei anderen Zelltypen, keine wesentliche Beteiligung an der HSV-*tk*/GCV-vermittelten Toxizität hat. Das gleiche gilt vermutlich für die

³ B16F10 (Melanom), NG4TL4 (Sarkom), H6 (Hepatom) und 1MEA 7R.1 (Hepatom)

Wirkung der E.coli-cd/5-FU-Therapie, hier gibt es noch keine Vergleichsliteratur. 5-FU wird in präklinischen Tiermodellen häufig in Kombination mit TNF α als immunmodulierende Chemotherapie untersucht, hier wurden Synergismen gezeigt (Übersicht: Zagozdzon und Golab 2001). Eine direkte Aktivierung des TNF α /TNF-RI-Signaltransduktionsweges nach 5-FU-Administration ist jedoch noch nicht berichtet worden.

Überraschend war in diesem Zusammenhang aber das Ausbleiben von Aktivierungen dieser beiden Signaltransduktionswege in den hier gewählten Zellmodellen nach Chemotherapie, da insbesondere die Beteiligung von CD95/CD95L an den durch Chemotherapeutika induzierten Todessequenzen ein häufig berichtetes Ereignis vor allem bei leukämischen und hepatozellulären Karzinomzelllinien ist (Friesen et al. 1996, Fulda et al. 1997, Müller et al. 1997). Hier wird eine Transkriptionsaktivierung von CD95 durch p53 (Müller et al. 1998) sowie ein p53-induzierter Transport von CD95 auf die Zelloberfläche (Bennett et al. 1998, Müller et al. 1998) nach DNA-Schädigung kontrovers diskutiert (Strasser et al. 1995, Fuchs et al. 1997). Von den Chemotherapeutika Vincristin, Etoposid (Ciesielski und Fenstermaker 1999, Yin et al. 2000, Sawada et al. 2000), Doxorubicin (Stan et al. 1999) und Actinomycin D (Narita et al. 2000) ist berichtet worden, daß sie in experimentellen Gliomen Apoptose auslösen. Über die Involvierung von CD95/CD95L- und TNF-RI/TNF α -Signaltransduktionswegen nach Chemotherapie in Gliomen ist noch wenig berichtet worden. Glaser und Weller (2001) zeigten, daß die Selektion einer Resistenz gegen CD95L den Effekt der Chemotherapie nicht verringert. Inkubation mit neutralisierendem CD95L-Antikörper blockiert zwar die Apoptose durch exogenen CD95L, nicht aber den durch Chemotherapeutika ausgelösten Zelltod. Caspase 8, ein spezifischer „Downstream“-Akteur der CD95- und TNF-RI-vermittelten Apoptose, zeigte keine spezifische Aktivitätserhöhung (Glaser und Weller 2001). Einige der Chemotherapeutika schienen zwar eine zeitweise Erhöhung der CD95/CD95L-Expression zu bewirken, dies hatte jedoch keine funktionale Auswirkung.

Alle diese Berichte sind in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen in denen keine Expressionserhöhung von CD95 oder TNF-RI nach Inkubation mit den genannten Chemotherapeutika mittels durchflußzytometrischer Analyse festgestellt werden konnte. Bei U87- und 9L-Zellen konnte außerdem nach Actinomycin D-Behandlung keine Caspase 8-Aktivierung gemessen werden (nicht gezeigt). Vermutlich spielen CD95/CD95L- und TNF-RI/TNF α -Signaltransduktionswege bei der Therapie mit den genannten Chemotherapeutika zumindest bei experimentellen Gliomen keine wesentliche Rolle.

5. Proteinexpression von p53- und dem p53-Zielgen p21^{cip1,waf1,sdi1} (Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen) im Verlauf der Suizidtherapie und nach Actinomycin D-Behandlung

p21 ist ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen („cdk“), dessen Bedeutung für den G₁-Zellzyklusarrest nach p53-Induktion durch DNA-Schädigung gut charakterisiert ist. p21 kann von p53 direkt transkriptionell aktiviert werden (El-Deiry et al. 1993, Xiong et al. 1993).

Die Bindung eines p21-Moleküls pro Cyclin/Cyclin-abhängige Kinase-Komplex scheint für die normale Funktion notwendig zu sein, bei Bindung mehrerer Moleküle wird die Aktivität des Komplexes inhibiert. Der Zellzyklus kann dadurch an den Restriktionspunkten G₁/S und (schwächer) G₂/M negativ reguliert werden (Gu et al. 1993, Harper et al. 1993, 1995, LaBaer et al. 1997, Bates et al. 1998, Dulic et al. 1998, Nicolescu et al. 1998, Cheng et al. 1999, Sherr und Roberts 1999). Zelllinien mit p21-Deletionen und p21-Null-Mäuse zeigen eine Verminderung des p53-induzierten G₁-Phasenarrests nach DNA-Schädigung (Deng et al. 1995, Waldmann et al. 1995). Allerdings ist p21 auch p53-unabhängig aktivierbar (Michieli et al. 1994, Akashi et al. 1995, Zeng und El-Deiry 1996).

Die folgende Tabelle faßt die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur p53- und p21-Proteinexpression sowie der Zellzyklusanalysen zusammen:

Zellmodell	ActoD	HSV- <i>tk</i> /GCV			E.coli- <i>cd</i> /5-FC		
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3
U87 (wt-p53)	p53 ↑	p53 ⇔	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↗	p53 ⇔
	p21 ↑	p21 ⇔	p21 ⇔	p21 ⇔	p21 ↑	p21 ↗	p21 ⇔
	G ₀ /G ₁	S			G ₀ /G ₁	S	S
	G ₂ /M						
9L (mt-p53)	p53 ↓	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑
	p21 ↓	p21 ↓	p21 ↓	p21 ↓	p21 ↓	p21 ↓	p21 ↓
	(G ₀ /G ₁)	S	S	S	G ₀ /G ₁	S	S
	G ₂ /M						

Tab. 25: Die Ergebnisse der Western Blot-Proteinexpressionsanalysen von p53 und p21 während der HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-Suizidgentherapie (Tag 1-3) sowie nach Behandlung mit Actinomycin D („ActoD“) sind in dieser Tabelle zusammengefaßt. Die Höhe der jeweiligen Proteinkonzentration wurde jeweils im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewertet, wobei ⇔ eine gleichbleibende, ↑ eine gestiegene und ↓ eine verringerte Konzentration darstellen soll. Außerdem sind die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Zellzyklusanalysen eingetragen: Hier wurde der jeweils festgestellte Phasenarrest vermerkt, d.h. „S“ bedeutet eine vorwiegende Akkumulation der Zellen in der S-Phase, „G₀/G₁“ in der G₀/G₁-Phase usw. Kein Eintrag bedeutet eine nicht oder nicht mehr feststellbare Arrettierung.

Die Proteinexpressionsstudien wurden nach Behandlung mit hohen Apoptose-auslösenden Actinomycin D (ActoD)-Konzentrationen (1-2 µg/ml) durchgeführt. In der durchflußzytometrischen Analyse wurden zusätzlich geringere Konzentrationen untersucht (ab 0,001 µg/ml).

Im wt-p53 U87-Zellmodell erhöhte sich die p53- und p21-Proteinkonzentration nach ActoD-Behandlung (1 µg/ml) stark. Bei geringeren ActoD-Konzentrationen (0,001 µg/ml) zeigte sich ein deutlicher G₁-Phase-Arrest in allen U87-Zelllinien. Nach Inkubation mit höheren Konzentrationen (>0,001 µg/ml) zeigte sich neben massiver Apoptose auch ein verstärkter Arrest in G₂/M.

Im mt-p53-9L-Zellmodell hingegen war die ohnehin geringe p21-Expression 24 h nach ActoD-Behandlung (1-2 µg/ml) nicht mehr detektierbar und auch die p53-Konzentration nahm ab. Der G₁-Phasenarrest bei Inkubation mit geringen ActoD-Konzentrationen (0,001 µg/ml) war weniger deutlich ausgeprägt als bei U87-Zelllinien. Auch bei Inkubation mit höheren Konzentrationen (> 0,001 µg/ml) zeigte sich hier verglichen mit U87-Zelllinien ein geringerer Anteil apoptotischer Zellen, sowie eine etwas geringere Ausprägung des G₂-Arrests.

In der wt-p53-Zelllinie U87 induzierte ActoD eine immunhistochemisch und mittels Immunoblot deutlich nachweisbare hohe p53-Akkumulation. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen zum Einfluß von ActoD auf die wt-p53-Konzentration ein: So zeigten Kastan et al. (1991), daß die p53-Konzentration in humanen lymphoiden Zellen nach ActoD-Behandlung zunimmt. Fritsche et al. (1993) bestätigten dies in murinen wt-p53 L929-Fibroblasten, Robles und Adami (1998) in humanen Fibroblasten und Khan et al. (1997) in einer humanen Mammakarzinomzelllinie (MCF-7). In wt-p53-Zellen scheint demnach Behandlung mit ActoD p53-Akkumulation zu induzieren. In Abhängigkeit von der eingesetzten ActoD-Konzentration wird dann ein G₁-Arrest (niedrige Konzentration) oder Apoptose (hohe Konzentration) beobachtet, wie auch hier gezeigt werden konnte.

Daß allerdings funktionelles p53 keine unentbehrliche Voraussetzung für die Apoptose-Auslösung durch ActoD darstellt, zeigten Untersuchungen mit mt-p53: Kleef et al. (2000) zeigten Apoptose-Induktion durch ActoD-Behandlung (0,001-1 µg/ml, 24 h) in einer Pankreastumorzelllinie (PANC-1), die mutiertes p53⁴

⁴ Die Pankreastumorzelllinie PANC-1 weist eine p53-Punktmutation in Codon 273, Exon 8 auf, welche zu einem Aminosäureaustausch von Arginin durch Histidin führt (Berrozpe et al. 1994, Kaino 1997).

exprimiert. Auch die humane Gliomzelllinie, T98G, von der bekannt ist, daß sie eine p53-Punktmutation⁵ aufweist, zeigte nach ActoD-Behandlung Apoptose (Narita et al. 2000). Dies stimmt mit den Ergebnissen in dem hier untersuchten mt-p53-9L-Zellmodell überein: ActoD löste auch hier effektiv Apoptose aus. Demnach scheint hoch-dosierte ActoD-Behandlung Apoptose auszulösen. An der Apoptoseinduktion können dann sowohl p53-involvierende als auch p53-unabhängige Mechanismen beteiligt sein.

p53-Akkumulation und transkriptionelle Aktivierung von p21 mit anschließendem G₁-Phasearrest ist von Khan et al. (1997) nach der ActoD-Behandlung von MCF-7-Zellen und auch von Robles und Adami (1998) nach Behandlung humaner Fibroblasten festgestellt worden und scheint ein allgemein zu erwartendes Ergebnis bei Behandlung von wt-p53/wt-p21-Zellen mit geringen ActoD-Konzentrationen zu sein. Da in den hier vorgestellten Ergebnissen der wt-p53-U87-Zellen der beobachtete G₁-Phasenarrest zeitgleich mit p53 und p21-Akkumulation auftritt, ist ein ursächlicher Zusammenhang wahrscheinlich.

In der mt-p53 Zelllinie 9L bleibt eine p21-Induktion und ein deutlicher G₁-Phasenarrest aus. Obwohl p21 auch p53-unabhängig transkriptionell und posttranskriptionell aktivierbar ist (Michieli et al. 1994, Akashi et al. 1995, Zeng und El-Deiry 1996), ist dies hier nach Behandlung mit hoher ActoD-Dosierung nicht festzustellen. Dies könnte z.T. auf die Inhibierung der RNA-Synthese durch ActoD zurückzuführen sein.

Das Auftreten eines G₂-Phasenarrestes, der in mt-p53-Zellen kaum geringer ausgeprägt ist als bei wt-p53-Zellen, nach Inkubation mit hohen Actinomycin D-Dosen, läßt auf eine geringe Bedeutung von p53/p21 bei der Regulierung dieses Kontrollpunktes nach ActoD-Behandlung in der 9L-Zelllinie schließen. Obwohl einige Berichte eine Beteiligung von wt-p53/p21 auch bei der Kontrolle des G₂/M-Restriktionspunktes angedeutet haben (Bates et al. 1998, Dulic et al. 1998, Nicolescu et al. 1998), ist dies jedoch noch in seiner Bedeutung umstritten. In den 9L-Zellen führen höchstwahrscheinlich p53-unabhängige Mechanismen zu dem beobachteten G₂-Arrest. Diese können auch bei U87-Zellen beteiligt sein. Die Mechanismen, die letzten Endes zum G₂/M-Arrest führen, sind im Detail noch nicht geklärt.

In Bezug auf die Beeinflussung der p53- und p21-Proteinexpression sowie des Zellzyklus lassen sich zwischen ActoD-Behandlung und der E.coli-cd/5-FC-Therapie zunächst Gemeinsamkeiten feststellen: Bei cd-transduzierten wt-p53 U87-Zellen erfolgte nach Behandlung mit 5-FC eine frühe Akkumulation von p53 und p21 und ein, allerdings sehr schwacher G₁-Arrest. An den weiteren Behandlungstagen liessen die p53- und p21-Konzentration wieder nach, und auch der G₁-Phasenarrest wurde nach 24 h abgelöst durch einen S-Phase-Arrest.

Die frühe Induktion von wt-p53 in U87-Zellen nach ActoD-Behandlung und E.coli-cd/5-FC verglichen mit HSV-tk/GCV könnte nach Ljungman et al. (1999) auf der Inhibierung der RNA-Synthese beruhen, die ein sogar schnelleres p53-Induktionssignal darstellen könnte als DNA-Stragbrüche. Die RNA-Synthese wird von HSV-tk/GCV nicht beeinflusst.

Die p53-Induktion durch die E.coli-cd/5-FC-Gentherapie ist jedoch im Vergleich zur p53-Induktion nach Acto-D-Behandlung sehr gering. Immunhistochemisch war dementsprechend p53 nach 5-FC-Behandlung in cd-transduzierten U87-Zellen nicht nachzuweisen. Nach Behandlung der gleichen Zellen mit ActoD (1 µg/ml) war dagegen p53 deutlich detektierbar. Der toxische Metabolit 5-FU, der aus 5-FC gebildet wird, ist in murinen L929-Fibroblasten ein starker p53-Induktor: Nach Behandlung mit 10 µg/ml FU war die mittels Immunfluoreszenz festgestellte p53-Akkumulation fast ebenso hoch wie nach Behandlung mit 1 µg/ml ActoD (Fritsche et al. 1993). Auch Bunz et al. (1999) zeigten in Immunoblotanalysen eine hohe Induktion von wt-p53 nach Behandlung einer Colontumorzelllinie mit 5-FU. Die relativ geringe p53-Akkumulation, die in den wt-p53 U87-cd-Zellen nach 5-FC-Behandlung beobachtet wird, könnte auf eine geringe intrazelluläre 5-FU-Bildung hindeuten. Ein direkter Vergleich der effektiven Dosis kann nicht durchgeführt werden, da nicht bekannt ist bzw. ermittelt wurde, wieviel 5-FU hier während der Gentherapie gebildet wird. Vergleichsuntersuchungen mit direkter Applikation von 5-FU bei U87- und 9L-Zellen in

⁵ Die humane Gliomzelllinie weist eine p53-Punktmutation in Codon 237, Exon 7 auf, welche zu einem Aminosäureaustausch von Methionin durch Isoleucin führt (Van Meir et al. 1994, Chen et al. 1995).

verschiedenen Konzentrationen mit anschließender Analyse der p53-Expression könnten hier klären, ob eine zu geringe 5-FU-Bildung die Ursache für die beobachtete geringe Akkumulation von p53 in U87-*cd*-Zellen nach 5-FC-Behandlung ist. Allerdings könnten auch Zelltyp-spezifische Sensitivitätsunterschiede eine Rolle spielen und auch die Expression p53-inaktivierender und degradierender Faktoren wie z.B. MDM2 (Kap. 6) ist hier zu beachten.

Die p21-Induktion ist bei wt-p53 U87-Zellen nach ActoD-Behandlung ebenfalls stärker ausgeprägt, als nach Behandlung von U87-*cd* mit 5-FC. Auch der gemessene G₁-Arrest ist nach Behandlung mit ActoD bei den U87-Zelllinien deutlich ausgeprägter als nach *E.coli-cd/5-FC*-Therapie.

Dagegen reagierte die von Bunz et al. (1999) untersuchte Colonkarzinom-Zelllinie auf die 5-FU-Behandlung mit einer Akkumulation von p53 und (6 h später) mit einer deutlichen Akkumulation von p21. Nach 24 h trat ein G₁-Phase-Arrest ein, der fast die gesamte Zellpopulation einschloß. Nach 60 h waren fast alle Zellen anhand ihres subdiploiden DNA-Gehalts als apoptotisch einzustufen. Allerdings scheint p53 nicht immer nach Behandlung von wt-p53-Zellen mit 5-FU induziert zu werden, wie Yoneda et al. bei Plattenepithelzellkarzinom-Zelllinien zeigten (1998), es wurde dabei auch keine p21-Akkumulation festgestellt.

Daher scheint in der vorliegenden Arbeit p53 zwar durch die *E.coli-cd/5-FC*-Therapie in U87-Zellen zunächst aktiviert zu werden und die Transkription von p21 zu induzieren, jedoch führt diese Aktivierung nicht zu einem ausgeprägten, p21-vermittelten G₁-Arrest.

Im mt-p53-Modell 9L nahm nach Getherapie die p53-Konzentration insgesamt zu, wobei vor allem die Konzentration der in der SDS-PAGE langsameren p53-Form stieg, während die zweite p53-Variante abnahm. An Tag 3 der Behandlung war nur noch die langsamere Variante zu detektieren und nahm dann ebenfalls ab. Die ohnehin sehr geringe p21-Konzentration war nach Behandlung mit 5-FC nicht mehr zu detektieren. Die Zellen akkumulierten nach kurzzeitigem, schwachem Arrest in G₁ in der S-Phase.

Der p53-Status scheint die Sensitivität gegenüber einigen Chemotherapeutika zu beeinflussen (Lowe et al. 1994, Itaya et al. 1999). Die Cytotoxizität von 5-FU ist häufig mit dem p53-Status in Verbindung gebracht worden: Zellen mit wt-p53 sollten sensitiv und Zellen mt-p53 sollten nicht mehr sensitiv gegenüber einer 5-FU-Behandlung sein (Bunz et al. 1999, Arango et al. 2001). Inzwischen sind jedoch auch Berichte von Zellen mit mt-p53 erschienen, die trotz dieser p53-Inaktivierung sensitiv auf 5-FU reagierten (Nita et al. 1998, Yoneda et al. 1998, Mirjolet et al. 2000, Peters et al. 2000, Backus et al. 2001, Yoshikawa et al. 2001), so daß funktionelles p53 keine unabdingbare Voraussetzung für den cytotoxischen Effekt von 5-FU bzw. *E.coli-cd/5-FC* darstellen sollte. Auch die hier untersuchte Zelllinie 9L-*cd* ist gegenüber dem während der Getherapie entstehenden 5-FU trotz der p53-Mutation sensitiv.

Die hier unter *E.coli-cd/5-FC*-Getherapie festgestellte Akkumulation von mt-p53 ist auch von Mirjolet et al. (2000) nach Behandlung von Karzinomzelllinien mit 5-FU beobachtet worden. Dagegen fanden Peters et al. (2000) bei Colonkarzinomen und Yoneda et al. bei Plattenepithelzellkarzinomen keine mt-p53-Induktion nach 5-FU-Exposition. Da verschiedene posttranskriptionale Mechanismen zur gesteigerten Proteinsynthese bzw. Stabilisierung des vorhandenen p53-Proteins eine Rolle spielen, scheint es naheliegend zu vermuten, daß es hier bei Untersuchungen an Tumorzellkulturen, die häufig Mutationen in diesen p53-Signaltransduktionswegen aufweisen (Greenblatt et al. 1994), zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. So kann durch Inaktivierung der Stabilisationsfaktoren in diesen Zellen eine Akkumulation von p53 ausbleiben. Sofern die Art der p53-Mutation dies nicht ausschließt ist anzunehmen, daß auch das mutierte p53-Protein nach DNA/RNA-Schädigung von zellulären Faktoren modifiziert wird. Posttranslationale p53-Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung) betreffen im Wesentlichen den N- und den C-Terminus des p53-Proteins (Übersicht: Appella und Anderson 2000) und sollten daher von der 9L-Punktmutation der zentralen DNA-bindenden Domäne unbeeinflusst bleiben. p53-Akkumulation induziert durch „upstream“ in der Signalkette lokalisierte Faktoren scheint in den hier untersuchten Zellmodellen tatsächlich ein allgemeines Wirkungsprinzip der *E.coli-cd/5-FC*- und der HSV-*tk/GCV*-Therapie zu sein, unabhängig vom p53-Status. Die p53-Akkumulation ist unabhängig von den „downstream“ in der Signalkette folgenden

Prozessen, da in den mt-p53-Zellen zumindest die transkriptionsabhängigen p53-Signale ausbleiben, sozusagen ins Leere laufen.

p21 spielt in dem hier untersuchten mt-p53 9L-Zellmodell nach Gentherapie keine wesentliche Rolle. Es wird in 9L-*cd*-Zellen nur sehr gering exprimiert und ist bereits nach 24 h Behandlung nicht mehr nachweisbar. Als Apoptose-Antagonist kann es also nicht wirksam werden. Ob die geringe Menge p21 doch in irgendeiner Weise aktiv an den Zelltodvorgängen beteiligt ist, läßt sich nicht an dieser Stelle klären. Ursächlich und von wesentlicher Bedeutung scheint sie angesichts der geringen Mengen nicht zu sein.

