

Gentherapie von malignen Gliomen mit retroviralen Pseudotypvektoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Yvonne Fischer
aus Nürnberg

Frankfurt am Main, 2005
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. H. Schwalbe

Erstgutachter: Prof. R. Marschalek

Zweitgutachter: Prof. D. von Laer

Datum der Disputation:

Für meine Mutter

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen herzlich bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein spezieller Dank gilt Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer, die mir die Durchführung meiner Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Besonders für die intensive Betreuung, die stets inspirierenden Diskussionen und ihr großes Engagement für das von mir bearbeitete Projekt möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek an der Universität Frankfurt danke ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Dr. Hrvoje Miletic an der Universität Köln möchte ich mich für die sehr nette und anregende Kooperation, sowie für die Durchführung der *in vivo* Experimente herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Harald Neumann und Frau Sara Litwak am Life & Brain Center, Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung der multipotenten adulten Stammzellen und für die Isolierung der primären Rattenhirnzellen.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Laer bedanke ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank für ihre Hilfe und Anregung bei wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen gilt hierbei: Felix Hermann, Roland Zahn, Tsanan Giroglou, Ingrid Choi, Holger Martinius, Marc Egelhofer und Sebastian Newrzela. Für ihre tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei Patricia Schult-Dietrich, Tefik Merovci, Silvia Bracharz, Carolin Maas, Isabel Beßler und Miriam Geist bedanken.

Allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses danke ich für ihre Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und für ein nettes und stimulierendes wissenschaftliches Umfeld.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich herzlich für ihre moralische Unterstützung, die mir bei der Durchführung meiner Dissertation sehr geholfen hat.

1 Inhalt

1	Inhalt.....	5
2	Zusammenfassung	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Gliome	11
3.2	Möglichkeiten und Grenzen der konventionellen Therapie von Gliomen	12
3.3	Gentherapie von Gliomen.....	12
3.3.1	Retrovirale Vektoren.....	12
3.3.2	Verpackungszellen	13
3.3.3	Pseudotypisierung retroviraler Vektoren.....	15
3.3.4	Therapeutische Gene	15
3.3.4.1	Suizidgene.....	16
3.3.4.2	Immunstimulatorische Gene.....	17
3.3.5	Präklinische Studien zur retroviralen Gentherapie von Gliomen	18
3.3.6	Klinische Studien zur retroviralen Gentherapie von Gliomen	18
3.4	Verbesserte Strategien zur Gentherapie von Gliomen	20
3.4.1	Optimierung der Gentransfervektoren	20
3.4.2	Optimierung der Vektordistribution	21
3.5	Zielsetzung der Arbeit.....	23
4	Material & Methoden	24
4.1	Material und Verbrauchsmittel	24
4.1.1	Verwendete Kits.....	24
4.1.2	Enzyme.....	25
4.1.3	Oligonukleotide	25
4.1.4	Plasmide	26
4.1.5	Lösungen, Puffer und Nährmedien.....	28
4.1.6	Zelllinien.....	29
4.1.7	Antikörper	30
4.2	Methoden.....	31

4.2.1	Gentechnische Methoden.....	31
4.2.1.1	Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i>	31
4.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	31
4.2.1.3	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	31
4.2.1.4	Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA-Enden.....	32
4.2.1.5	Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow-Polymerase	32
4.2.1.6	Gelelektrophorese von DNA.....	32
4.2.1.7	Isolierung von DNA aus Gelen	33
4.2.1.8	Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellen.....	33
4.2.1.9	Reverse Transkription von RNA	33
4.2.1.10	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen	34
4.2.1.11	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	34
4.2.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten	36
4.2.1.13	Ligation von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren	36
4.2.1.14	Herstellung kompetenter Bakterien aus <i>Escherichia coli</i>	36
4.2.1.15	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA	37
4.2.1.16	Sequenzierung von DNA.....	37
4.2.1.17	Quantitative PCR.....	38
4.2.2	Zellkulturmethoden	39
4.2.2.1	Kultivierung und Konservierung von Zelllinien.....	39
4.2.2.2	Stabile Transfektion von C17.2	40
4.2.2.3	Stabile Transfektion von MAPC.....	40
4.2.2.4	Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren.....	41
4.2.2.5	Konzentration lentiviraler Überstände in der Ultrazentrifuge.....	41
4.2.2.6	Transduktion von Zellen mit retroviralen Überständen.....	42
4.2.2.7	Titration retroviraler Überstände aus transienter Produktion in 293T Zellen...	42
4.2.2.8	Titration retroviraler Überstände von stabilen Verpackungszellen	43
4.2.2.9	PCR-basierter RCR Test	43
4.2.2.10	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	43
4.2.2.11	FACS-Sortierung	45
4.2.2.12	Immunfluoreszenz zum Nachweis von Connexin 43.....	45
4.2.2.13	Colorimetrischer Test der HSV-TK Zytotoxizität.....	45
4.2.2.14	Fluorimetrischer Test des HSV-TK Bystander Effekts.....	46
4.2.2.15	Kultivierung und Transduktion primärer Hirnzellen	46
4.2.3	Tierexperimente.....	47
4.2.3.1	Studien mit lentiviralen Vektoren <i>in vivo</i>	47
4.2.3.2	Zellmigration <i>in vivo</i>	48