Mirjolet et al. (2000) zeigten in humanen Karzinomzelllinien, daß die Zellen unabhängig von ihrem p53-Status nach 5-FU-Behandlung in der G₁-Phase akkumulieren. Ein ähnliches Ergebnis erhielten Bunz et al. (1999) und McGinn et al. (2000) bei der Untersuchung humaner Colonkarzinomzelllinien. Andere Veröffentlichungen zeigen jedoch einen S-Phase-Arrest von mit 5-FU behandelten Karzinomzelllinien (Yoneda et al. 1998, Backus et al. 2001). Dies stimmt mit den hier durchgeführten Zyklusanalysen überein. Die intrazellulär gebildeten 5-FU-Derivate stören sowohl die RNA- als auch die DNA-Synthese durch Einbau falscher Nukleotide und durch Inhibierung der Thymidylatsynthese insbesondere die DNA-Synthese. Für das Durchlaufen der S-Phase ist die Aktivität der Thymidylatsynthese erforderlich. Thymidylatsynthese-Inhibitoren induzieren S-Phase-Arretierungen (Bunz et al. 1999). Daher ist mit einem Arrest der 5-FU behandelten Zellen in der späten G₁- oder der S-Phase zu rechnen.

Nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie wurde wt-p53 in U87-Zellen erst nach 24-48 h induziert. Wei et al. (1998, 1999) detektierten ebenfalls wt-p53-Akkumulation in *tk*-transduzierten Tumorzelllinien (Melanom, Sarkom, Hepatome) jedoch bereits 12 h nach GCV-Behandlung. Beltinger et al. (1999) stellten p53-Akkumulation 24 h nach Behandlung einer Neuroblastomzelllinie mit HSV-*tk*/GCV fest. Dagegen konnten Craperi et al. 1999 nach GCV-Behandlung der *tk*-transduzierten Rattengliomzelllinie C6 keine Veränderung der p53-Proteinexpression feststellen, und Wallace et al. (1996) zeigten, daß HSV-*tk*/GCV-Gentherapie auch in p53-Null-Thyrozyten Zelltod induzieren kann. Dies bestätigten Xie et al. (1999) durch Untersuchungen von p53-Null-Zelllinien in denen die HSV-*tk*/GCV-Therapie ebenfalls funktionierte und deren Effizienz außerdem nicht durch eine Coexpression von wt-p53 gesteigert werden konnte. Daß dieses Therapiesystem auch in der mt-p53 Gliomzelllinie 9L effektiv ist, wurde bereits gezeigt (Cool et al. 1996) und konnte hier bestätigt werden. Glaser et al. (2001) zeigten ebenfalls funktionelle HSV-*tk*/GCV-Therapie in mt-p53 Gliomzelllinien.

Die zahlreichen Berichte von erfolgreicher HSV-*tk*/GCV-Gentherapie in mt-p53-Zelllinien sowie die Funktionalität der Therapie in p53-Null-Zellen läßt vermuten, daß p53 keine essentielle Voraussetzung für die Funktion dieser Therapie darstellt. In wt-p53-Zelllinien könnte p53 dennoch mitunter an den Zelltod-auslösenden Mechanismen beteiligt sein. Zumindest sind p53-Induktionen nach Therapie festgestellt worden, und auch in der hier untersuchten U87-*tk*-Zelllinie tritt diese Induktion zwar erst relativ spät in Erscheinung, die Expression steigt jedoch mit Zunahme der apoptotischen Zellen. Gleichzeitig mit dem Auftreten der p53-Akkumulation tritt jedoch auch eine Konzentrationserhöhung des p53-Antagonisten MDM2 auf, so daß zumindest die transkriptions-abhängigen p53-Funktionen größtenteils inhibiert sein dürften (Kap. 7). Allgemein läßt sich in den hier untersuchten Zellmodellen feststellen, daß Apoptose stattfindet, obwohl in allen Therapie-Systemen zumindest die Transkriptions-abhängigen p53-Funktionen eingeschränkt oder inhibiert sind: Das von 9L-Zellen exprimierte mutierte p53 ist per se transkriptionsinaktiv. Durch ActoD-Behandlung (1-2 µg/ml) wird in beiden Zellmodellen die Transkription allgemein inhibiert. Nach *E.coli-cd*/5-FC-Behandlung scheint wt-p53 nur an Tag 1 transkriptionell aktiv zu sein, da ab Tag 2 die gestiegene MDM2-Konzentration die wt-p53-Transkriptionsaktivierung inhibieren dürfte (Kap. 7). Dies scheint auch die ab diesem Zeitpunkt wieder sinkende MDM2-Konzentration zu bestätigen, da diese transkriptionell durch p53 reguliert wird. Im HSV-*tk*/GCV-System akkumuliert wt-p53 erst spät und wird dann vermutlich ebenfalls durch MDM2 bzw. das p60-MDM2-Fragment in seiner Transkriptionsaktivierung

inhibiert. Falls also wt-p53 eine wichtige Funktion in der Apoptoseauslösung nach den drei unterschiedlichen Stimuli in U87-Zellen ausübt, so ist diese hier eher bei den transkriptionsunabhängigen wt-p53-Funktionen zu suchen. Das auch transkriptionsunabhängige p53-Funktionen an der Apoptose-Auslösung beteiligt sein können, ist schon mehrfach berichtet worden, obwohl die genauen Ursachen dieser Effekte noch im Unklaren liegen (Caelles et al. 1994, Haupt et al. 1995, 1997, Chen et al. 1996, Marchenko et al. 2000). In diesem Zusammenhang konnte hier gezeigt werden, daß Veränderungen des mitochondrialen Transmembranpotentials nach Gen- oder Chemotherapie in wt-p53 U87-Zellen früher auftraten und dauerhafter waren als in den mt-p53 9L-Zellen. Marchenko et al. (2000) und Sansome et al. (2001) berichteten von einer Translokation des nukleären p53 zu den Mitochondrien nach Apoptose-Induktion. Mitochondrien können apoptotische Signale über verschiedene Signaltransduktionswege effektiv amplifizieren. Daher könnte hier zwischen dem p53-Status der Zelle und der Ausprägung apoptotischer Veränderungen der Mitochondrien ein kausaler Zusammenhang bestehen. In Zellen mit mutiertem p53 - wie der 9L-Zelllinie - bliebe diese Amplifizierung des apoptotischen Signals dann aus. Dies könnte mitverantwortlich für die höhere Sensitivität der U87-Zelllinien verglichen mit 9L-Zelllinien gegenüber ActoD und anderen Chemotherapeutika sein. Dennoch ist die Gentherapie in beiden Zellmodellen sehr effektiv. Eine direkte Vergleichbarkeit der Effektivität ist hier allerdings eingeschränkt, da die Stärke des cytotoxischen Effektes u.a. wesentlich von der Höhe der Suizidenzym-Expression abhängt (Kim et al. 2000), die hier nicht gemessen werden konnte und daher nicht als Bezugswert zur Verfügung steht.

Nach GCV-Behandlung änderte sich die p21-Proteinexpression in wt-p53 U87-*tk*-Zellen - trotz p53-Induktion - nicht. In den mt-p53 9L-*tk*-Zellen nahm die p21-Konzentration nach Behandlung mit GCV ab. Halloran und Fenton (1998) hingegen zeigten eine p53-abhängige Zunahme der p21-Expression in einem *tk*-transduzierten wt-p53 Melanommodell nach GCV-Behandlung in vivo und in vitro. In wt-p53 Zellen wäre eine p21-Induktion nach p53-Akkumulation eigentlich zu erwarten. In Gliomen wird eine nicht funktionierende p21-Induktion nach Bestrahlung als Mitursache für Radioresistenz vermutet (Kraus et al. 2000). Da hier zumindest in der U87-*cd*-Zelllinie eine p21-Induktion stattfindet, erscheint es zumindest unwahrscheinlich, daß die U87-*tk*-Zelllinie einen Defekt in der p21-Induzierbarkeit (infolge der Transduktion) aufweisen sollte. Da p21 in der Wachstumsarrest-Funktion von p53 eine Rolle spielt, jedoch nicht für die Apoptose-Auslösung, könnte es sich hier um eine direkte Einstellung der Zelle auf Apoptose ohne Wachstumsarrest handeln, die Mechanismen, die zur p53-vermittelten Apoptose führen sind noch nicht geklärt.

Bei 9L-*tk*-Zellen tritt nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie (24 h nach GCV-Applikation) eine zusätzliche p21-Proteinbande mit einer ungefähren Masse von 15kD auf. Gleichzeitig verschwindet die p21-„Originalbande“ vollständig. Es ist berichtet worden, daß p21 eine Schnittstelle für DEVD-Caspasen aufweist (Donato und Perez 1998, Gervais et al. 1998, Levkau et al. 1998, Zhang et al. 1999, Chai et al. 2000). Gervais et al. (1998) zeigten, daß p21 ein in vitro-Substrat der Caspase 3 darstellt. p21 wurde in einer myeloblastischen Leukämiezelllinie (ML1) nach Röntgenbestrahlung früh - noch vor dem Auftreten morphologischer Apoptosemerkmale - geschnitten. p21-Fragmentierung wurde außerdem in humanen Cervixkarzinomzelllinien nach Apoptose-Induktion durch TNF α (Donato und Perez, 1998), in humanen Endothelzellen nach Entzug von Wachstumsfaktor (Levkau et al. 1998) sowie in colorectalen Karzinomzellen nach Apoptose-Induktion durch Butyrat (Chai et al. 2000) demonstriert. Das entstehende p15-Fragment hat die PCNA-Bindungsstelle verloren (Gervais et al. 1998, Zhang et al. 1998, Chai et al. 2000). Die PCNA-Bindung ist vermutlich wichtig für die Inhibition der DNA-Replikation durch p21 (Waga und Stillmann 1998). Überexprimierung eines trunkierten p21-Proteins, welches lediglich eine Aminosäure länger als das p15-Fragment ist, resultierte in Tumorzellen in der Apoptose-Induktion, wohingegen p21 unter gleichen Bedingungen einen Wachstumsarrest auslöste (Prabhu et al. 1996). Hypothetisch könnte die Trennung von Cyclin-abhängige Kinasen- und PCNA-Bindungsdomäne zur Trennung und zumindest partiellen Inaktivierung der Wachstumsarrest- und Apoptose-Unterdrückungsfunktion von p21 führen, wonach Apoptose nicht mehr supprimiert werden kann. Es ist auch gemutmaßt worden, daß bei der Zerschneidung des p21-

Proteins dessen nukleäres Lokalisationssignal verloren geht, und p21 durch veränderte Lokalisierung inaktiviert wird (Levkau et al. 1998, Zhang et al. 1999). Bei dem p21-Fragment von ca. 15 kDa, welches in 9L-*tk*-Zellen nach Genterapie auftritt, könnte es sich demnach um ein solches DEVD-Caspasen-Schnittprodukt handeln. Durch zusätzliche Western Blot-Analysen mit spezifischen p21-Antikörpern gegen carboxy- und aminoterminalen Epitope könnte diese Frage vermutlich eindeutig geklärt werden. Der hier für die Immunoblotanalyse verwendete Antikörper F5 ist durch Immunisierung mit Gesamt-p21 der Maus gewonnen worden, das Epitop ist mit AA1-159 angegeben, ist also nicht spezifisch für die terminalen Bereiche, ist aber in der Lage, auch das p15-Fragment zu erkennen. In colorimetrischen Tests zur Analyse der Caspase 3-Aktivität in genterapeutisch behandelten 9L-*tk*-Zellen läßt sich eine solche Enzymtätigkeit zwar deutlich erst 24 h später nachweisen. Dies könnte u.a. an der vergleichbar weniger sensitiven Nachweismethode liegen, so daß p21 wahrscheinlich bereits von ersten aktivierten Caspase 3-Enzymen geschnitten wird, bevor die volle Aktivität der Effektorcaspase im Enzymtest detektierbar wird.

Hier konnte gezeigt werden, daß genterapeutisch mit HSV-*tk*/GCV behandelte Zellen (unabhängig von funktionellem p53) in der S-Phase des Zellzyklus blockiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fick et al. (1995), die Untersuchungen an *tk*-transduzierten C6-Rattengliomzellen und an Bystander-Maus-Fibroblasten durchführten, sowie mit Craperi et al. (1999), die ebenfalls C6-*tk* mit GCV behandelten und einen deutlichen S-Phase-Arrest feststellten. Einen Arrest in der späteren S-Phase bzw. G₂-Phase vermuteten dagegen Halloran und Fenton (1998) und Wei et al. (1998), beide Gruppen untersuchten eine *tk*-transduzierte Maus-Melanomzelllinie (B16F10). Die genau Wirkungsweise der HSV-*tk*/GCV-Genterapie ist noch nicht im Detail geklärt. Die wesentliche Ursache der Cytotoxizität soll jedoch der Einbau von GCV-Triphosphat in die DNA mit folgendem Strangabbruch sein. Dieser Mechanismus schädigt die Zellen in der DNA-Synthesephase, der S-Phase, weshalb eine Arretierung der Zellen in dieser Phase als am wahrscheinlichsten erscheint. Hierbei könnten unterschiedliche Schadensausmaße auftreten z.B. durch Aufnahme unterschiedlicher GCV-Dosen, so daß die Zellen bei einem hohen Maß an DNA-Schädigung direkt in der S-Phase in Apoptose gehen, bei einem niedrigeren Ausmaß jedoch zunächst am S/G₂-Restriktionspunkt arretieren. Dieser Restriktionspunkt dient als Kontroll- und Reparaturpunkt, können die Schäden nicht repariert werden, so gehen die Zellen dann nach heutigen Hypothesen in Apoptose.

6. p53-Zielgen bax, Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie

Bax ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie (Oltvai et al. 1993). Die Bax-Genexpression wird von p53 positiv reguliert, in vitro und in vivo (Miyashita et al. 1994, Miyashita und Reed 1995). Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Proteinexpressionsstudien von p53, bax und weiteren Mitgliedern der Bcl-2-Familie zusammen:

Zellmodell	ActoD	HSV- <i>tk</i> /GCV			E.coli- <i>cd</i> /5-FC		
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3
U87 (wt-p53)	p53 ↑	p53 ↔	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↔	p53 ↔
	Bax ↔	Bax ↔	Bax ↔				
	Bcl-2 ↓	Bcl-2 ↓	Bcl-2 ↓				
	Bcl-x _L ↓	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔
9L (mt-p53)	p53 ↓	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑	p53 ↑
	Bax ↗	Bax ↔	Bax ↔	Bax ↔	Bax ↔	Bax ↔	Bax ↔
	Bcl-2 ↓	Bcl-2 ↔	Bcl-2 ↔	Bcl-2 ↔	Bcl-2 ↓	Bcl-2 ↑	Bcl-2 ↑
	Bcl-x _L ↓	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↔	Bcl-x _L ↗	Bcl-x _L ↗	Bcl-x _L ↔

Tab. 26: Die Ergebnisse der Western Blot-Proteinexpressionsanalysen von p53 und Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax) während der HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-Suizidgenterapie (Tag 1-3) sowie

nach Behandlung mit Actinomycin D („ActoD“) sind in dieser Tabelle zusammengefaßt. Die Höhe der jeweiligen Proteinkonzentration wurde jeweils im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewertet, wobei ⇔ eine gleichbleibende, ↑ eine gestiegene, ↓ eine verringerte und ↗ ↘ eine nur leicht gestiegene bzw. verringerte Konzentration darstellen soll.

Die Proteinkonzentration von Bax änderte sich bei U87-Zelllinien weder nach Gentherapie noch nach ActoD-Behandlung. Bei 9L-Zelllinien wurde Bax im Vergleich nur sehr gering (basal) exprimiert. Diese Expression änderte sich nicht im Verlauf der Gentherapie, nur nach Behandlung mit ActoD ließ sich eine leichte Erhöhung feststellen.

In einem Ratten-Gliommodell (C6) mit wt-p53-Expression (Asai et al. 1994, Scotto et al. 1998) wurde nach HSV-*tk*/GCV-Gentherapie eine Erhöhung der Bax-Expression mittels Western Blot 24 h nach GCV-Applikation gezeigt (Craperi et al. 1999). Die Konzentration von p53 blieb währenddessen unverändert. Die Analyse ist mit den hier vorgelegten Ergebnissen nicht direkt vergleichbar, da u.a. die C6-Zellen mit einem anderen Expressionsvektor transduziert wurden. Die verwendete stabil transduzierte Zelllinie C6-*tk* scheint weniger sensitiv auf die GCV-Behandlung zu reagieren als die U87-*tk* oder 9L-*tk*-Zelllinie, da ein erster zytotoxischer Effekt erst nach 7 Tagen sichtbar wurde, wohingegen U87-*tk* und 9L-*tk* bereits nach 4 Tagen mehr als 50% Zelltod zeigten⁶. Die Bax-Expression war dagegen bereits nach 24 h GCV-Behandlung in C6-*tk* erhöht, die Bax-induzierte Zelltodmechanismen setzten sich also zumindest nicht direkt durch. Bisher ist kein anderer Bericht veröffentlicht worden, der eine Beteiligung von Bax am HSV-*tk*/GCV-vermittelten Zelltod postuliert. In einer Studie von Wei et al. (1998), die allerdings in einem murinen Melanommodell durchgeführt wurde, induzierte HSV-*tk*/GCV keine bax-Expressionserhöhung trotz p53-Akkumulation. Nach einigen typischen p53- und Bax-involvierenden, Apoptose-induzierenden Behandlungen von Gliomzelllinien bzw. Gliomen ist ein Ausbleiben der Bax-Konzentrationserhöhung beobachtet worden. So ändert sich die Bax-Expression nicht in den humanen Gliomzelllinien U87, U373MG (mt-p53) oder A172 (mt-p53) 48 h nach Bestrahlung (bis zu 20 Gy) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Badie et al. 1999). Auch nach Transduktion mit rekombinantem Adenovirus-Vektor zur Expression von humanem wt-p53 änderte sich die Bax-Expression in keiner dieser Linien, obwohl zumindest U373MG eine ausgeprägte Apoptose zeigte (Badie et al. 1999). Ein ähnliches Ergebnis beobachteten Trepel et al. (1998): Transduktion von wt-p53 in Gliomzelllinien mit mt-p53 (LN-18, LN-308) führte zwar zur Induktion von p21, nicht jedoch zu der von Bax. Dies stimmt mit in Primärtumoren gemachten Beobachtungen überein: Trotz Expression von funktionellem wt-p53 konnte in 50% der untersuchten primären Glioblastome nach Bestrahlung keine transkriptionelle Aktivierung von bax festgestellt werden (Kraus et al. 2000). Shuh et al. (1998) führten die intrinsische Radioresistenz mancher Glioblastomzelllinien auf die fehlende Induzierbarkeit von Bax zurück. Sie untersuchten die Glioblastomzelllinien U87, U343 und U563 und konnten keine Bax-Induktion 6-24 h nach Bestrahlung mit 5 Gy feststellen im Vergleich zu den radiosensitiven, Bax-hochregulierenden Medulloblastomzelllinien D283 und D341.

Allerdings zeigten Nita et al. (1998) Bax Hochregulation in wt-p53 humanen Karzinomzelllinien nach Behandlung mit 5-FU. Dies zeigten auch Peters et al. (2000) bei Behandlung von wt-p53 Colonkarzinomzelllinien, bei mt-p53 Zelllinien stellten sie eine nur geringfügige Erhöhung der Bax-Expression fest. Dagegen zeigten Zhang et al. (2000), daß colorectale Tumorzellen nach Deletion von Bax nur partiell resistent gegenüber 5-FU induziertem Zelltod wurden und Apoptose trotzdem stattfand.

Daß der bax-vermittelte Apoptoseweg in der U87-Zelllinie prinzipiell funktioniert, konnte nach Transduktion mit konstitutiv bzw. induzierbar exprimiertem bax-Gen gezeigt werden: Transfektion des konstitutiv exprimierten Gens resultierte in spontanem apoptotischem Zelltod. Apoptose zeigte sich nach Transfektion

⁶ Zwar ist die von Craperi et al. (1999) eingesetzte Konzentration von 20 µM GCV nur etwa halb so hoch wie die hier als Standard verwendete (10 µg/ml GCV entspricht 36 µM), jedoch liegen die IC₅₀ für U87-*tk* und 9L-*tk* noch deutlich darunter (6 ng/ml bzw. 50 ng/ml GCV, Tab. 5).

des regulierbaren *bax*-Gens erst nach Induktion von Bax (Vogelbaum et al. 1999). Apoptose nach Transfektion und Expression von *bax* in U87-Zellen zeigte auch eine Studie von Shinoura et al. (2001).

Die fehlende *bax*-Hochregulation als Antwort auf HSV-*tk*/GCV- oder E.coli-*cd*-Gentherapie bzw. ActoD-Behandlung in der wt-p53 Zelllinie U87 könnte daher auf einem vorgeschalteten Resistenzmechanismus beruhen. Dies erscheint vor allem deshalb wahrscheinlich, da die verschiedensten Stimuli in dieser Zelllinie keine Induktion von Bax hervorrufen. Wohingegen der Bax-Apoptose-Reaktionsweg in der Rattengliomzelllinie C6 häufiger involviert zu sein scheint: z.B. nach oxidativem Stress, Inkubation mit Interferon γ oder einem Calciumionophor (Ray et al. 1999) oder nach Acetaminophen-Inkubation (Bae et al. 2001). Andererseits könnte auch *bax*-Expressionserhöhung keine wesentliche Rolle in der Gentherapie- oder ActoD-vermittelten Apoptose von wt-p53-Zellen spielen. Daß sie zumindest entbehrlich ist, zeigt die hier vorgelegte Studie.

In der 9L-Rattengliosarkomzelllinie erklärt sich die geringe Expressionshöhe und ausbleibende Expressionserhöhung von *bax* nach Gentherapie zunächst durch die fehlende Funktionalität von mt-p53. Die angedeutete Bax-Erhöhung nach Actinomycin D-Behandlung müßte dann p53-unabhängig erfolgt sein. In humanen Zellen scheint die Expression von Bax direkt von p53 abhängig zu sein (Miyashita et al. 1994, Miyashita und Reed 1995). Neuere Untersuchungen im Mausmodell hingegen zeigen, daß die Bax-Expression hier zumindest nicht direkt transkriptionell durch p53 transaktiviert zu werden scheint (Igata et al. 1999, Schmidt et al. 1999), obwohl auch der Mauspromotor drei mögliche p53-Bindungsstellen enthält, die im humanen Promotor konserviert sind (Schmidt et al. 1999). Im Maus-System scheint die Bax-Expression p53-unabhängig u.a. durch Sp1 reguliert zu sein (Igata et al. 1999, Schmidt et al. 1999). Zur Zeit fehlen noch Untersuchungen des Ratten-Systems, jedoch ist es nicht unwahrscheinlich, daß dies auch auf den Ratten-Promotor zutrifft und die p53-unabhängige Bax-Hochregulierung nach ActoD-Behandlung erklärt. Sp1 als wichtiger Co-Faktor bei p53-induzierter Bax-Expression wird zur Zeit auch im humanen System diskutiert (Thornborrow und Manfredi 2001). p53-unabhängige Bax-Hochregulation ist auch in einer mt-p53 Pankreastumorzelllinie (PANC-1) nach Behandlung mit Actinomycin D gezeigt worden (Kleef et al. 2000).

Die Funktionsweise der Apoptoseinduktion durch Bax ist noch nicht genau geklärt. Neben der Erhöhung der Konzentration von Bax kann auch eine Änderung der Lokalisation ohne Konzentrationserhöhung zur Aktivierung beitragen, da letztendlich für die Wirkung von Bax der Eintritt von Bax in die äußere Mitochondrienmembran und anschließende Bildung von Bax-Homodimeren verantwortlich zu sein scheint. Dies wird durch eine Bax-Konzentrationserhöhung erleichtert, da Bax normalerweise mit anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie komplexiert vorliegt, was zur gegenseitigen Aufhebung der Funktion führt. Wird entweder die Bax-Konzentration erhöht oder aber die Konzentration der antiapoptotischen Faktoren erniedrigt, so können sich funktionelle Bax-Homodimere ausbilden.

Bax scheint normalerweise cytosolisch gelöst vorzuliegen, was auch durch die Immunfluoreszenzuntersuchung unbehandelter U87-Zellen bestätigt wird (nicht gezeigt). Erst nach Stimuli wie z.B. IL-3-Entzug, Staurosporin- oder Dexamethason-Behandlung und γ -Strahlung wird es zur Mitochondrienmembran gebundenen, apoptotisch-aktiven Form umgewandelt (Hsu et al. 1997, 1998, Wolter et al. 1997, Gross et al. 1998). Es wäre sicherlich interessant mittels differentieller Proteinextraktion/Western Blot-Analyse oder Immunfluoreszenzuntersuchung im U87-Zellmodell zu prüfen, ob sich die Lokalisation von Bax nach Gentherapie oder ActoD-Behandlung ändert. Die Bax-Expression im 9L-Modell war durch Immunfluoreszenz/Immunoblot im unbehandelten Zustand nicht nachweisbar, hier wäre ebenfalls die Überprüfung der Lokalisation nach ActoD-vermittelter Expressionserhöhung von Interesse.

Die Expression der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-x_L wurde mittels Western Blot-Proteinexpressionsanalyse nach Gentherapie und ActoD-Behandlung in den beiden Zellmodellen untersucht.

Nach Behandlung mit ActoD verringerte sich die Proteinkonzentration von Bcl-x_L im Vergleich zum unbehandelten Zustand bei allen untersuchten Zelllinien unabhängig vom p53-Status. Dagegen war nach Gentherapie mit HSV-*tk*/GCV oder E.coli-*cd*/5-FC im U87-Modell keine Änderung der Konzentration festzustellen. Im 9L-Modell zeigten sich unterschiedliche Reaktionen abhängig vom verwendeten Gentherapie-System: Bei 9L-*tk*-Zellen war nach GCV-Behandlung eine zunehmende Menge an Bcl-x_L-Protein mit geringerer Beweglichkeit im PAA-Gel zu beobachten. Dies war auch in 9L-Zellen nach GCV-Behandlung in geringerem Maße zu beobachten. Bei 9L-*cd*-Zellen war eine geringfügige, anfängliche Konzentrationserhöhung von Bcl-x_L nach 5-FC-Applikation festzustellen, die nach 72 h wieder zurückging.

Bcl-x_L-Phosphorylierung wurde in malignen Zellen verschiedener Herkunft nach Behandlung mit Mikrotubuli-schädigenden Substanzen (u.a. Vincristin) beobachtet (Poruchynsky et al. 1998). Bcl-x_L ist ein potentielles Phosphorylierungssubstrat für Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPKs)⁷ und p38 MAP-Kinase in vitro und in vivo (Fan et al. 2000, Kharbanda et al. 2000). Diese Kinasen werden aktiviert nach Stimuli wie z.B. DNA-Schädigung, Hitzeschock, Aktivierung von CD95 oder TNF-RI (Übersicht: Miyata und Nishida 1999).

SAPK phosphoryliert Thr-47 und Thr-115 von Bcl-x_L. Diese Phosphorylierung behindert die Komplexbildung mit Bax anscheinend nicht, wie Immunpräzipitationsstudien zeigten, jedoch ist die anti-apoptische Wirkung des phosphorylierten Proteins verringert (Kharbanda et al. 2000). Die zusätzliche Proteinbande, die im Verlauf der Gentherapie in 9L-*tk*-Zellen gebildet wird, könnte demnach phosphoryliertes Bcl-x_L sein und die Apoptose dieser Zellen begünstigen. Andere posttranslationale Veränderungen des Bcl-x_L-Proteins oder alternative Spleißprodukte von entsprechender Größe, sind bisher nicht bekannt. Daß diese Veränderung zumindest nicht obligat mit HSV-*tk*/GCV-Gentherapie verbunden ist, zeigt das Ausbleiben dieser zweiten Bcl-x_L-Bande in U87-*tk*-Zellen. Glaser et al. (2001) zeigten in *tk*-transduzierten mt-p53 Gliomzelllinien einen Verlust der Bcl-x_L-Expression nach GCV-Behandlung. Überexpression eines Bcl-x_L-Transgens inhibierte die HSV-*tk*/GCV-vermittelte Toxizität. Bcl-x_L-Überexpression erhöhte auch die Resistenz von Mammakarzinomen im Maus-Modell gegenüber 5-FU-Behandlung (Liu et al. 1999). Bcl-x_L-Antisense-Oligonukleotide konnten in Colonkarzinomen den 5-FU-Therapieeffekt verstärken (Nita et al. 2000).

Die Apoptose-Induktion nach E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie ist im 9L-Modell nach den hier vorgelegten Ergebnissen nicht auf bloße Konzentrationsverschiebungen von pro- bzw. antiapoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zurückzuführen. Interessanterweise kann die beobachtete leichte Konzentrationserhöhung der antiapoptischen Faktoren bei gleichzeitig fehlender Bax-Induktion den apoptotischen Zelltod der 9L-*cd*-Zellen nicht unterdrücken.

Im wt-p53-Modell U87 sind beide Gentherapie-Systeme mit einem Rückgang der Bcl-2-Expression verbunden. Dieser Rückgang könnte mit der p53-Akkumulation zusammenhängen, da der Bcl-2-Promoter durch p53 negativ reguliert werden kann (Miyashita et al. 1994b, Budhram et al. 1999, Wu et al. 2001). Dies würde auch den etwas deutlicheren Rückgang bei U87-*tk*- im Vergleich zu U87-*cd*-Zellen erklären, da U87-*cd*-Zellen p53 nur vorübergehend 24 h nach 5-FC-Behandlung schwach akkumulieren, wohingegen bei GCV-behandelten U87-*tk*-Zellen die p53-Konzentration zwar später aber deutlicher und länger andauernd steigt. Die Supprimierung von Bcl-2 bereits 24 h nach GCV-Applikation in U87-*tk*-Zellen vermag dies jedoch nicht allein zu erklären, so daß zumindest weitere Faktoren hier eine Rolle spielen müssen. Inwieweit allerdings freies, nicht von MDM2 komplexiertes p53 für die Bindung an den Bcl-2-Promotor zur Verfügung steht, ist heute noch unklar.

Apoptose könnte durch eine Verschiebung der Balance von antiapoptischen und pro-apoptischen Zellen zugunsten der pro-apoptischen Faktoren induziert worden sein. Eine Korrelation zwischen der Sensitivität von Karzinomzelllinien gegenüber 5-FU und dem Bcl-2/Bax-Konzentrationsverhältnis wurde von Mirjole et al. (2000) gezeigt. Dies konnte allerdings von Backus et al. (2001) in Colonkarzinomzelllinien nicht

⁷ auch bekannt als c-Jun-aminoterminal Kinasen (JNKs)

bestätigt werden. Nach ActoD-Behandlung sanken in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L und Bcl-2 (außer bei 9L-*cd*). Da die Konzentration von Bax dabei unverändert blieb bzw. in 9L-Zelllinien sogar anstieg, könnten allgemein die Apoptose begünstigenden Faktoren an Einfluß gewonnen haben.

Allgemein läßt sich feststellen, daß die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L in U87- und 9L-Zelllinien im Vergleich zur normalen Glia, in der diese Proteine immunhistochemisch nicht nachweisbar sind (Rieger et al. 1998), überexprimiert werden. Eine vergleichsweise hohe Expression von Bcl-x_L und Bcl-2 in U87 ist auch von Shinoura et al. (2001) gezeigt worden. Dies wird häufig in Gliomen (Nakasu et al. 1994, Ellison et al. 1995a,b, Krishna et al. 1995, Weller et al. 1995, Schiffer et al. 1996, Krajewski et al. 1997, Rieger et al. 1998, Prayson 1999, Fels et al. 2000) beobachtet und ist wahrscheinlich in Zusammenhang mit Selektionsvorteilen für maligne Zellen im Entartungsprozess zu sehen. In normalen Astrocyten läßt sich auch Bax normalerweise nicht nachweisen (Rieger et al. 1998). Die höhere Empfindlichkeit der U87-Zelllinien, die höhere Rate an spontaner Apoptose im Vergleich zu 9L-Zelllinien könnte im Zusammenhang mit der ebenfalls erhöhten Bax-Expression in U87 gesehen werden. Vielleicht ist auch aufgrund dieser höheren basalen Expression nach p53-Aktivierung keine weitere Zunahme der Bax-Proteinkonzentration mehr möglich.

7. p53-Zielgen Proto-Onkogen *mdm2*

Die *mdm2*-Expression wird von p53 transkriptionell positiv reguliert (Barak et al. 1993, Wu et al. 1993). Das Protein MDM2 bindet p53 und inhibiert dadurch die transkriptionelle Aktivierung von p53-Zielgenen (Momand et al. 1992). Die Bindung von MDM2 stellt den ersten Schritt auf dem p53-Abbauweg dar: MDM2-gebundenes p53 wird über den Ubiquitin-Proteinabbauweg degradiert (Haupt et al. 1997, Kubbutat et al. 1997). Alternativ zur Inaktivierung von p53 durch Mutation kann Überexpression von *mdm2* die gleiche Wirkung erzielen (Chen et al. 1996). *Mdm2*-Überexpression wird tatsächlich in einer Vielzahl verschiedener Tumore gefunden und beruht auf verstärkter Transkription (Bueso-Ramos et al. 1993, Watanabe et al. 1994), erhöhter Translation (Landers et al. 1994, 1997) oder Genamplifikation (Oliner et al. 1992, Meddeb et al. 1996). MDM2-Amplifikationen wurden auch in Gliomen gefunden (Adesina et al. 1994, He et al. 1994, Reifenberger et al. 1993, 1994, 1996, Biernat et al. 1997, 1998, Schiebe et al. 2000), zumeist in Abwesenheit von p53-Mutationen. Die folgende Tabelle faßt die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse der p53- und MDM2-Proteinexpressionsstudien zusammen:

Zellmodell	ActoD	HSV- <i>tk</i> /GCV			E.coli- <i>cd</i> /5-FC		
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 1	Tag 2	Tag 3
U87 (wt-p53)	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ⇔ MDM2 ⇔	p53 ↑ MDM2 ↑	p53 ↑ MDM2 ↑	p53 ↑ MDM2 ↗	p53 ↗ MDM2 ↑	p53 ⇔ MDM2 ⇔
9L (mt-p53)	p53 ↓ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓	p53 ↑ MDM2 ↓

Tab. 27: Ergebnisse der Western Blot-Proteinexpressionsanalysen von p53 und MDM2 während der HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC-Suizidgentherapie (Tag 1-3) sowie nach Behandlung mit Actinomycin D („ActoD“). Die Höhe der jeweiligen Proteinkonzentration wurde jeweils im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewertet, wobei ⇔ eine gleichbleibende, ↑ eine gestiegene, ↗ eine geringfügig gestiegene und ↓ eine verringerte Konzentration darstellen soll.

In der wt-p53-Zelllinie U87 stieg nach p53-Akkumulation induziert durch beide Gentherapiesysteme in der Folge auch die MDM2-Proteinkonzentration. Dies entspricht dem, was man nach DNA-Schädigungen er-

warten würde. Die direkte Induktion von MDM2 durch p53 nach z.B. UV-Strahlung und γ -Strahlung ist in vitro und in vivo bereits gezeigt worden (Perry et al. 1993, Chen et al. 1994, Reinke und Lozano 1997). MDM2 besitzt zwei Promotoren: P1 und P2. Der „upstream“ Promotor P1 wird konstitutiv benutzt und wird von p53 nicht beeinflusst. Daher wird *mdm2* auch in der *mt-p53* Zelllinie 9L exprimiert. P2 besitzt zwei p53-Bindungsstellen und ist durch *wt-p53* induzierbar (Juven et al. 1993, Wu et al. 1993, Barak et al. 1994). Dieser Promotor kann also nur in der *wt-p53* Zelllinie U87, nicht in 9L-Zellen, aktiviert werden. Man nimmt an, daß die MDM2-Induktion durch aktiviertes p53 zum schnellen Abbau von überschüssigem *wt-p53* dient, nachdem DNA-Schäden repariert wurden, und die Zelle wieder zum „Normalzustand“ übergeht. Die Verzögerung der MDM2-Akkumulation bestimmt dann das aktive Zeitfenster für *wt-p53*. Dies könnte hier beim *E.coli-cd/5-FC*-System der Fall sein: In U87-*cd*-Zellen akkumulierte p53 nach 5-FC-Behandlung deutlich bereits an Tag 1 der Behandlung, während die MDM2-Konzentration an Tag 1 kaum stieg und erst an Tag 2 deutlich zunahm. Die *wt-p53*-Akkumulation nahm ab diesem Tag wieder ab und war an Tag 3 kaum noch nachzuweisen. An Tag 3 fiel dann auch die MDM2-Konzentration wieder in etwa auf den unbehandelten Vergleichswert zurück. Demnach ist anscheinend die *wt-p53*-Funktion in dieser Zelllinie nach 5-FC-Behandlung auf den Tag 1 beschränkt. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für die ausbleibende oder eingeschränkte Induktion einiger p53-Zielgene und die geringe Ausprägung des G₁-Arrests nur an Tag 1 liefern. Chen et al. (1996) zeigten in Co-Transfektionsstudien, daß MDM2-vermittelter Abbau von p53 direkt für den Rückgang eines p53-induzierten G₁-Arrestes verantwortlich sein kann. Im HSV-*tk/GCV*-System nimmt die MDM2-Konzentration ebenfalls in etwa parallel zur *wt-p53*-Akkumulation zu: p53 akkumulierte ab Tag 2 und stieg weiter an an Tag 3. MDM2 nahm insgesamt ebenfalls ab Tag 2 zu und stieg auch an Tag 3 an. Hier war also (im Gegensatz zum *E.coli-cd/5-FC*-System) keine Reduzierung der p53-Konzentration nach Induktion der MDM2-Expression festzustellen.

Da trotz hoher MDM2-Konzentration *wt-p53* nicht abgebaut wird, scheint hier *wt-p53* gegen MDM2-vermittelten Abbau stabilisiert zu werden. Zur Zeit sind bereits zwei solcher Mechanismen bekannt: Phosphorylierung von p53 im Bereich der MDM2-Bindungsdomäne und Komplexierung von MDM2 mit p19^{ARF}. Diese Mechanismen der *wt-p53*-Stabilisierung scheinen in Abhängigkeit vom Stimulus unterschiedlich aufzutreten: Phosphorylierung von Serinresten (-15, -20) des p53-Proteins sind in vitro und in vivo nach Einwirkung von UV- oder ionisierender Strahlung gezeigt worden (Siliciano et al. 1997, Shieh et al. 1997, 1999, Maya et al. 2001, de Toledo et al. 2000). Diese Phosphorylierungen reduzieren die Komplexierung von MDM2 und p53, wodurch p53 transkriptionell aktiviert und außerdem vor dem MDM2-vermittelten Abbau geschützt wird (Shieh et al. 1997, Unger et al. 1999). Eine N-terminale p53-Phosphorylierung scheint jedoch zumindest bei der *wt-p53*-Aktivierung nach ActoD Behandlung keine Rolle zu spielen (Ashcroft et al. 1999, 2000). Für die Gentherapie oder die 5-FU-Chemotherapie ist dies noch nicht untersucht.

p19^{ARF} ist ein Tumorsuppressorprotein⁸, das im INK4a-ARF-Lokus encodiert ist (Quelle et al. 1995). p19^{ARF} bindet MDM2 und sequestriert es im Nucleolus (Pomerantz et al. 1998, Weber et al. 1999). p53 kann dann nicht mehr durch den MDM2-p19^{ARF}-Komplex aus dem Nucleus exportiert (Tao und Levine 1999, Zhang und Xiong 1999) und durch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MDM2 abgebaut werden (Honda und Yasuda 1999, Midgley et al. 2000). Auch die p19^{ARF}-Expression ist nach Gentherapie oder Chemotherapie mit 5-FU oder ActoD noch nicht untersucht worden. Nach ActoD-Behandlung zeigten jedoch Ashcroft et al. (2000) eine Sequestrierung von MDM2 im Nucleolus, während p53 im Nucleoplasma vorlag, was zumindest eine p19^{ARF}-Beteiligung nicht ganz abwegig erscheinen läßt. p19^{ARF}-Induktion ist bisher jedoch nur nach Onkogen-stimulierter Hyperproliferation festgestellt worden (Übersicht: Zhang und Xiong 2001).

In der *tk*-transduzierten U87-Zelllinie trat neben den auch im unbehandelten Zustand und in nicht transduzierten Zellen auftretenden MDM2-Isoformen 48 h nach GCV-Applikation eine zusätzliche Proteinban-

⁸ p19^{ARF} im Mausmodell, p14^{ARF} im humanen Modell

de von etwa 60kD auf. Diese könnte durch alternatives Spleißen⁹ oder aber durch Zerschneiden¹⁰ der p90/p85-Varianten entstanden sein. Diese Frage könnte durch Western Blot-Analyse mit einem gegen den C-Terminus des MDM2-Proteins gerichteten Antikörper abschließend geklärt werden, da, sollte die 60kD Proteinisoform ein Caspaseschnittprodukt sein, anders als bei einem alternativen Speißprodukt, gleichzeitig mit der Zunahme der 60kD-Bande, eine äquimolare Menge des zweiten, etwa 30kD großen Spaltproduktes nachzuweisen sein müßte. Das entstehende Proteinprodukt umfaßt jedoch (gleich welchen Ursprungs) bis auf wenige Aminosäuren die gleichen funktionellen Sequenzabschnitte und weist daher sehr wahrscheinlich die gleichen funktionellen Eigenschaften auf. Die Funktion dieses Fragmentes ist insgesamt aber eher noch unklar. Das MDM2-Fragment besitzt noch immer die Fähigkeit, p53 zu binden und dessen Transkriptionsaktivität zu inhibieren (Chen et al. 1997). Dem Protein fehlen Sequenzen, die zur Interaktion mit RNA-Komponenten dienen (Elenbaas et al. 1996, Roth et al. 1998) und eine Rolle in der Translationskontrolle, der Ribosomenbiogenese oder dem Transport von RNA spielen könnten (Friedman et al. 1999). Das Fragment könnte also außerdem eigene, p53-unabhängige Funktionen in der Apoptose haben. Es fehlt der Sequenzbereich mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die den Ubiquitin-vermittelten p53-Abbau einleitet (Honda et al. 1997). Dies könnte bedeuten, daß weniger p53 degradiert wird. Außerdem sind Sequenzen, die zur Ubiquitinkopplung von MDM2 und nachfolgendem Selbstabbau führen, entfernt, was ebenfalls zu einer Stabilisierung des Fragmentes führen könnte.

In der *cd*-transduzierten U87-Zelllinie wurde diese MDM2-Isoform nicht induziert. Die in dieser Zelllinie gemessene Caspase 3-Aktivität war wesentlich geringer als bei U87-*tk*-Zellen und stieg erst an Tag 3 auf vergleichbare Werte. Die Enzymaktivität könnte daher zu gering oder in zu wenigen Zellen vorhanden sein, um eine massive Bildung des 60 kD-Proteins zu bewirken. Außerdem ist bekannt, daß Caspase-Substrate infolge verschiedener Todes-Stimuli mitunter unterschiedlich prozessiert werden können. So wird z.B. Actin nach Serumentzug in PC12-Zellen geschnitten (Kayalar et al. 1996), jedoch bleibt nach anderen Apoptose-induzierenden Stimuli in anderen Zelllinien eine Caspaseprozessierung von Actin aus (Song et al. 1997). Andererseits könnte auch aufgrund des andersartigen Stimulus eine etwaige Umstellung des alternativen Spleißmusters in U87-*cd*-Zellen ausbleiben. Eine Bildung des 60 kD-Fragmentes wurde in keiner 9L-Zelllinie nach Gentherapie oder ActinomycinD-Behandlung beobachtet, obwohl die DEVD-Konsensussequenz auch im Rattengenom erhalten ist (Freedman et al. 1999) und Caspase 3 aktiv war. Auch nach Behandlung der U87-Zelllinien mit ActoD wurde kein MDM2-Schnitt/Spleiß-Produkt detektiert. In diesen Fällen fand eine andere Inaktivierung von MDM2 statt: Nach Behandlung mit ActoD war MDM2 in allen 9L- und auch in den U87-Zelllinien nicht mehr nachzuweisen, ebenso nach Gentherapie in 9L-Zelllinien. Nach ActoD-Behandlung von 9L-Zelllinien ging die p53-Konzentration zurück, bei U87-Zelllinien wurde p53 jedoch induziert. Nach Gentherapie nahm p53 in 9L-Zelllinien zu.

Die Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung durch UV-Strahlung oder Chemotherapie scheint zumindest zum Teil auf eine p53-unabhängige Verringerung der *mdm2*-RNA- und -Proteinkonzentration zurückzuführen zu sein (Wu und Levine 1997, Alarcon et al. 1999, Arriola et al. 1999, Blattner et al. 1999, Ashcroft et al. 2000, Ma¹¹ et al. 2000, Zeng et al. 2000, Inoue et al. 2001, Lu et al. 2001). Diese Unter-

⁹ Bedingt durch alternatives Spleißen (Olson et al. 1993) sowie durch die Benutzung alternativer Promotoren (Barak et al. 1994, Zauberman et al. 1995) tritt MDM2 in verschiedenen Isoformen auf. Fünf verschiedene Spleißvarianten (p90, p85, p76, p74, p58 und p57) kommen z.B. in der 3T3DM-Zelllinie, aus der MDM2 zuerst kloniert wurde, vor (Olson et al. 1993). Von diesen Varianten besitzen nur p90, p85, p58 und p57 die N-terminale p53-Bindungsdomäne (AA 17-125) (Olson et al. 1993).

¹⁰ Es ist von einem in p53-vermittelter Apoptose entstehenden p60-Spaltprodukt (durch DEVD-Caspasen-Schnitt gebildet) berichtet worden (Chen et al. 1997, Erhardt et al. 1997). Die DEVD-Caspasen-Schnittstelle ist evolutionär konserviert und bei Mensch, Maus, Xenopus und Zebrafisch nachzuweisen (Freedman et al. 1999, Chen et al. 1997).

¹¹ Ma et al. (2000) zeigten diesen Effekt nach Behandlung mit Adriamycin (syn. Doxorubicin). Adriamycin interkaliert ebenso wie ActoD in die DNA und komplexiert mit Topoisomerase II (Potmesil et al. 1983, Abdella und Fisher 1985, Wassermann et al. 1990), beides sind starke p53-Induktoren (Fritsche et al. 1993).

suchungen fanden z.T. auch in mt-p53 Zellen statt (Ashcroft et al. 2000, Ma et al. 2000). So ist gezeigt worden, daß nach UV-Strahlung in wt-p53 Zellen zunächst die MDM2-Konzentration p53-unabhängig sinkt und danach bedingt durch p53-Akkumulation wieder steigt. Nach Gentherapie bzw. ActoD-Behandlung wurde auch in der vorliegenden Arbeit anscheinend eine solche p53-unabhängige MDM2-Konzentrationsreduktion induziert, da dies sowohl in wt-p53- als auch in mt-p53-Zellen festgestellt werden konnte.

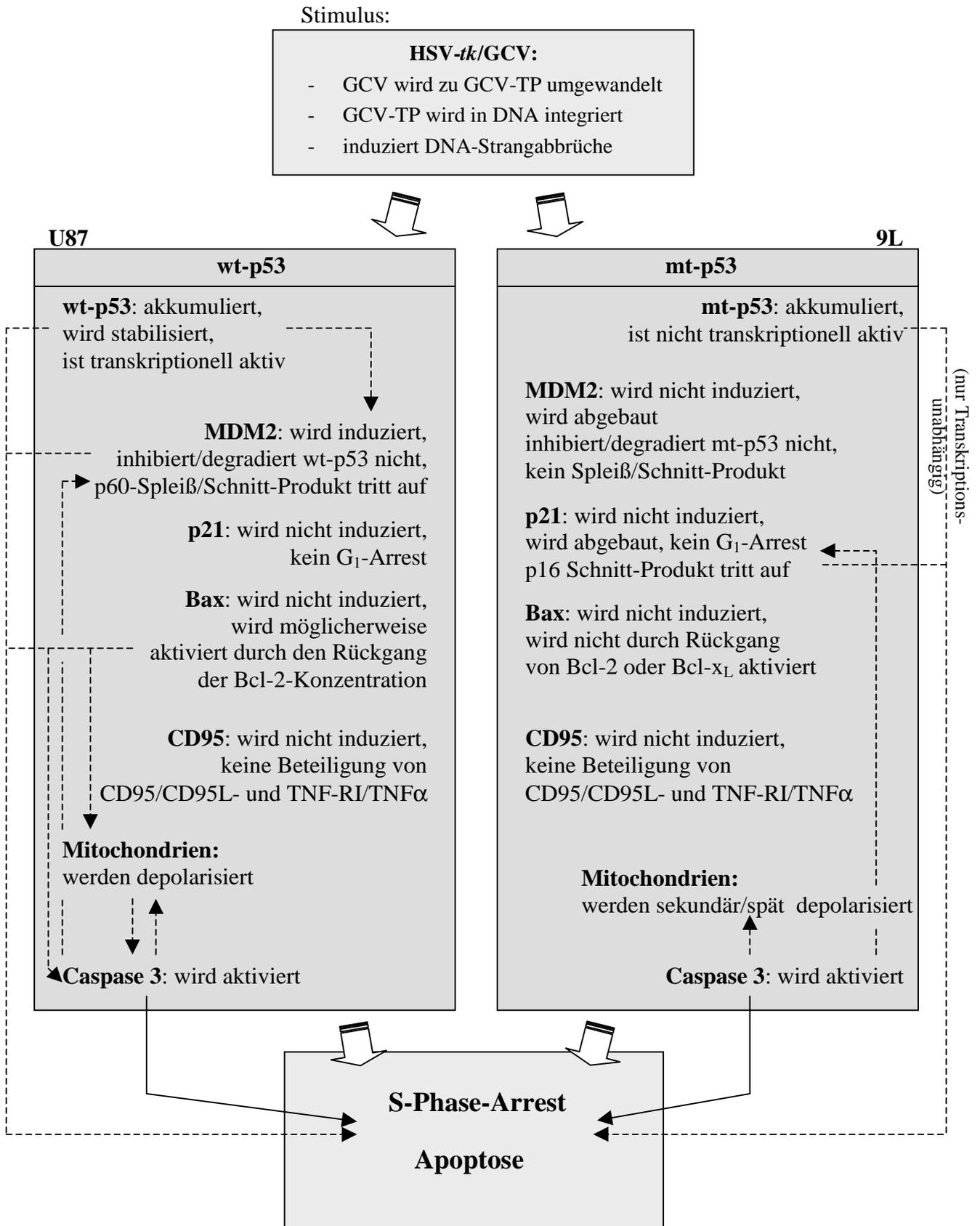
Blattner et al. (1999) zeigten einen Rückgang der MDM2-mRNA- und -Proteinkonzentration nach Behandlung einer Lymphblastenzelllinie mit 0,06 µg/ml (5nM) ActoD. Allerdings fanden Ashcroft et al. (2000) nach ActoD-Behandlung (mit 10x geringerer Dosierung) von wt-p53-Zellen eine p53-induzierte mdm2-Induktion, jedoch waren p53- und MDM2-Proteine in verschiedenen Kompartimenten getrennt voneinander lokalisiert, was eine alternative mdm2-Inaktivierung darstellen könnte. Diese unterschiedliche Ergebnisse könnten auf Zelllinien-spezifische oder Dosis-abhängige Unterschiede in der Signaltransduktion zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung für die induzierte, p53-unabhängige Herunterregulation von MDM2 auf Proteinebene, zeigten Untersuchungen von Buschmann et al. (2000): Bestrahlung führte zu einer Reduzierung der Sumoylierung von MDM2. Diese posttranslationale Modifikation schützt MDM2 vor dem Abbau. Nach Bestrahlung wurde MDM2 daher verstärkt abgebaut, wodurch p53 indirekt aktiviert wurde. Nach DNA-Schädigung durch Chemo- oder Gentherapie ist dieser Mechanismus bisher noch nicht analysiert worden. Mögliche Ursachen der Reduktion von mdm2 auf transkriptioneller Ebene sind noch nicht bekannt.

Zu dem hier in den Untersuchungen festgestellten MDM2-Protein-Konzentrationsrückgang könnten also im Wesentlichen folgende Faktoren beitragen: ActoD führt zur Inhibierung der Transkription, so daß hier die Neubildung von MDM2-Transkripten vermutlich eingeschränkt ist. MDM2-Protein besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit und muß daher zur Aufrechterhaltung der normalen Expressionshöhe stetig erneut synthetisiert werden ($t_{1/2} \approx 15-20$ min, Olson et al. 1993). Nach Gentherapie in 9L-Zelllinien und nach ActoD-Behandlung von U87- und 9L-Zelllinien könnten p53-unabhängige Mechanismen zum Rückgang der MDM2-mRNA- und -Proteinkonzentration beitragen. In mt-p53-Zellen ist auch die ausbleibende erneute Induktion von mdm2 durch aktiviertes p53 zu nennen. Zusätzlich trägt in einer Situation, in der Proteinneubildung ausbleibt, der Verlust von MDM2 durch den stetigen Abbau von p53, bei dem MDM2 mitabgebaut wird, vermutlich zur Reduktion des MDM2-Proteinlevels bei.

Für die Degradierung von p53 durch MDM2 ist die MDM2-Bindungsstelle, welche N-terminal im p53-Protein lokalisiert ist (AA 18-23), zugleich Voraussetzung und ausreichend. Übertragung dieser Domäne auf andere Proteine macht sie sensitiv für MDM2-vermittelten Proteinabbau (Haupt et al. 1997). MDM2 induziert daher nicht nur den Abbau von wt-p53, sondern auch von mutiertem p53-Protein effizient, solange die Bindungsdomäne vorhanden und zugänglich ist (Haupt et al. 1997, Kubbutat et al. 1997). Diese Domäne ist in dem von den 9L-Zellen exprimierten mt-p53 vorhanden und nicht von der Punktmutation betroffen. Es ist daher wahrscheinlich, daß auch das von 9L-Zellen exprimierte mt-p53 von MDM2 abgebaut wird.

Die Schlußfolgerungen aus den Proteinexpressionsstudien und den durchflußzytometrischen Analysen für die Signaltransduktion in den wt- und mt-p53-Zellmodellen nach Gentherapie mit HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd*/5-FC oder ActoD-Behandlung sind in den folgenden hypothetischen Erklärungsmodellen zusammengefaßt:

8. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach HSV-tk/GCV-Gentherapie



Deutung der zellulären Vorgänge im wt-p53-Modell U87

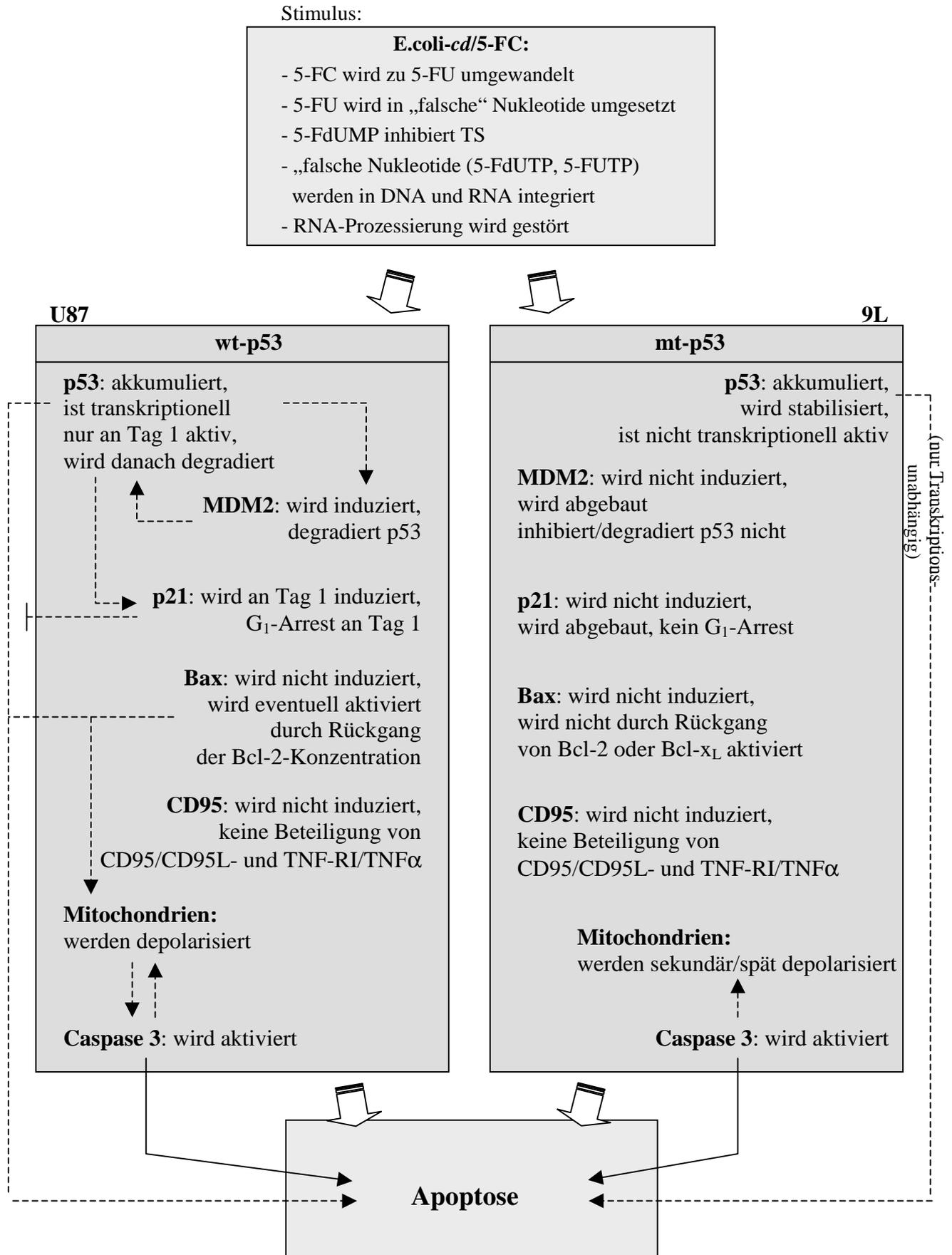
Das intrazellulär gebildete GCV-Triphosphat (GCV-TP) wird als Guanosinderivat in wachsende DNA-Stränge eingebaut, die dann nicht elongiert werden können. Es resultieren DNA-Strangbrüche, die hauptsächlich in der DNA-Synthese-Phase, der S-Phase, auftreten. Der anfänglich auftretende deutliche S-Phase-Arrest ist wahrscheinlich als Konsequenz daraus zu sehen. Wt-p53 wird in diesem System an Tag 2 induziert (später als im *E.coli-cd/5-FC*-System). Dies führt zur Induktion des p53-Zielgens MDM2. Allerdings wird hierdurch nicht die Degradation von wt-p53 eingeleitet: wt-p53 scheint entweder vor MDM2-vermitteltem Abbau geschützt zu sein und/oder hauptsächlich von dem nun neu auftretenden p60-MDM2-Fragment gebunden zu werden. Dieses Fragment könnte ein Caspase-3-Schnittprodukt oder ein alternatives Spleißprodukt sein. Die Bindung von p60 schützt wt-p53 zum einen vor Abbau, zum anderen können dadurch zwar die transkriptionsaktivierenden wt-p53-Funktionen unterbunden werden, nicht jedoch die transkriptionsunabhängigen. Daher könnten diesen Funktionen von wt-p53 hier eine besondere Bedeutung in der Apoptoseauslösung zukommen. Die übrigen p53-Zielgene werden nicht induziert. So bleibt die p21-Konzentration unverändert, ein G₁-Phasenarrest tritt nicht auf. Die Bax-Konzentration wird ebenfalls nicht verändert, allerdings sinkt die Bcl-2-Konzentration. Diese Verschiebung der Bax/Bcl-2-Relation könnte zu der beobachteten Depolarisierung der Mitochondrien führen. Diese könnte dann die Effektorphase mit der Aktivierung von Caspase 3 (die aber auch unabhängig davon aktiviert sein könnte) einleiten.

Deutung der zellulären Vorgänge im mt-p53-Modell 9L

Im mt-p53-Modell ist der induzierte S-Phase-Arrest wesentlich ausgeprägter und hält über den gesamten Behandlungszeitraum an. Auch mt-p53 akkumuliert hier nach Einsetzen der Therapie (früher als im wt-p53-Modell). Mt-p53 ist aber, bedingt durch die Mutation, transkriptionell nicht aktiv. Dies zeigt auch die ausbleibende Aktivierung der hier untersuchten p53-Zielgene. Inwieweit es noch über transkriptionsunabhängige Funktionen verfügt, ist unklar. Diese könnten also potentiell eine Rolle in der Apoptose-Induktion spielen.

Mt-p53 scheint zunächst gegenüber MDM2-vermitteltem Abbau stabilisiert zu werden oder so stark zu akkumulieren, daß ein Abbau von mt-p53/MDM2 nicht sichtbar wird. MDM2 degradiert Therapie-induziert ab Tag 1, inhibiert dadurch auch eventuell verbliebene Restfunktionen von p53 nicht mehr. Die Konzentration des ohnehin gering exprimierten p21 nimmt nach Therapie weiter ab, zusätzlich wird ein putatives p16-Caspase-Schnittprodukt von p21 detektiert. Diesem p16-Protein wird proapoptotische Wirkung zugeschrieben. Der Abbau des „Apoptose-Suppressors“ p21 könnte außerdem indirekt Apoptose auslösen. Die untersuchten Bcl-2-Familienmitglieder scheinen in diesem System zumindest keine durch Konzentrationsveränderungen herbeigeführten pro- oder anti-apoptotischen Funktionen auszuüben. Andere Einflüsse sowie Beteiligung weiterer Bcl-2-Mitglieder sind jedoch nicht auszuschließen. Mitochondrien werden hier ebenso wie bei den übrigen Behandlungen im mt-p53-Modell erst sehr spät depolarisiert und scheinen daher an der Induktion der Apoptose nicht wesentlich beteiligt zu sein. Auch in diesem System führen die zellulären Reaktionen auf die Therapie zur Induktion von Caspase 3, die an der Effektorphase der Apoptose beteiligt ist.

9. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach E.coli-cd/5-FC-Gentherapie



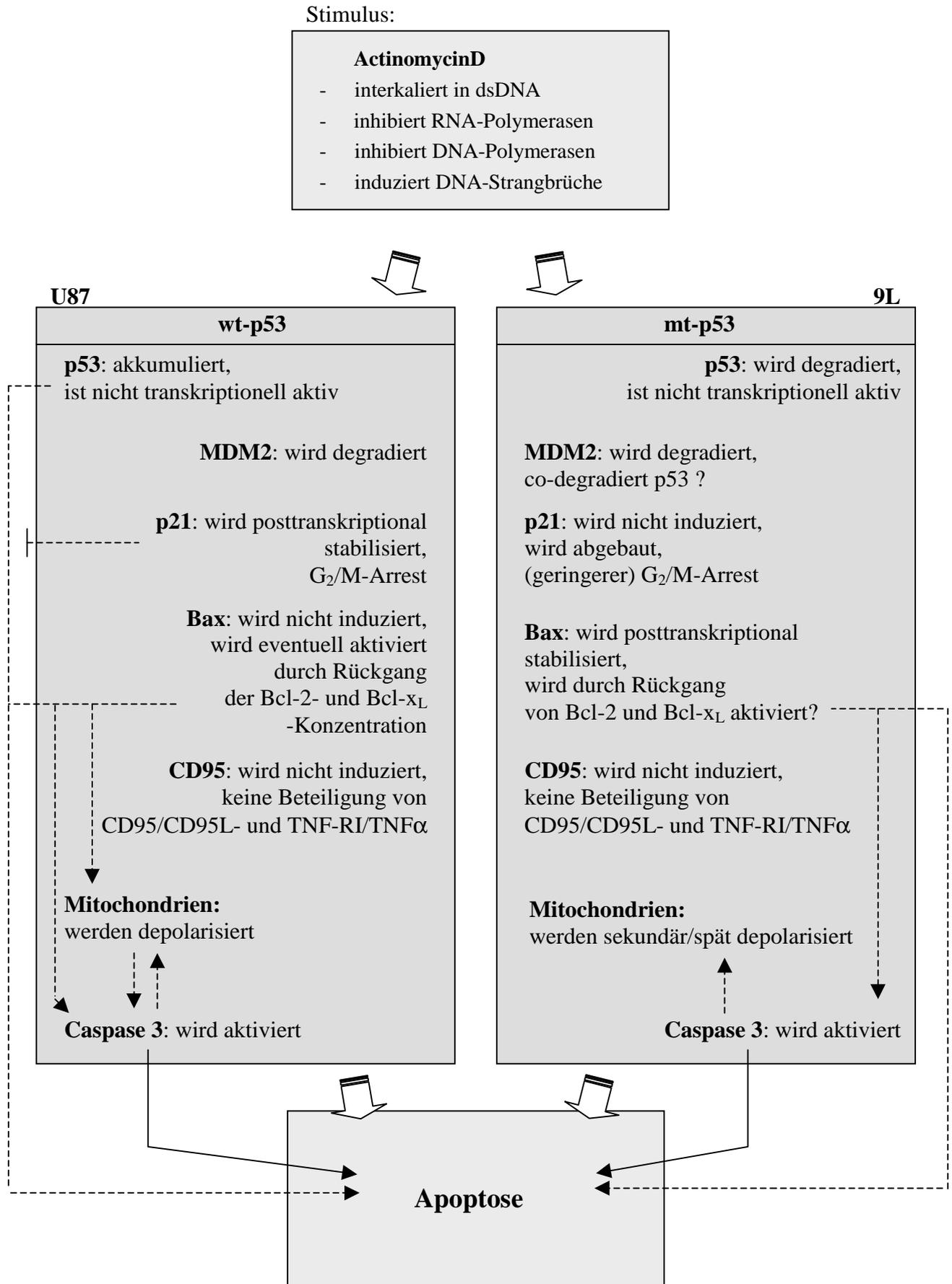
Deutung der zellulären Vorgänge im wt-p53-Modell U87

Der Stimulus *E.coli-cd/5-FC* führt in den transduzierten Zielzellen zu DNA-Strangbrüchen, einem klassischen Induktor von wt-p53 sowie zur Störung der RNA-Synthese, einem eventuell noch früheren Signal zur Aktivierung von p53. Wt-p53 wird tatsächlich früh induziert, und die Erhöhung der Konzentration seiner Zielgene p21 und MDM2 läßt vermuten, daß wt-p53 hier auch transkriptionell aktiv ist. Allerdings wird diese wt-p53-Reaktion im weiteren Verlauf der Behandlung durch den vermutlich MDM2-vermittelten wt-p53-Abbau beendet. Auch die transkriptionsunabhängigen wt-p53-Funktionen werden dadurch unterbunden. Ob dieses Zeitfenster der wt-p53-Aktivität und das Ausmaß der Aktivierung ausreicht, um wt-p53 als ein Hauptelement der Apoptose-Induktion in diesem Modell zu bezeichnen, ist unklar. Der nur schwache G₁-Arrest der Zellen, der wahrscheinlich p21-vermittelt ist, spricht nicht sehr stark hierfür. Auf jeden Fall nimmt der G₁-Arrest parallel zur wt-p53-Konzentrationsabnahme ebenfalls ab, und die Zellen treten vermehrt in die Apoptose ein. Obwohl Bax nicht direkt durch seinen Transkriptionsaktivator wt-p53 induziert wird, wird die Relation proapoptotischer zu antiapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder durch den Rückgang der Bcl-2-Konzentration zu Gunsten der Apoptoseauslösung verschoben. Dies könnte für die frühe Depolarisierung der Mitochondrien verantwortlich sein. Caspase 3-Aktivierung findet statt (eventuell durch Mitochondrien induziert zumindest aber wahrscheinlich verstärkt), und die Effektorphase der Apoptose wird eingeleitet.

Deutung der zellulären Vorgänge im mt-p53-Modell 9L

Ebenso wie im wt-p53-Modell akkumuliert auch mt-p53 nach *E.coli-cd/5-FC*-Gentherapie. Mt-p53 ist aufgrund der Mutation nicht transkriptionell aktiv, wie auch die ausbleibende Induktion der untersuchten p53-Zielgene nahelegt. Inwieweit diese Mutation auch die transkriptionsunabhängigen Funktionen von p53 beeinträchtigt, ist nicht bekannt. Diese könnten einen Einfluß auf die Apoptoseauslösung haben. Mt-p53 scheint zunächst gegenüber MDM2-vermitteltem Abbau stabilisiert zu werden oder so stark zu akkumulieren, daß ein teilweiser Abbau von p53/MDM2 nicht sichtbar wird. MDM2 degradiert Therapie-induziert ab Tag 1, inhibiert dadurch auch eventuell verbliebene Restfunktionen von mt-p53 nicht mehr. Das ohnehin gering exprimierte p21 wird nach Therapie nicht mehr detektiert, ein G₁-Arrest findet in diesem mt-p53-Modell im Gegensatz zum wt-p53-Modell nicht statt. Die untersuchten Bcl-2-Familienmitglieder scheinen in diesem System zumindest keine durch Konzentrationsveränderungen herbeigeführten pro- oder anti-apoptotischen Funktionen auszuüben. Andere Einflüsse sowie Beteiligung weiterer Bcl-2-Mitglieder sind jedoch nicht auszuschließen. Mitochondrien werden hier ebenso wie bei den übrigen Behandlungen im mt-p53-Modell erst sehr spät depolarisiert und scheinen daher an der Induktion der Apoptose nicht wesentlich beteiligt zu sein. Auch in diesem System führen die zellulären Reaktionen auf die Therapie zur Induktion von Caspase 3, die an der Effektorphase der Apoptose beteiligt ist.

10. Modelle zur Signaltransduktion in wt-p53 U87- und mt-p53 9L-Zellen nach ActinomycinD-Behandlung



Deutung der zellulären Vorgänge im wt-p53-Modell U87:

Actinomycin inhibiert in der eingesetzten Konzentration von 1-2 µg/ml die Transkription. Daher sind hier trotz Akkumulation des Tumorsuppressors wt-p53, dessen transkriptionsaktivierende Eigenschaften an der Auslösung des apoptotischen Zelltodes nicht beteiligt. Wt-p53 kann allerdings auch transkriptions-unabhängig Apoptose auslösen, die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt. MDM2 wird degradiert. Dies verhindert zum einen den MDM2-vermittelten Abbau von wt-p53, zum anderen wird wt-p53 nicht mehr durch Komplexierung mit MDM2 beeinflusst. p21 akkumuliert, aufgrund der RNA-Synthese-Inhibition muß dies am ehesten post-transkriptional und wt-p53-unabhängig erfolgen. Es wird ein G₂/M-Arrest des Zellzyklus festgestellt, an dem p21 zumindest beteiligt sein könnte. Da p21 eher Apoptose-supprimierende und Wachstumsarrest induzierende Wirkung hat, ist eine Beteiligung an der Apoptose-Signalkaskade hier unwahrscheinlich. Die Zellen scheinen aus dem Wachstumsarrest eher durch ein dominantes Signal zur Apoptose gebracht zu werden. Dies könnte die Verschiebung des Verhältnisses pro-apoptotischer zu anti-apoptotischen Faktoren zu Gunsten der Apoptoseauslösungen sein. Denn obwohl das pro-apoptotische Bax in seiner Konzentration nicht verändert wird, geht die Konzentration der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-x_L zurück. Dieses Ungleichgewicht kann weiterreichende Folgen haben. Durch den Wegfall der negativen Regulation der Caspase 3 durch Bcl-2 und Bcl-x_L kann diese indirekt aktiviert werden. Zusätzlich wird Caspase 3 vermutlich durch die über Bax herbeigeführte Depolarisation der Mitochondrien mit nachfolgender Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren induziert. Caspase 3-Aktivierung stellt hier vermutlich einen Hauptschritt auf dem Weg zum apoptotischen Zelltod unter ActoD-Behandlung dar.

Deutung der zellulären Vorgänge im mt-p53-Modell 9L

Zusätzlich zu der durch Actinomycin D-Behandlung vermittelten Inhibierung der transkriptionsaktivierenden Apoptosefunktionen von p53, werden auch die transkriptionsunabhängigen durch den Abbau von mt-p53 vermutlich keine wesentliche, aktive Rolle in der Apoptose-Signalkaskade spielen. Wie im wt-p53-Modell wird auch hier MDM2 degradiert. MDM2 könnte dabei die Co-Degradation von mt-p53, das im wt-p53-Modell geschützt zu sein scheint, bedingen. Im Gegensatz zum wt-p53-Modell wird hier p21 nicht posttranskriptional stabilisiert, sondern degradiert. Die Inaktivierung des „Apoptose-Suppressors“ p21 könnte daher indirekt zur Apoptoseauslösung beitragen. Auffallend in diesem System ist die Verschiebung der Bcl-2, Bcl-x_L/Bax-Relation zugunsten des proapoptotischen Faktors Bax: Das gering exprimierte Bax wird posttranslational stabilisiert und akkumuliert deutlich, gleichzeitig läßt sowohl die Konzentration von Bcl-2 als auch von Bcl-x_L nach. Trotzdem scheinen die Mitochondrien, die ein primäres Ziel der Bcl-2-Familienmitglieder in der Apoptoseinduktion zu sein scheinen, hier erst spät beeinflusst, da eine Depolarisation jeweils erst kurz vor dem Eintritt des Zelltodes zu beobachten ist. Caspase 3 wird über einen noch nicht geklärten Mechanismus aktiviert und könnte die späte Depolarisation der Mitochondrien bewirken und die Effektorphase der Apoptose einleiten.

V. Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit wurde durchgeführt, um die Signaltransduktionswege aufzuklären, die zum Zelltod experimenteller Gliome nach gentherapeutischer Behandlung führen. Die Mehrheit der klassischen Chemotherapien, wie z.B. Actinomycin D-Behandlung, induzieren apoptotischen Zelltod. Dies ist für die Suizid-gentherapie als Form der intrazellulären Chemotherapie noch kontrovers diskutiert.

Im ersten Teil des hier vorgelegten Berichts wurde die Ausprägung klassischer apoptotischer Merkmale in Gliomzelllinien nach gentherapeutischer Behandlung demonstriert: In den untersuchten Zellmodellen U87 (humane Gliomzelllinie) und 9L (Ratten-Gliosarkomzelllinie) lösten sowohl HSV-*tk*/GCV- als auch E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie Apoptose-typische morphologische Veränderungen aus (Abrundung der Zelle, Membran-Blebbing, Fragmentierung des Nukleus und Auflösung der Zelle in Vesikel). Mittels durchflußzytometrischer Methoden konnten typische Apoptosemarker wie die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, ein Absinken des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie der Verlust von DNA gezeigt werden. Enzymatische Untersuchungen demonstrierten eine Aktivierung der Caspase 3, kennzeichnend für die spätere Effektorphase der Apoptose, in den gentherapeutisch behandelten Zellen. Die Ausprägung einer typischen Leiter-artigen DNA-Fragmentierung sowie positive TUNEL-Tests zeigten spezifische, nur während der Apoptose in dieser Form auftretende DNA-Degradierung. Nekrotischer Zelltod wurde nicht beobachtet. Diese klassischen Apoptosemerkmale konnten hier auch bei nicht transduzierten Zellen, die mit transduzierten Zellen kokultiviert wurden, den sogenannten „Bystander“-Zellen, sowohl während HSV-*tk*/GCV- als auch unter E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie nachgewiesen werden. Caspase 3 wurde auch in Bystander-Zellen nachweislich aktiviert und scheint daher auch in diesen Zellen Teil der Effektor-Phase der Apoptose zu sein.

Durchflußzytometrische Zellzyklusuntersuchungen zeigten, daß HSV-*tk*/GCV apoptotischen Zelltod in der DNA-Synthese-Phase des Zellzyklus verursacht. Dies traf für *tk*-transduzierte und nicht transduzierte Bystander-Zellen gleichermaßen zu. E.coli-*cd*/5-FC induzierte nach einem kurzzeitigen Arrest eines Teils der Zellen in der G₁-Phase ebenfalls apoptotischen Zelltod im wesentlichen in der S-Phase des Zellzyklus. Auch hier zeigten *cd*-transduzierte und Bystander-Zellen ähnliche Ergebnisse.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Beteiligung bekannter Signaltransduktionswege überprüft und die Proteinexpression spezifischer Gene, die mit der Zelltodkontrolle assoziiert werden, im Verlauf der Therapie verfolgt.

Zu den zur Zeit am besten verstandenen Apoptosesignalwegen gehören die über die Todesrezeptoren CD95 und TNF-RI vermittelten. Eine Expression der Rezeptoren CD95 und TNF-RI auf der Zelloberfläche von 9L- bzw. U87-Zellen konnte hier jedoch nicht detektiert werden. Die Expression dieser Rezeptoren wurde auch durch Gentherapie oder Behandlung mit Actinomycin D nicht induziert, weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene. Behandlung der Zellen mit Apoptose-auslösenden anti-CD95-Antikörpern oder TNF α zeigten keine zytotoxische Reaktion. Daher scheinen in den hier untersuchten Modellen die Signaltransduktionswege über Fas- und TNF-RI-Rezeptor keine essentielle Rolle bei der Apoptoseauslösung durch Suizidgentherapie zu spielen. Dies schließt die Möglichkeit nicht aus, daß andere Apoptose-vermittelnde Todesrezeptor/Ligand-Systeme, wie z.B. TRAIL/DR4 oder TRAIL/DR5, hier eine Rolle spielen könnten oder daß CD95/TNF-RI in anderen Zellmodellen zusätzlich verstärkend wirksam sein könnten. Wesentliche Voraussetzung für die Apoptose-Auslösung durch HSV-*tk*/GCV oder E.coli-*cd*/5-FC sind sie jedoch nicht. Das Tumorsuppressorprotein p53 übt in der Zelle wichtige Kontrollfunktionen aus. Nur wenige DNA-Strangbrüche genügen, um eine im wesentlichen posttranslationale Akkumulation des p53-Proteins zu induzieren, welches dann auf noch nicht genau geklärte Weise, einen Wachstumsstopp zur DNA-Reparatur oder - wenn der Schaden zu groß ist - Apoptose einleitet. p53 ist in 50% der menschlichen Tumoren und auch in Gliomen mutiert. Diese Mutationen sind überwiegend Punktmutationen der DNA-bindenden Region. Zur Untersuchung des Einflusses von p53 auf die gentherapeutische Zelltodinduktion wurde daher neben der wt-p53-exprimierenden U87-Zelllinie mit der 9L-Zelllinie auch ein Tumormodell gewählt, das

sich dieser Situation realistisch nähert: 9L-Zellen weisen eine p53-Punktmutation in der DNA-bindenden Domäne auf, das zweite p53-Allel ist deletiert. Die zelluläre Konzentration des p53-Proteins wurde wie hier mittels Immunoblotanalyse gezeigt werden konnte sowohl in den wt-p53-exprimierenden U87-Zellen als auch in den mt-p53-exprimierenden 9L-Zellen durch HSV-*tk*/GCV- und E.coli-*cd/5*-FC-Gentherapie erhöht. Unter Gentherapie werden demnach zunächst Mechanismen aktiviert, die zu einer p53-Induktion durch Protein-Stabilisierung führen. Diese p53-Akkumulation wird durch die p53-Punktmutation in 9L-Zellen nicht inhibiert. Jedoch zeigt sich, daß zumindest die durch p53 vermittelte Signaltransduktion über Transkriptionsaktivierung bei 9L-Zellen ins Leere läuft: Dies konnte durch Immunoblot-Untersuchungen einer Reihe von p53-Zielgenen demonstriert werden. Trotz p53-Akkumulation zeigte sich keine Induktion der p53-Zielgene MDM2, p21 oder Bax in 9L-Zellen nach Gentherapie.

In den wt-p53-exprimierenden U87-Zellen wurden von den hier untersuchten p53-Zielgenen unter HSV-*tk*/GCV-Therapie nur *mdm2* und unter E.coli-*cd/5*-FC-Therapie *mdm2* und *p21* induziert. Im E.coli-*cd/5*-FC-System wurde nach Induktion des p53-degradierenden Proteins MDM2 eine rasche Verringerung der p53-Konzentration beobachtet, so daß hier p53 nur ein kurzes aktives Zeitfenster bleibt. Unter HSV-*tk*/GCV-Therapie akkumulierte p53 in U87-Zellen im Vergleich zu E.coli-*cd/5*-FC erst einen Tag später und blieb akkumuliert. Die ausbleibende p53-Degradierung beruht vermutlich auf der Bildung eines MDM2-Fragments durch aktivierte Caspasen, das p53 zwar noch binden kann, jedoch - anders als das vollständige MDM2-Protein - den p53-Abbau über den Ubiquitin-Pathway nicht mehr einleiten kann. Die transkriptionsaktivierende Eigenschaft von p53 wird durch das MDM2-Fragment aber ebenso inhibiert wie durch das vollständige MDM2-Protein. Daher bleibt hier auch bei HSV-*tk*/GCV für die Transkriptions-abhängige p53-Aktivität nur ein kurzes Zeitfenster. Es scheint jedoch mehr und mehr wahrscheinlich, daß p53 auch unabhängig von seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt. Hier konnte gezeigt werden, daß Veränderungen des mitochondrialen Transmembranpotentials nach Gen- oder Chemotherapie in wt-p53-U87-Zellen früher auftraten und dauerhafter waren als in den mt-p53-9L-Zellen. Marchenko et al. (2000) und Sansome et al. (2001) berichteten von einer p53-Translokation aus dem Nukleus heraus zu den Mitochondrien nach Induktion von Apoptose. Daher könnte hier zwischen dem p53-Status der Zelle und der Ausprägung apoptotischer Veränderungen der Mitochondrien ein kausaler Zusammenhang bestehen. Mitochondrien können apoptotische Signale über verschiedene Signaltransduktionswege effektiv amplifizieren. Dies könnte zumindest teilweise die höhere Sensitivität der untersuchten wt-p53-Zellen im Vergleich zu den mt-p53-Zellen gegenüber Chemotherapeutika-Behandlung erklären, da in Zellen mit mutiertem p53 diese Amplifizierung des apoptotischen Signals ausbleibt. Das solche Sensitivitätsunterschiede zwischen U87- und 9L-Zellen nach Gentherapie nicht zu beobachten sind könnte durch die unterschiedliche, nicht genau quantifizierbare Konzentration des gebildeten toxischen Metaboliten innerhalb der Zellen begründet sein.

Eine essentielle Voraussetzung für HSV-*tk*/GCV- oder E.coli-*cd/5*-FC-Gentherapie ist jedoch keine der beschriebenen p53-Funktionen wie auch Untersuchungen anderer Autoren in Systemen ohne p53 (p53-Knock-out- und p53-Null-Modelle) demonstrieren (Wallace et al. 1996, Ofir et al. 1999, Xie et al. 1999). Das p53-Zielgen Bax ist als wichtiger Apoptose-Induktor bekannt. In der hier vorgelegten Arbeit konnte jedoch in keiner der untersuchten Zelllinien unter Gentherapie eine Akkumulation des Bax-Proteins nachgewiesen werden. Ausbleibende Bax-Akkumulation wird als ein möglicher Resistenzmechanismus von Tumoren z.B. gegen Radiotherapie diskutiert. Dies ist auch bei U87-Zellen beobachtet worden (Shuh et al. 1998) und könnte daher auch das hier demonstrierte Ausbleiben der Bax-Induktion nach Chemo- oder Gentherapie erklären. Dies schließt nicht aus, daß Bax in anderen wt-p53-Zelllinien eine wichtige Funktion in der Apoptose-Induktion nach Gentherapie spielen könnte.

Ein weiterer, allerdings posttranslatonaler Mechanismus der Bax-Aktivierung ist die Freisetzung von Bax aus inaktiven Bax/Bcl-2- oder Bax/Bcl-x_L-Heterodimeren. Hier konnte ein Rückgang der zellulären Bcl-2-Konzentration nach Behandlung der U87-Zellen mit ActinomycinD oder HSV-*tk*/GCV bzw. E.coli-*cd/5*-

FC gezeigt werden. Dieser Konzentrationsrückgang des antiapoptotischen Bcl-2 könnte zur Freisetzung des proapoptotischen Bax aus den Heterodimeren und zur folgenden Apoptose-Induktion führen. Außerdem sensitiviert der Rückgang der Bcl-2-Konzentration auch unabhängig von Bax gegenüber apoptotischen Stimuli. Die Bcl-x_L-Konzentration änderte sich in der wt-p53-Zelllinie bei keiner der angewendeten Therapien. In der mt-p53-Zelllinie 9L war nach HSV-*tk*/GCV- oder E.coli-*cd*/5-FC-Gentherapie keinerlei Konzentrationsveränderung von Bax, Bcl-2 oder Bcl-x_L festzustellen, nur im HSV-*tk*/GCV-System wurde Bcl-x_L anscheinend posttranslational durch Phosphorylierung inaktiviert, was ebenfalls zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von pro- und anti-apoptotischen Signalen in Richtung Apoptose führen könnte. Die in der vorgelegten Arbeit begonnene Aufklärung der Signaltransduktionswege, die zum Gentherapie-vermittelten Zelltod führen, ist für die Identifizierung von Resistenzmechanismen von wesentlicher Bedeutung. Im Zusammenhang mit konventioneller Chemotherapie ist bekannt, daß Resistenzen gegenüber der Therapie häufig auf der Inaktivierung apoptotischer Signaltransduktionswege beruhen. Eine genaue Kenntnis der ablaufenden zellulären Prozesse könnte daher zur Entwicklung gezielterer, effektiverer Therapien und zur Verringerung von Resistenzen gleichermaßen führen. Insbesondere auch die Kenntnis des jeweiligen Zellzyklusstadiums in denen Zellen besonders sensitiv gegenüber der Therapie sind, könnte neue Kombinationstherapien mit zyklusspezifischen Chemotherapeutika sinnvoll erscheinen lassen. Desweiteren könnte ein besseres Verständnis der Ursachen der Bystander Effekte in Zukunft eine gezieltere Anwendung und vielleicht sogar Beeinflussung dieses Effektes zu therapeutischen Zwecken eröffnen.

Literatur:

- Abdella, B.R., Fisher, J. 1985. A chemical perspective on the anthracycline antitumor antibiotics. *Environ. Health Perspect.* 64:4-18.
- Adachi, Y., Taketani, S., Oyaizu, H., Ikebukuro, K., Tokunaga, R., Ikehara, S. 1999. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma induced by 5-FU and/or IFN-gamma through caspase 3 and caspase 8. *Int. J. Oncol.* 15:1191-1196.
- Aghi, M., Kramm, C.M., Chou, T.-C., Breakefield, X.O., Chiocca, E.A. 1998. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *Journal of the National Cancer Institute.* 90:370-380.
- Akashi, M., Osawa, Y., Koeffler, H.P., Hachiya, M. 1999. p21WAF1 expression by an activator of protein kinase C is regulated mainly at the post-transcriptional level in cells lacking p53: important role of RNA stabilization. *Biochem. J.* 337: 607-616.
- Alarcon, R., Koumenis, C., Geyer, R.K., Maki, C.G., Giaccia, A.J. 1999. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Research.* 59:6046-6051.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 74:5350-5354.
- Appella, E., Anderson, C.W. 2000. Signaling to p53: Breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol. (Paris).* 48:227-245.
- Arango, D., Corner, G.A., Wadler, S., Catalano, P.J., Augenlicht, L.H. 2001. c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo. *Cancer Research.* 61:4910-4905.
- Arends, M.J., Wyllie, A.H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32:223-254.
- Arriola, E.L., Lopez, E.R., Chresta, C.M. 1999. Differential regulation of p21waf-1/cip-1 and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop. *Oncogene.* 18:1081-1091.
- Asai, A., Miyagi, Y., Sugiyama, A., Gamanuma, M., Hong, S.I., Takamoto, S., Nomura, K., Matsutani, M., Takakura, K., Kuchino, Y. 1994. Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. *J. Neuro-Oncol.* 19:259-268.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H. 1999. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology.* 19:1751-1758.
- Ashcroft, M., Taya, Y., Vousden, K.H. 2000. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Molecular and Cellular Biology.* 20:3224-3233.
- Attardi, L.D., Lowe, S.W., Brugarolas, J., Jacks, T. 1996. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *The EMBO Journal.* 15:3702-3712.
- Austin, E.A., Huber, B.E. 1993. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of Escherichia coli cytosine deaminase. *Mol. Pharmacol.* 43:380-387.
- Backus, H.H., Pinedo, H.M., Wouters, D., Kuiper, C.M., Jansen, G., van Groeningen, C.J., Peters, G.J. 2001. Differences in the induction of DNA damage, cell cycle arrest, and cell death by 5-fluorouracil and antifolates. *Oncol. Res.* 12:231-239.
- Badie, B., Goh, C.S., Klaver, J., Herweijer, H., Boothman, D.A. 1999. Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Ther.* 6:155-162.
- Bae, M.A., Pie, J.E., Song, B.J. 2001. Acetaminophen induces apoptosis of C6 glioma cells by activating the c-Jun NH(2)-terminal protein kinase-related cell death pathway. *Mol. Pharmacol.* 60:847-856.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. 1993. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12:461-468.
- Barba, D., Hardin, J., Sadelain, M., Gage F. 1994. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4348-4352.

- Bates, S., Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. 1998. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21 Waf1/Cip1 expression. *Oncogene*. 17:1691-1703.
- Beck, J.D., Winkler, K., Niethammer, D., Brandis, M., Hertzberg, H., Hardt, K. von der, Greil, J., Überall, M.A., Rossi, R., Lamprecht-Dinnesen, A., Brämsswig, J., Kaatsch, P., Michaelis, J., Meier, W., Hausdorf, M., Bielack, S., Dörr, H.G. 1995. Die Nachsorge der von einer Krebserkrankung geheilten Kinder und jungen Erwachsenen. Erste Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Spätfolgen. *Klin. Pädiatr.* 207:186-192.
- Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Meyer, E., Uckert, W., Debatin, K.-L. 1999. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:8699-8704.
- Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Uckert, W., Debatin, K.M. 2000. Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Research*. 60:3212-3217.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.-W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*. 282:290-293.
- Bentires-Alj, M., Hellin, A.-C., Lechanteur, C., Princen, F., Lopez, M., Fillet, G., Gielen, J., Merville, M.-P., Bours, V. 2000. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Therapy*. 7:20-26.
- Berrozpe, G., Schaeffer, J., Peinado, M.A., Real, F.X., Perucho, M. 1994. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*. 58:185-191.
- Bi, W.L., Parysek, L.M., Warnick, R., Stambrook, P.J. 1993. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV-tk retroviral gene therapy. *Human Gene Therapy*. 4:725-731.
- Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y., Ohgaki, H. 1997. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:180-185.
- Blattner, C., Sparks, A., Lane, D. 1999. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Molecular and Cellular Biology*. 19:3704-3713.
- Brown, J.M., Wouters, B.G. 1999. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* 59:1391-1399.
- Bryson, G.J., Harmon, B.V., Collins, R.J. 1994. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment. *Immunol. Cell. Biol.* 72:35-41.
- Bueso-Ramos, C.E., Yang, Y., de Leon, E., McCown, P., Stass, S.A., Albitar, M. 1993. The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood*. 82:2617-2623.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldmann, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1999. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *The Journal of Clinical Investigation*. 104:263-269.
- Burnette, W.N. 1981. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112:195-203.
- Buschmann, T., Adler, V., Matusевич, E., Fuchs, S.Y., Ronai, Z. 2000. p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-jun NH₂-terminal kinase, p14^{ARF}, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* 60:896-900.
- Caelles, C., Helmberg, A., Karin, M. 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 370:220-223.
- Chai, F., Evdokiou, A., Young, G.P., Zalewski, P.D. 2000. Involvement of p21Waf/Cip and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis*. 21:7-14.
- Chen, C.-Y., Oliner, J.D., Zhan, Q., Fornace Jr., A.J., Vogelstein, B., Kastan, M.B. 1994. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 91:2684-2688.

- Chen, C.-Y., Chang, Y.-N., Ryan, P., Linscott, M., McGarrity, G.J., Chiang Y.L. 1995a. Effect of herpes simplex virus thymidine kinase expression levels on ganciclovir-mediated cytotoxicity and the "bystander effect". *Hum. Gene Ther.* 6:1467-1476.
- Chen, J., Wu, X., Levine, A.J. 1996. Mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Molecular and Cellular Biology.* 16:2445-2452.
- Chen, L., Marechal, V., Moreau, J., Levine, A.J., Chen, J. 1997. Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* 36:22966-22973.
- Chen, P., Iavarone, A., Fick, J., Edwards, M., Prados, M., Israel, M.A. 1995b. Constitutional p53 mutations associated with brain tumors in young adults. *Cancer Genet. Cytogenet.* 82:106-115.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* 265:346-355.
- Ciesielski, M.J., Fenstermaker, R.A. 1999. Synergistic cytotoxicity, apoptosis and protein-linked DNA breakage by etoposide and camptothecin in human U87 glioma cells: dependence on tyrosine phosphorylation. *Journal of Neurooncology.* 41:223-234.
- Clarke, P.G., Clarke, S. 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol. Berl.* 193:81-99.
- Cline, M.J. 1996. Overview: the nature of malignancy. In *Apoptosis and cell cycle control in cancer*. N. Shaun, Thomas, B., editor. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford. 131-146.
- Cohen, M.E., Duffner, P.K. 1994. Brain tumors in children. Principles in diagnosis and treatment. Raven Press, New York.
- Colombo, B.M., Benedetti, S., Ottolenghi, S., Mora, M., Pollo, B., Poli, G., Finocchiaro, G. 1995. The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. *Hum. Gene Ther.* 6:763-772.
- Cool, V., Pirotte, B., Gerard, C., Dargent, J.L., Baudson, N., Levivier, M., Goldman, S., Hildebrand, J., Brotchi, J., Velu, T. 1996. Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9L gliosarcoma. *Human Gene Therapy.* 7:627-635.
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C. 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 197:40-45.
- Coulter, W.H. 1956. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl. Electronics Conf.* 12:1034.
- Cox, L.S., Lane, D.P. 1995. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays.* 17:501-508.
- Craperi, D., Vicat, J.-M., Nissou, M.-F., Mathieu, J., Baudier, J., Benabid, A.L., Verna, J.-M. 1999. Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line. *Hum. Gene Ther.* 10:679-688.
- Crystal, R.G., Hirschowitz, E., Lieberman, M., Daly, J., Kazam, E., Henschke, C., Yankelevitz, D., Kemeny, N., Silverstein, R., Ohwada, A., Russi, T., Mastrangeli, A., Sanders, A., Cooke, J., Harvey, B.G. 1997. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E.coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Human Gene Therapy.* 8:985-1001.
- Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H., Blaese, R.M. 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 256:1550-1552.
- Danielsen, S., Kilstrup, M., Barilla, K., Jochimsen, B., Neuhard, J. 1992. Characterization of the Escherichia coli codBA operon encoding cytosine permease and cytosine deaminase. *Mol. Microbiol.* 6:1335-1344.
- Danoff, B.F., Cowchock, F.S., Marquette, C., Mulgrew, L., Kramer, S. 1982. Assessment of the long-term effects of primary radiation therapy for brain tumors in children. *Cancer.* 49:1580-1586.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Staiano-Coico, L., Kapuscinski, J., Melamed, M.R. 1982. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Research.* 42:799-806.

- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 13:795-808.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. 27:1-20.
- De Toledo, S.M., Azzam, E.I., Dahlberg, W.K., Gooding, T.B., Little, J.B. 2000. ATM complexes with HDM2 and promotes its rapid phosphorylation in a p53-independent manner in normal and tumor human cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*. 6185-6193:19.
- DeCrevoisier, R., Pierga, J.Y., Dendale, R., Feuvret, L., Noel, G., Simon, J.M., Mazon, J.J. 1996. Radiotherapy of glioblastoma. *Cancer Radiother.* 1:194-207.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge S.J., Leder, P. 1995. Mice lacking the p21^{Cip1}/WAF1 undergo normal development, but are defective in G₁ checkpoint control. *Cell*. 82:675-684.
- Donahue, B. 1992. Short- and long-term complications of radiation therapy for pediatric brain tumors. *Pediatr. Neurosurg.* 18:207-217.
- Donato, N.J., Perez, M. 1998. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 273:5067-5072.
- Duffner, P.K., Cohen, M.E., Voorhess, M.L., MacGillivray, M.H., Brecher, M.L., Panahon, A., Gilani, B.B. 1985. Long-term effects of cranial irradiation on endocrine function in children with brain tumors. A prospective study. *Cancer*. 56:2189-2193.
- Eichhorst, S.T., Muerkoster, S., Weigand, M.A., Krammer, P.H. 2001. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system. *Cancer Research*. 61:243-248.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75:817-825.
- Elenbaas, B., Dobbstein, M., Roth, J., Shenk, T., Levine, A.J. 1996. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol. Med.* 2:439-451.
- Elion, G.B. 1983. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemother.* 12:9-17.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., Horvitz, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
- Elshami, A.A., Saavedra, A., Zhang, H., Kucharczuk, J.C., Spray, D.C., Fishman, G.I., Amin, K.M., Kaiser, L.R., Albelda, S.M. 1996. Gap junctions play a role in the "bystander effect" of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Therapy*. 3:85-92.
- Elstein, K.H., Zucker, R.M. 1994. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Experimental Cell Research*. 211:322-331.
- Elstein, K.H., Thomas, D.J., Zucker, R.M. 1995. Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis. *Cytometry*. 21:170-176.
- Engvall, E., Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:871.
- Erhardt, P., Tomaselli, K.J., Cooper, G.M. 1997. Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:15049-15052.
- Ezzedine, Z.D., Martuza, R.L., Platika, D., Short, M.P., Malick, A., Choi, B., Breakefield, X.O. 1991. Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene. *New Biol.* 3:608-614.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.E., Campbell, P.A., Henson, P.M. 1992a. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *The Journal of Immunology*. 149:4029-4035.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. 1992b. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*. 148:2207-2216.

- Fan, M., Goodwin, M., Vu, T., Brantley-Finley, C., Gaarde, W.A., Chambers, T.C. 2000. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-xL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 275:29980-29985.
- Faulds, D., Heel, R.C. 1990. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs*. 39:597-638.
- Fels, C., Schafer, C., Huppe, B., Bahn, H., Heidecke, V., Kramm, C.M. 2000. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. *Journal of Neurooncology*. 48:207-216.
- Fick, J., Barker, F.G.II., Dazin, P., Westphale, E.M., Beyer, E.C., Israel, M.A. 1995. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 92:11071-11075.
- Frankel, R.H., Bayona, W., Koslow, M., Newcomb, E.W. 1992. p53 mutations in human malignant gliomas: comparison of loss of heterozygosity with mutation frequency. *Cancer Research*. 52:1427-1433.
- Freedman, D.A., Levine, A.J. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55:96-107.
- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L., Abraham, G.N. 1993. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Research*. 53:5274-5283.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H., Debatin, K.-M. 1996. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Medicine*. 2:574-577.
- Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G. 1993. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*. 8:307-318.
- Fuchs, E.J., McKenna, K.A., Bedi, A. 1997. p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta. *Cancer Research*. 57:2550-2554.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Debatin, K.M. 1997. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Research*. 57:3823-3829.
- Fults, D., Brockmeyer, D., Tullous, M.W., Pedone, C.A., Cawthon, R.M. 1992. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Research*. 52:674-679.
- Gervais, J.L.M., Seth, P., Zhang, H. 1998. Cleavage of CDK inhibitor p21Cip1/Waf1 by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 273:19207-19212.
- Giaccia, A.J., Kastan, M.B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development*. 12:2973-2983.
- Glaser, T., Wagenknecht, B., Groscurth, P., Krammer, P.H., Weller, M. 1999. Death ligand/receptor-independent caspase activation mediates drug-induced cytotoxic cell death in human malignant glioma cells. *Oncogene*. 18:5044-5053.
- Glaser, T., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., Weller, M. 2001. Death receptor-independent cytochrome c release and caspase activation mediate thymidine kinase plus ganciclovir-mediated cytotoxicity in LN-18 and LN-229 human malignant glioma cells. *Gene Therapy*. 8:469-476.
- Gnekow, A.K., Kaatsch, P., Kortmann, R., Wiestler, O.D. 2000. HIT-LGG: Effektivität von Carboplatin-Vincristin bei progredienten Gliomen niedrigen Malignitätsgrades im Kindesalter-Zwischenbericht. *Klin. Pädiat*. 212:177-184.
- Gorczyca, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R.J., Gong, J., Darzynkiewicz, Z. 1992. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal of Oncology*. 1:639-648.
- Green, D.R., Reed, J.C. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science*. 281:1309-1312.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. 1994. Mutations in the p53 tumour suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. 54:4855-4878.
- Grem, J.L. 1996. 5-Fluoropyrimidines. In *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practise*. B.A. Chabner, Longo, D.L., editor. Lippincott, Philadelphia. 149-212.
- Grigsby, P.W., Thomas, P.R., Schwartz, H.G., Fineberg, B. 1988. Irradiation of primary thalamic and brainstem tumours in a pediatric population: a 33-year experience. *Cancer*. 60:2901-2906.

- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. 1998. Enforced dimerization of bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17:3878-3885.
- Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O. 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature.* 366:707-710.
- Guchelaar, H.J., Vermes, I., Koopmans, R.P., Reutelingsperger, C.P., Haanen, C. 1998. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42:77-83.
- Halloran, P.J., Fenton, R.G. 1998. Irreversible G2-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues. *Cancer Research.* 58:3855-3865.
- Hamel, W., Magnelli, L., Chiarugi, V.P., Israel, M.A. 1996. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.* 56:2697-2702.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 75:805-816.
- Harris, J.D., Gutierrez, A.A., Hurst, H.C., Sikora, K., Lemoine, N.R. 1994. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene Therapy.* 1:170-175.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H., Oren, M. 1995. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes & Development.* 9:2170-2183.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. 1997a. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387:296-299.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Kazaz, A., Vousden, K., Oren, M. 1997b. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia.* 11:337-339.
- He, J., Reifengerger, G., Liu, L., Collins, V.P., James, C.D. 1994. Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2. *Genes Chromosomes Cancer.* 11:91-96.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407:770-776.
- Hernandez-Boussard, T., Rodriguez-Tome, P., Montesano, R., Hainaut, P. 1999. IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. *Hum. Mutat.* 14:1-8.
- Hoganson, D.K., Batra, R.K., Olsen, J.C., Boucher, R.C. 1996. Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Research.* 56:1315-1323.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science.* 253:49-53.
- Honda, R., Tanaka, H., Yasuda, H. 1997. Oncoprotein Mdm2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters.* 420:25-27.
- Honda, R., Yasuda, H. 1999. Association of p19ARF with MDM2 inhibits ubiquitin ligase activity of MDM2 for tumor-suppressor p53. *The EMBO Journal.* 18:22-27.
- Honig, M.G., Hume, R.I. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol.* 103:171-187.
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 94:3668-3672.
- Hsu, Y.T., Youle, R.J. 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *The Journal of Biological Chemistry.* 273:10777-10783.
- Huang, R.-P., Fan, Y., Hossain, M.Z., Peng, A., Zeng, Z.-L., Boynton, A.L. 1998. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* 58:5089-5096.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S.S., Knick, V.C., Tibbels, S., Richards, C.A. 1993. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Research.* 53:4619-4626.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T., Good, S.S. 1994. Metabolism of 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:8302-8306.

- Ichikawa, T., Tamiya, T., Adachi, Y., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Yoshida, Y., Hamada, H., Ohmoto, T. 2000. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Therapy*. 7:74-82.
- Igata, E., Inoue, T., Ohtani-Fujita, N., Sowa, Y., Tsujimoto, Y., Sakai, T. 1999. Molecular cloning and functional analysis of the murine bax gene promoter. *Gene*. 238:407-415.
- Ikebukuro, K., Adachi, Y., Toki, J., Taketani, S., Tokunaga, R., Hioki, K., Ikehara, S. 2000. Morphological change, loss of delta psi(m) and activation of caspases upon apoptosis of colorectal adenocarcinoma induced by 5-FU. *Cancer Letters*. 153:101-108.
- Inoue, T., Geyer, R.K., Yu, Z.K., Maki, G.C. 2001. Downregulation of MDM2 stabilizes p53 by inhibiting p53 ubiquitination in response to specific alkylating agents. *FEBS Letters*. 490:196-201.
- Ishii-Morita, H., Agbaria, R., Mullen, C.A., Hirano, H., Koeplin, D.A., Ram, Z., Oldfield, E.H., Johns, D.G., Blaese, R.M. 1997. Mechanism of "bystander effect" killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther.* 4:244-251.
- Itaya, M., Yoshimoto, J., Kojima, K., Futagawa, S. 1999. Usefulness of p53 protein, Bcl-2 protein and Ki-67 as predictors of chemosensitivity of malignant tumors. *Oncol. Rep.* 6:675-682.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 66:233-243.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L., Chen, L.B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 77:990-994.
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L., Oren, M. 1993. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*. 8:3411-3416.
- Kaino, M. 1997. Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *J. Gastroenterol.* 32:40-46.
- Kaneko, Y., Tsukamoto, A. 1995. Gene therapy of hepatoma: bystander effects and non-apoptotic cell death induced by thymidine kinase and ganciclovir. *Cancer Letters*. 96:105-110.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research*. 51:6304-6311.
- Kato, K., Yoshida, J., Mizuno, M., Sugita, K., Emi, N. 1994. Retroviral transfer of herpes simplex thymidine kinase gene into glioma cells causes targeting of ganciclovir cytotoxic effect. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 34:339-344.
- Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T., Bredesen, D.E. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 93:2234-2238.
- Keij, J.F., Bell-Prince, C., Steinkamp, J.A. 2000. Staining of mitochondrial membrane with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential-altering drugs. *Cytometry*. 39:203-210.
- Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P., Chenchik, A. 1994. TaqStart Antibody: hotstart PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques*. 16:1134-1137.
- Kerr, J.F.R. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105:13-20.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26:239-257.
- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. It's significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73:2013-2026.
- Khan, Q.A., Vousden, K.H., Dipple, A. 1997. Cellular response to DNA damage from a potent carcinogen involves stabilization of p53 without induction of p21 (waf1/cip1). *Carcinogenesis*. 18:2313-1318.
- Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.-N., Campbell, A., Sudha, T., Yuan, Z.-M., Narula, J., Weichselbaum, R., Nalin, C., Kufe, D. 2000. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x_L in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*. 275:322-327.

- Kim, Y.G., Bi, W., Feliciano, E.S., Drake, R.R., Stambrook, P.J. 2000. Ganciclovir-mediated cell killing and bystander effect is enhanced in cells with two copies of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Gene Therapy*. 7:240-246.
- Kirschkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., Ashkenazi, A. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:46639-46646.
- Klatzmann, D., Valery, C.A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., Diquet, B., Salzmann, J.L., Philippon, J. 1998. A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study group on gene therapy for glioblastomas. *Human Gene Therapy*. 20:2595-2604.
- Kleeff, J., Kornmann, M., Sawhney, H., Korc, M. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer*. 86:399-407.
- Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W. 1993. Histological typing of tumours of the central nervous system. Springer-Verlag, Berlin.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275:1132-1136.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T., van Oers, M.H.J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*:1415-1420.
- Korsmeyer, S. 1999. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 59:1693s-1700s.
- Kortmann, R.D., Kühl, J., Timmermann, B., Mittler, U., Urban, C., Budach, V., Richter, E., Willich, N., Flentje, M., Berthold, F., Slavic, I., Wolff, J., Meisner, C., Wiestler, O., Sörensen, N., Warmuth-Metz, M., Bamberg, M. 2000. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the german prospective randomized trial HIT '91. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 46:269-279.
- Koshland, D.J. 1993. Molecule of the year. *Science*. 262:19.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ehrmann, J., Sikorska, M., Lach, B., Chatten, J., Reed, J.C. 1997. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *American Journal of Pathology*. 150:805-814.
- Kramm, C.M., Sena-Esteves, M., Barnett, F.H., Rainov, N.G., Schuback, D.E., Yu, J.S., Pechan, P.A., Paulus, W., Chiocca, E.A., Breakefield, X.O. 1995. Gene Therapy for Brain Tumors. *Brain Pathology*. 5:345-381.
- Kramm, C.M., Rainov, N.G., Sena-Esteves, M., Chase, M., Pechan, P.A., Chiocca, E.A., Breakefield, X.O. 1996. Herpes vector-mediated delivery of marker genes to disseminated central nervous system tumors. *Human Gene Therapy*. 7:291-300.
- Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 407:789-795.
- Kraus, A., Gross, M.W., Knuechel, R., Munkel, K., Neff, F., Schegel, J. 2000. Aberrant p21 regulation in radioresistant primary glioblastoma multiforme cells bearing wild-type p53. *Journal of Neurosurgery*. 93:863-872.
- Krauss, J.A., Bolln, C., Wolf, H.K., Neumann, J., Kindermann, D., Fimmers, R., Forster, F., Baumann, A., Schlegel, U. 1994. TP53 alterations and clinical outcome in low grade astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 10:143-149.
- Krishna, M., Smith, T.W., Recht, L.D. 1995. Expression of bcl-2 in reactive and neoplastic astrocytes: lack of correlation with presence or degree of malignancy. *J. Neurosurg*. 83:1017-1022.
- Kroemer, G., Reed, J.C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*. 6:513-519.
- Krohne, T.U., Shankara, S., Geissler, M., Roberts, B.L., Wands, J.R., Blum, H.E., Mohr, L. 2001. Mechanism of cell death induced by suicide genes encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Hepatology*. 34:511-518.

- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H. 1997. Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*. 387:299-303.
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 89:7491-7495.
- Kühl, J. 1987. Arbeitsgruppe für Hirntumoren im Kindesalter. Einführung, Begründung und Zielsetzung. *Klin. Pädiat.* 199:196-199.
- Kühl, J., Müller, H.L., Berthold, F., Kortmann, R.D., Deinlein, F., Maass, E., Graf, N., Gnekow, A., Scheurlen, W., Göbel, U., Wolff, J.E., Bamberg, M., Kaatsch, P., Kleihues, P., Rating, D., Sörensen, N., Wiestler, O.D. 1998. Preradiation chemotherapy of children and young adults with malignant brain tumors: results of the German pilot trial HIT'88/'89. *Klin. Pädiatr.* 210:227-233.
- Kyritsis, A.P. 1993. Chemotherapy for malignant gliomas. *Oncology*. 7:93-100.
- Kyritsis, A.P., Xu, R., Bondy, M.L., Levin, V.A., Bruner, J.M. 1996. Correlation of p53 immunoreactivity and sequencing in patients with glioma. *Molecular Carcinogenesis*. 15:1-4.
- LaBaer, J., Garret, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E. 1997. New functional activities for the p21 family of cdk inhibitors. *Genes & Development*. 11:847-862.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Landers, J.E., Haines, D.S., Strauss, J.F.3rd, George, D.L. 1994. Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene*. 9:2745-2750.
- Landers, J.E., Cassel, S.L., George, D.L. 1997. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Research*. 57:3562-3568.
- Lane, D.P., Benchimol, S. 1990. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes & Development*. 4:1-8.
- Lawrence, T.S., Rehemtulla, A., Ng, E.Y., Wilson, M., Trosko, J.E., Stetson, P.L. 1998. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res*. 58:2588-2593.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C. 1991. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*. 351:453-456.
- Li, F.P., Winston, K.R., Gimbrere, K. 1984. Follow-up of children with brain tumors. *Cancer*. 54:135-138.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479-489.
- Liu, R., Page, C., Beidler, D.R., Wicha, M.S., Nunez, G. 1999. Overexpression of Bcl-x(L) promotes chemotherapy resistance of mammary tumours in a syngeneic mouse model. *American Journal of Pathology*. 155:1861-1867.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86:147-157.
- Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A.J., McKay, B.C. 1999. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene*. 18:583-592.
- Loeffler, J.S., Alexander, E.3rd, Shea, W.M., Wen, P.Y., Fine, H.A., Kooy, H.M., Black, P.M., Alexander, E. 1992. Radiosurgery as part of the initial management of patients with malignant gliomas. *J. Clin. Oncol.* 10:1379-1385.
- Loken, M.R., Herzenberg, L.A. 1975. Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254:163.
- Loken, M.R., Stout, R.D., Herzenberg, L.A. 1979. Lymphoid cell analysis and sorting. In *Flow Cytometry and Cell Sorting*. M.R. Melamed, Mullaney, P.F., Mendelsohn, M.L., editor. Wiley, New York. 505.
- Look, A.T., Melvin, S.L., Williams, D.L., et al. 1982. Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood*. 60:959.
- Louis, D.N. 1994. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:11-21.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T. 1993a. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 362:847-.

- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. 1993b. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 74:957-967.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., Jacks, T. 1994. p53 status and the efficacy of cancer gene therapy in vivo. *Science*. 266:807-810.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lu, W., Chen, L., Peng, Y., Chen, J. 2001. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene*. 20:3206-3216.
- Lu, Z., Zhang, R., Diasio, R.B. 1993. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*. 53:5433-5438.
- Ma, Y., Yuan, R., Meng, Q., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Fan, S. 2000. p53-independent down-regulation of Mdm2 in human cancer cells treated with adriamycin. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:122-128.
- Macho, A., Castedo, M., Marchetti, P., Aguilar, J.J., Decaudin, D., Zamzami, N., Girard, P.M., Uriel, J., Kroemer, G. 1995. Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood*. 86:2481-2487.
- Malkin, M.G. 1995. Therapy of malignant astrocytoma. *Cancer Invest.* 13:553-554.
- Maltzman, W., Czyzyk, L. 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor-antigen in non-transformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology*. 4:1689-1694.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M. 2000. Death-signal induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 275:16202-16212.
- Marchese, M.J., Chang, C.H. 1990. Malignant astrocytic gliomas in children. *Cancer*. 65:2771-2778.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C.A.A., LaFace, D.M., 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.* 182:1545-1556.
- Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J., Levine, A.J. 1991. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes & Development*. 5:151-159.
- Matsubara, H., Kawamura, K., Sugaya, M., Koide, Y., Gunji, Y., Takenaga, K., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., Tagawa, M. 1999. Differential efficacy of suicide gene therapy by herpes simplex virus-thymidine kinase gene reflects the status of p53 gene in human esophageal cancer cells. *Anticancer Research*. 19:4157-4160.
- Maya, R., Alass, M., Kim, S.T., Shkedy, D. Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E., Oren, M. 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes & Development*. 15:1067-1077.
- McCurrach, M.E., Connor, T.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Lowe, S.W. 1997. Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 94:2345-2349.
- McGinn, C.J., Pestalozzi, B.C., Drake, J.C., Glennon, M.C., Kunugi, K., Otterson, G., Allegra, C.J., Johnston, P.G., Kinsella, T.J. 2000. Cell cycle regulation of the G0/G1 transition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human colon cancer cell lines. *Cancer J*. 6:215-216.
- Meddeb, M., Valent, A., Danglot, G., Nguyen, V.C., Duverger, A., Fouquet, F., Terrier-Lacombe, M.J., Oberlin, O., Bernheim, A. 1996. MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q35;q14). *Cytogenet. Cell. Genet.* 73:325-330.
- Melen-Mucha, G. 2001. Effects of short term treatment with pentagastrin, proglumide, tamoxifen given separately or together with 5-fluorouracil on the growth in the murine transplantable Colon 38 cancer. *Neoplasma*. 48:133-138.
- Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K., Yamasaki, H. 1996. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 93:1831-1835.
- Michaelis, J., Kaletsch, U., Kaatsch, P. 2000. *Zentralbl. Neurochir.* 61:80-87.

- Michalovitz, D., Halevy, O., Oren, M. 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell*. 62:671-680.
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J.H., Mercer, W.E., Givol, D. 1994. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*. 54: 3391-3395.
- Minamikawa, T., Williams, D.A., Bowser, D.N., Nagley, P. 1999. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Experimental Cell Research*. 246:26-37.
- Mirjole, J.F., Barberi-Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J.P., Abecassis, J., Millon, R., Merlin, J.L. 2000. Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *British Journal of Cancer*. 83:1380-1386.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. 1994a. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Research*. 54:3131-3135.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. 1994b. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 9:1799-1805.
- Miyashita, T., Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 80:293-299.
- Miyata, Y., Nishida, E. 1999. Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 266:291-295.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 69:1237-1245.
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S., Niland, J. 1998. The mdm2 gene amplification data base. *Nucleic Acids Research*. 26:3453-3459.
- Moolten, F.L., Wells, J.M. 1990. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *Journal of the National Cancer Institute*. 82:297-300.
- Moolten, F.L. 1994. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Therapy*. 1:279-287.
- Morgenstern, J.P., Land, H. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Research*. 18:3587-3596.
- Moriuchi, S., Oligino, T., Krisky, D., Marconi, P., Fink, D., Cohen, J., Glorioso, J.C. 1998. Enhanced tumor cell killing in the presence of ganciclovir by herpes simplex virus type 1 vector-directed coexpression of human tumor necrosis factor-alpha and herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Research*. 58:5731-5737.
- Mullaney, P.F., Van Dilla, M.A., Coulter J.R., Dean, P.N. 1969. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrum*. 40:1029.
- Mullen, C.A., K.M., Blaese R.M. 1992. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:33-37.
- Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.-M., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest*. 99:403-413.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., Krammer, P.H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *Journal of Experimental Medicine*. 188:2033-2045.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 24:17-27.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. 85:817-827.

- Nagata, S. 1994. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 345:281-287.
- Nakasu, S., Nakasu, Y., Nioka, H., Nakajima, M., Handa, J. 1994. Bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 88:520-526.
- Narita, Y., Asai, A., Kuchino, Y., Kirino, T. 2000. Actinomycin D and staurosporine, potent apoptosis inducers in vitro, are potentially effective chemotherapeutic agents against glioblastoma multiforme. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45:149-156.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 139:271-279.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F.S., Weston, A., Modali, R., Harris, C.C., Vogelstein, B. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 342:705-707.
- Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T., Sakai, T. 1985. Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Research.* 45:1753-1761.
- Nita, M.E., Nagawa, H., Tominaga, O., Tsuno, N., Fujii, S., Sasaki, S., Fu, C.G., Takenoue, T., Tsuruo, T., Muto, T. 1998. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British Journal of Cancer.* 78:986-992.
- Nita, M.E., Ono-Nita, S.K., Tsuno, N., Tominaga, O., Takenoue, T., Sunami, E., Kitayama, J., Nakamura, Y., Nagawa, H. 2000. Bcl-X(L) antisense sensitizes human colon cancer cell line to 5-fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.* 91:825-832.
- Nyholm, L., Ramlau, J. 1988. Nitrocellulose membranes as a solid phase in immunoblotting. In Handbook of immunoblotting of proteins. Vol. Vol. I. O.J. Bjerrum, Heegard, N.H.H., editor, CRC, Boca Raton, Florida. 101-108.
- Oka, Y., Naomoto, Y., Yasuoka, Y., Hatano, H., Haisa, M., Tanaka, N., Orita, K. 1997. Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-fluorouracil, tumor necrosis factor-alpha and interferon-alpha. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 27:231-235.
- Oldfield, E.H., Ram, Z., Culver, K.W., Blaese, R.M., DeVroom, H.L., Anderson, W.F. 1993. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Human Gene Therapy.* 4:39-69.
- Oldfield, E.H., Ram, Z., Chiang, Y., Blaese, R.M. 1995. Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis. GTI 0108. A phase I/II study. *Human Gene Therapy.* 6:55-85.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., Vogelstein, B. 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 358:80-83.
- Olson, D.C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., Levine, A.J. 1993. Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 complexes. *Oncogene.* 8:2353-2360.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74:609-619.
- Op den Kamp, J.A. 1979. Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:47-71.
- Ormerod, M.G., Paul, F., Cheetham, M., Sun, X.M. 1995. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. *Cytometry.* 21:300-304.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., Radinsky, R. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular and Cellular Biology.* 15:3032-3040.
- Parker, W.B., Kennedy, K.A., Klubes, P. 1987. Dissociation of 5-fluorouracil-induced DNA-fragmentation from either its incorporation into DNA or its cytotoxicity in murine T-lymphoma (S-49) cells. *Cancer Research.* 47:979-982.
- Perry, M.E., Pitte, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D., Levine, A.J. 1993. The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 90:11623-11627.

- Peters, G.J., van Triest, B., Backus, H.H., Kuiper, C.M., van der Wilt, C.L., Pinedo, H.M. 2000. Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed. *Eur. J. Cancer.* 36:916-924.
- Polak, A. 1990. Mode of action studies. B. Target nucleic acid synthesis and cell division. I. 5-Fluorocytosine. In *Chemotherapy of fungal diseases.* J.F. Ryley, editor. Springer-Verlag, Berlin. 155-159.
- Pollack, I.F. 1994. Brain tumors in children. *New England Journal of Medicine.* 331:1500-1507.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., Depinho, R.A. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 92:713-723.
- Ponten, J., Macintyre, E.H. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 74:465-486.
- Porter, P.L., Gown, A.M., Kramp, S.G., Coltrera, M.D. 1992. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *American Journal of Pathology.* 140:145-153.
- Poruchynsky, M.S., Wang, E.E., Rudin, C.M., Blagosklonny, M.V., Fojo, T. 1998. Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Research.* 58:3331-3338.
- Potmesil, M., Kirschenbaum, S., Israel, M., Levin, M., Khetarpal, V.K., Silber, R. 1983. Relationship of adriamycin concentrations to the DNA lesions induced in hypoxic and euoxic L1210 cells. *Cancer Research.* 43:3528-3533.
- Prabhu, N.S., Blagosklonny, M.V., Zeng, Y.X., Wu, G.S, Waldman, T. El-Deiry, W.S. 1996. Suppression of cancer cell growth by adenovirus expressing p21 (WAF1/CIP1) deficient in PCNA interaction. *Clin. Cancer Res.* 2:1221-1229.
- Prayson, R.A. 1999. Bcl-2 and Bcl-X expression in gangliogliomas. *Hum. Pathol.* 30:701-705.
- Prenant, A., Bonin, P., Maillard, L. 1904. *Traité d'Histologie.* Schleicher, Paris.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 83:993-1000.
- Radcliffe, J., Bunin, G.R., Sutton, L.N., Goldwein, J.W., Phillips, P.C. 1994. Cognitive deficits in long-term survivors of childhood medulloblastoma and other noncortical tumors: age-dependent effects of whole brain radiation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12:327-334.
- Raffel, C., Culver, K., Kohn, D., Nelson, M., Siegel, S., Gillis, F., Link, C.J., Villablanca, J.G., Anderson, W.F. 1994. Gene therapy for the treatment of recurrent pediatric malignant astrocytomas with in vivo tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system. *Human Gene Therapy.* 5:863-890.
- Rainov, N.G. 2000. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Human Gene Therapy.* 11:2389-2401.
- Ram, Z., Culver, K.W., Walbridge, S., Frank, J.A., Blaese, R.M., Oldfield, E.H. 1993. Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. *Journal of Neurosurgery.* 79:400-407.
- Ray, S.K., Wilford, G.G., Crosby, C.V., Hogan, E.L., Banik, N.L. 1999. Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells. *Brain Res.* 829:18-27.
- Raynal, P., Pollard, H.B. 1994. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1197:63-93.
- Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology.* 124:1-6.
- Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M., Matsuyama, S. 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366:127-137.
- Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E.E., Collins, V.P. 1993. Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* 53:2736-2739.

- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S., Collins, V.P. 1994. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Research*. 54:4299-4303.
- Reifenberger, G., Ichimura, K., Reifenberger, J., Elkahloun, A.G., Meltzer, P.S., Collins, V.P. 1996. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Research*. 56:5141-5145.
- Reinke, V., Lozano, G. 1997. The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis in vivo. *Oncogene*. 15:1527-1534.
- Rieger, L., Weller, M., Bornemann, A., Schabet, M., Dichgans, J., Meyermann, R. 1998. Bcl-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical- pathological correlative study. *Journal of Neurological Sciences*. 155:68-75.
- Robles, S.J., Adami, G.R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 16:1113-1123.
- Roswell, D.F., White, E.H. 1978. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* 57:409-423.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T., Levine, A.J. 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 17:554-564.
- Ruan, S., Okcu, M.F., Ren, J.P., Chiao, P., Andreeff, M., Levin, V., Zhang, W. 1998. Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin. *Cancer Research*. 58:1538-1543.
- Sabbatini, P., Chiou, S.-K., Rao, L., White, E. 1995. Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Molecular and Cellular Biology*. 15:1060-1070.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y. 1999. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 401:168-172.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491.
- Salinovich, O., Montelaro, R.C. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156:341-347.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cosarizza, A. 1997. JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\delta\Psi$ in intact cells. Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* 411:77-82.
- Salvioli, S., Barbi, C., Dobrucki, J., Troiano, L., Moretti, L., Pinti, M., Pedrazzi, J., Paziienza, T.L., Bobyleva, V., Franceschi, C., Cossarizza, A. 2000. Opposite role of changes in mitochondrial membrane potential ($\delta\Psi_m$) in different apoptotic processes. *FEBS Letters*. 469:186-190.
- Salzman, G.C., Crowell, J.M., Martin, J.C., Trujillo, T.T., Romero, A., Mullaney, P.F., LaBauve, P.M. 1975. Cell identification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol.* 19:374.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Samejima, Y., Meruelo, D. 1995. "Bystander killing" induces apoptosis and is inhibited by forskolin. *Gene Therapy*. 2:50-58.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N.D., Moll, U.M. 2001. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.* 488:110-115.

- Sawada, M., Nakashima, S., Banno, Y., Yamakawa, H., Hayashi, K., Takenaka, K., Nishimura, Y., Sakai, N., Nozawa, Y. 2000. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Cell Death Differ.* 7:761-772.
- Saylors III, R.L., Sidransky, D., Friedman, H.S., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Vogelstein, B., Brodeur, G.M. 1991. Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. *Cancer Research.* 51:4721-4723.
- Schagerl, S., Lackner, H., Benesch, M., Kerbl, R., Schwinger, W., Dornbusch, H.J., Sovinz, P., Urban, C. 2000. Neuroendokrine Spätfolgen nach Hirntumoren im Kindesalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 148:251-256.
- Schiebe, M., Ohneseit, P., Hoffmann, W., Meyermann, R., Rodemann, H.P., Bamberg, M. 2000. Analysis of mdm2 and p53 gene alterations in glioblastomas and its correlation with clinical factors. *Journal of Neurooncology.* 49:197-203.
- Schiffer, D., Cavalla, P., Migheli, A., Giordana, M.T., Chiado-Piat, L. 1996. Bcl-2 distribution in neuroepithelial tumors: an immunohistochemical study. *Journal of Neurooncology.* 27:101-109.
- Schmidt, T., Korner, K., Karsunky, H., Korsmeyer, S., Muller, R., Moroy, T. 1999. The activity of the murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53. *Cell Death Differ.* 6:873-882.
- Schneider, U.e.a. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines deived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer.* 19:621-626.
- Scotto, C., Deloulme, J.C., Rousseau, D., Chambaz, E., Baudier, J. 1998. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology.* 18:4272-4281.
- Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Borradori, A., Long, Z., Sorensen, A.G., Barbier, N. 1999. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Human Gene Therapy.* 10:2325-2335.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., Costa, J. 1992. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 89:4495-4499.
- Sherr, C., Roberts, J.M. 1999. Positive and negative regulation by CDK inhibitors. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development.* 9:1149-1163.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91:325-334.
- Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. 1999. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *The EMBO Journal.* 18:1815-1823.
- Shinoura, N., Sakurai, S. Asai, A., Kirino, T., Hamada, H. 2001. Caspase-9 transduction overrides the resistance mechanism against p53-mediated apoptosis in U-87MG glioma cells. *Neurosurgery.* 49:177-186.
- Shu, H.-K.G., Kim, M.M., Chen, P., Furman, F., Julin, C.M., Israel, M.A. 1998. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21BAX expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:14453-14458.
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Tya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. 1997. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & Development.* 11:3471-3481.
- Sims, P.J., Waggoner, A.S., Wang, C.-H., Hoffman, J.F. 1974. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry.* 13:3315.
- Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell.* 76:959-962.
- Song, Q., Wei, T., Lees-Miller, S., Alnemri, E., Watters, D., Lavin, M.F. 1997. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 94:157-162.
- Soussi, T., Caron de Fromentel, C, May, P. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene.* 5:945-952.

- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 98:503-517.
- Stan, A.C., Casares, S., Radu, D., Walter, G.F., Brumeanu, T.D. 1999. Doxorubicin-induced cell death in highly invasive human gliomas. *Anticancer Research*. 19:941-950.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C., Krammer, P.H., Cory, S. 1995. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J*. 14:6136-6147.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine*. 184:1331-1341.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.-G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., Kroemer, G. 1997. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med*. 186:25-37.
- Tait, D.M., Bailey, C.C., Cameron, M.M. 1992. Tumours of the Central Nervous System. In *Cancer in Children. Clinical Management*. P.A. Voûte, Barrett, A., Lemerle, J., editor. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 184-206.
- Takamiya, Y., Short, M.P., Moolten, F.L., Fleet, C., Mineta, T., Breakefield, X.O., Martuza, R.L. 1993. An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. *Journal Neurosurgery*. 79:104-110.
- Tao, W., Levine, A.J. 1999. p19^{ARF} stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 96:6937-6941.
- Terasaki, M., Song, J., Wong, J.R., Weiss, M.J., Chen, B.L. 1984. Localization of endoplasmatic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell*. 38:101-108.
- Terasaki, M. 1998. Labeling of the endoplasmatic reticulum with DiOC₆(3). In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Vol. 2. Academic Press. 501-506.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281:1312-1316.
- Thornborrow, E.C., Manfredi, J.J. 1999. One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *Journal of Biological Chemistry*. 274:33747-33756.
- Thornborrow, E.C., Manfredi, J.J. 2001. The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 276:15598-15608.
- Thorpe, G.H., Kricka, L.J. 1986. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods Enzymol*. 133:331-353.
- Tian, H., Wittmack, E.K., Jorgensen, T.J. 2000. p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res*. 60:679-684.
- Todaro, G.J., Green, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol*. 17:299-313.
- Tomei, L.D., Cope, F.O. 1991. ??? In *Current communications in cell and molecular biology*. Vol. Vol. 3. CSHL Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Touraine, R.L., Vahanian, N., Ramsey, W.J., Blaese, R.M. 1998. Enhancement of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir bystander effect and its antitumor efficacy in vivo by pharmacologic manipulation of gap junctions. *Human Gene Therapy*. 9:2385-2391.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 76:4350-4354.
- Towbin, H., Gordon, J. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding - Current status and outlook. *Journal of Immunological Methods*. 72:313-340.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M.J., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.-M., Krammer, P.H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 245:301-305.
- Trepel, M., Groscurth, P., Malipiero, U., Gulbins, E., Dichgans, J., Weller, M. 1998. Chemosensitivity of human malignant glioma: modulation by p53 gene transfer. *Journal of Neurooncology*. 39:19-32.

- Trinh, Q.T., Austin, E.A., Murray, D.M., Knick, V.C., Huber, B.E. 1995. Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Research*. 55:4808-4812.
- Tsang, R.W., Laperriere, N.J., Simpson, W.J., Brierley, J., Panzarella, T., Smyth, H.S. 1994. Glioma arising after radiation therapy for pituitary adenoma. A report of four patients and estimation of risk. *Cancer*. 72:2227-2233.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., Haupt, Y. 1999. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *The EMBO Journal*. 18:1805-1814.
- Van Groeningen, C.J., Pinedo, H.M., Heddes, J., Kok, R.M., de Jong, A.P., Wattel, E., Peters, G.J., Lankelma, J. 1988. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil assessed with a sensitive mass spectrometric method in patients on a dose escalation schedule. *Cancer Research*. 48:6956-6961.
- Van Meir, E.G., Kikuchi, T., Tada, M., Li, H., Diserens, A.-C., Wojcik, B.E., Huang, H.-J.S., Friedmann, T., de Tribolet, N., Cavanee, W.K. 1994. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Research*. 54:649-652.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., 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. Meth.* 184:39-51.
- Vile, R.G., Castleden, S., Marshall, J., Camplejohn, R., Upton, C., Chong, H. 1997. Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *International Journal of Cancer*. 71:267-274.
- Vogelbaum, M.A., Tong, J.X., Perugu, R., Gutmann, D.H., Rich, K.M. 1999. Overexpression of bax in human glioma cell lines. *Journal of Neurosurgery*. 91:483-489.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. 1992. p53 function and dysfunction. *Cell*. 70:523-526.
- von Deimling, A., Eibl, R.H., Ohgaki, H., Louis, D.N., von Ammon, K., Petersen, I., Kleihues, P., Chung, R.Y., Wiestler, O.D., Seizinger, B.R. 1992. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Research*. 52:2987-2990.
- Vrionis, F.D., Wu, J.K., Qi, P., Waltzman, M., Cherington, V., Spray, D.C. 1997. The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions. *Gene Therapy*. 4:577-585.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369:574-578.
- Waga, S., Stillman, B. 1998. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Molecular and Cellular Biology*. 18:4177-4187.
- Waldmann, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G₁ arrest in human cancer cells. *Cancer Research*. 55:5187-5190.
- Waldmann, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1996. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*. 381:713-716.
- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobè, G.C., Kerr, J.F.R. 1980. Patterns of cell death. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 13:18-54.
- Wallace, H., Clarke, A.R., Harrison, D.J., Hooper, M.L., Bishop, J.O. 1996. Ganciclovir-induced ablation of non-proliferating thyrocytes expressing herpes thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene*. 13:55-61.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 20:13884-13888.
- Wang, Z.-H., Samuels, S., Gama Sosa, M.A., Kolodny, E.H. 1998. 5-Fluorocytosine-mediated apoptosis and DNA damage in glioma cells engineered to express cytosine deaminase and their enhancement with interferon. *J Neuro-Oncol*. 36:219-229.

- Wassermann, K., Markovits, J., Jaxel, C., Capranico, G., Kohn, K.W., Pommier, Y. 1990. Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II. *Mol. Pharmacol.* 38:38-45.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Bar-Sagi, D. 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* 1:20-26.
- Wei, S.-J., Chao, Y., Shih, Y.-L., Yang, D.M., Hung, Y.-M., 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. *Gne Therapy.* 6:420-431.
- Wei, S.J., Chao, Y., Hung, Y.M., Lin, W.C., Yang, D.M., Shih, Y.L., Ch'ang, L.Y., Whang-Peng, J., Yang, W.K. 1998. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Experimental Cell Research.* 241:66-75.
- Weizsaecker, M., Deen, D.F., Rosenblum, M.L., Hoshino, T., Gutin, P.H., Barker, M. 1981. The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J. Neurol.* 224:183-192.
- Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J.C., Fontana, A. 1995. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *The Journal of Clinical Investigation.* 95:2633-2643.
- Wolff, J.E.A., Egeler, R.M. 1999. Investigational approaches to the treatment of brain tumors in children. *Medical and Pediatric Oncology.* 32:135-138.
- Wolff, J.E.A.B., J., Köhl, J. 1996. HIT-GBM: mutizentrische Studie zur Behandlung von Kindern mit malignen Gliomen. *Klin. Pädiat.* 208:193-196.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechustan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology.* 139:1281-1292.
- Wu, J.K., Cano, W.G., Meylaerts, S.A.G., Qi, P., Vrionis, F., Cherington, V. 1994. Bystander tumoricidal effect in the treatment of experimental brain tumors. *Neurosurgery.* 35:1094-1103.
- Wu, L., Levine, A.J. 1997. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.* 3:441-451.
- Wu, X., Bayle, H., Olson, D., Levine, A.J. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7:1126-1132.
- Wu, Y., Mehew, J.W., Heckman, C.A., Arcinas, M., Boxer, L.M. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene.* 20:240-251.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogeneous endonuclease activation. *Nature.* 284:555-556.
- Wyllie, A.H. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 11:95-103.
- Xie, Y., Gilbert, J.D., Kim, J.H., Freytag, S.O. 1999. Efficacy of adenovirus-mediated CD/5-FC and HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapies concomitant with p53 gene therapy. *Clin. Cancer Res.* 5:4224-4232.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 366:701-704.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.-I, Jones, D.P., Wang, X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of Cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275:1129-1132.
- Yin, C.Y., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., VanDyke, T. 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature.* 385:637-640.
- Yin, D., Tamaki, N., Kokunai, T. 2000. Wild-type p53-dependent etoposide-induced apoptosis mediated by caspase-3 activation in human glioma cells. *Journal of Neurosurgery.* 93:289-297.
- Yoneda, K., Yamamoto, T., Osaki, T. 1998. p53- and p21-independent apoptosis of squamous cell carcinoma cells induced by 5-fluorouracil and radiation. *Oral Oncol.* 34:529-537.

- Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*. 169:1747-1756.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 352:345-347.
- Yoshikawa, R., Kusunoki, M., Yanagi, H., Noda, M., Furuyama, J.I., Yamamura, T., Hashimoto-Tamaoki, T. 2001. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Research*. 61:1029-1037.
- Zagozdzon, R., Golab, J. 2001. Immunomodulation by anticancer chemotherapy: more is not always better (review). *Int. J. Oncol.* 18:417-424.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.-L., Petit, P.X., Kroemer, G. 1995a. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181:1661-1672.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G. 1995b. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367-377.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1533-1544.
- Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene*. 12:1557-1564.
- Zeng, X., Keller, D., Wu, L., Lu, H. 2000. UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription. *Cancer Research*. 60:6184-6188.
- Zhang, L., Yu, J., Park, B.H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 2000a. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*. 290:989-992.
- Zhang, S.N., Yuan, S.Z., Zhu, Z.H., Wen, Z.F., Huang, Z.Q., Zeng, Z.Y. 2000b. Apoptosis induced by 5-fluorocytosine in human pancreatic cancer cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Acta Pharmacol. Sin.* 21:655-659.
- Zhang, W., Couldwell, W.T., Simard, M.F., Song, H., Lin, J.H.-C., Nedergaard, M. 1999a. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res.* 59:1994-2003.
- Zhang, W.-W. 1999b. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy*. 6:113-138.
- Zhang, Y., Xiong, Y. 1999c. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol. Cell*. 3:579-591.
- Zhang, Y., Xiong, Y. 2001. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth & Differentiation*. 12:175-186.
- Zoratti, M., Szabò, I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*. 1241:139-176.

VII. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Ute Fischer
geb. am 17. März 1969 in Gronau (Westf.)

Bildungsweg:

1975-1979	Grundschule (Gronau)
1979-7.6.1988	Werner-von-Siemens-Gymnasium (Gronau)
7.6.1988	Abitur
ab 1.10.1988	Universität zu Köln (Biologie/Dipl.)
24.10.1990	Diplom-Vorprüfung
8.12.1995	mündliche Diplom-Hauptprüfung
21.10.1996	Diplom
bis 30.9.1999:	Promotionsstudium Biologie (Köln)
seitdem:	Promotionsstudium Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tätigkeiten:

3/91-9/91	Praktikantin in der AG „Immundysregulation und maligne Lymphome“ von Prof. K. Rajewsky, Universitätsklinik Köln, unter Betreuung von PD Dr. Ralf Küppers
8/92-9/94	Studentische Hilfskraft am Institut für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinik Köln (PD S. Girod, Prof. A. Radbruch)
9/94-4/95	Trainee in der AG von Dr. M. Pfahl an der La Jolla Cancer Research Foundation (heute das „Burnham Institute“) in La Jolla (CA, USA), ab 1/95 am San Diego Regional Cancer Center in La Jolla
4/95-7/95	Studentische Hilfskraft am Institut für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinik Köln
10/96-7/01	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Experimentelle Hämatologie und Stammzelltransplantation, Institut für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Kinderklinik (Prof. U. Göbel), Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
seit 1/02	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Experimentellen Dermatologie, Abteilung für Immunologie und Zellbiologie (Prof. K. Schulze-Osthoff), Universität Münster

Düsseldorf, den 26. Juni 2002

(Ute Fischer)

VIII. Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. H. Mehlhorn betreut worden.

Düsseldorf, den 26. Juni 2002

(Ute Fischer)

IX. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Experimentelle Hämatologie und Pädiatrische Onkologie der Kinderklinik (Prof. U. Göbel) der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Göbel für die Ermöglichung dieser Arbeit und die stete und bereitwillige Unterstützung in allen dazugehörigen Aspekten. Ein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Christof Kramm für die Einarbeitung und Betreuung, sowie für konstruktive Diskussionen, Anregungen und Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch für die Hilfsbereitschaft und Kollegialität der Mitarbeiter des Labors von denen Frau Dr. Susanne Frank, Frau Dr. Sabine Steffens und Oliver Heidmann stellvertretend genannt seien.

Vor allem aber möchte ich mich bei Herrn Prof. Mehlhorn für die Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung hierin ausdrücklich bedanken.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Ehemann Gunter Schmitt, meiner Familie und meinen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.