4.2.3.3	Bystander Effekt von MAPC-TK <i>in vivo</i>	48
4.2.3.4	Studien mit MAPC Verpackungszellen <i>in vivo</i>	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Tropismusstudien mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen	49
5.1.1	Tropismus lentiviraler Vektorpseudotypen für Gliomzellen und normale Hirnzellen <i>in vitro</i>	49
5.1.2	Transduktion von Gliomen mit lentiviralen Pseudotypen <i>in vivo</i>	52
5.2	Suizidgenentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypvektoren.....	54
5.2.1	Suizidgentransfer mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen in Gliomzellen <i>in vitro</i>	54
5.2.2	Suizidgentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen <i>in vivo</i>	57
5.3	Tumorspezifische Migration verschiedener Zelltypen im Gliommodell <i>in vivo</i>	59
5.4	Neurale Stammzellen als stabile Verpackungszellen für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren	63
5.4.1	Stabile Expression von MLV Gag-Pol und LCMV-GP in C17.2.....	64
5.4.2	Produktion retroviraler Pseudotypvektoren in C17.2	65
5.4.3	Test auf Produktion replikationskompetenter Retroviren in C17.2	66
5.5	MAPC als tumorinfiltrierende Vehikel zur Genterapie von Gliomen	70
5.5.1	Bystander-Effekt von HSV-TK-exprimierenden MAPC auf Gliomzellen <i>in vitro</i>	70
5.5.2	Gliomtherapie mit HSV-TK exprimierenden MAPC <i>in vivo</i>	72
5.6	MAPC als stabile Verpackungszellen für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren..	73
5.6.1	Stabile Expression von MLV Gag-Pol in MAPC	74
5.6.2	Stabile Expression von LCMV-GP in MAPC.....	74
5.6.3	Produktion retroviraler Pseudotypvektoren mit <i>gfp</i> Gen in MAPC.....	76
5.6.4	Test auf Produktion replikationskompetenter Retroviren in MAPC Verpackungszelllinien	78
5.6.5	Produktion retroviraler Pseudotypvektoren mit <i>hsv-tk</i> Gen in MAPC	79
5.6.6	Transduktion von Gliomzellen mit Vektorüberständen von stabilen MAPC Verpackungszellen	83

6	Diskussion	86
6.1	Lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren vermitteln effizienten und spezifischen Gentransfer in Gliomzellen	86
6.1.1	Selektiver Tropismus lentiviraler LCMV-GP Pseudotypen für Gliomzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	86
6.1.2	Suizidgentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen <i>in vitro</i>	88
6.1.3	Suizidgentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen <i>in vivo</i>	89
6.2	Tumorinfiltration durch neurale und multipotente adulte Stammzellen.....	90
6.3	Therapie von Gliomen durch HSV-TK exprimierende MAPC	91
6.4	Entwicklung migratorischer Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypvektoren ...	92
6.4.1	Verpackungszellen auf Basis neuraler Stammzellen.....	92
6.4.2	Verpackungszellen auf Basis multipotenter adulter Stammzellen	93
7	Literatur	98
8	Anhang	109
8.1	Abkürzungen.....	109
8.2	Klonierte Plasmide.....	111
8.3	Plasmidkarten	116

2 Zusammenfassung

In der retroviralen Gentherapie von Gliomen ist die effiziente und spezifische Transduktion von Gliomzellen ausschlaggebend für den Therapieerfolg. Als besonders schwierig erwies sich in diesem Zusammenhang [1]:

- (i) die ausreichende Distribution retroviraler Vektoren im Tumorgewebe
- (ii) die Transduktion einzelner, infiltrierender Tumorzellen und
- (iii) die Transduktion von Tumorbereichen mit geringer Zellteilungsaktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Strategien angewandt, um diese Ziele zu erreichen.

Lentivirale Vektoren wurden mit Glykoproteinen des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) und des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisiert. Lentivirale Vektoren vermitteln anders als gammaretrovirale Vektoren einen effizienten Gentransfer in ruhende Zellen [2]. Auf diese Weise können auch Tumorateile mit geringer Zellteilungsaktivität transduziert werden. Allerdings sollte dabei die Transduktion des ebenfalls mitotisch inaktiven Hirngewebes vermieden werden. Vergleichende Tropismusstudien mit den oben genannten Pseudotypvektoren zeigten, dass LCMV-GP Pseudotypen einen effizienten und spezifischen Gentransfer in Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* vermitteln. Auch einzelne, infiltrierende Tumorzellen wurden von LCMV-GP Pseudotypvektoren transduziert. Normale Hirnzellen, insbesondere Neurone, wurden von LCMV-GP Pseudotypen dagegen kaum infiziert. Im Gegensatz dazu transduzierten VSV-G Pseudotypen Neurone *in vitro* und *in vivo* mit hoher Effizienz, während Gliomzellen von VSV-G Pseudotypen weniger stark transduziert wurden als von LCMV-GP Pseudotypen. Das Suizidgen *hsv-tk* (Herpes Simplex Virus Thymidinkinase) wurde anschließend durch lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren in Gliome *in vivo* eingebracht werden. Diese Suizidgentherapie bewirkte einen starken Antitumoreffekt und führte zu einer kompletten Eliminierung des Tumors bei 90% der behandelten Ratten. Ergebnisse dieser Studien verdeutlichen, dass LCMV-GP-pseudotypisierte lentivirale Vektoren ein hoch effizientes und spezifisches Vektorsystem zum Gentransfer in maligne Gliomzellen darstellen.

Sowohl die Distribution retroviraler Vektoren als auch die Transduktion infiltrierender Gliomzellen sollte in dieser Arbeit durch migratorische Verpackungszellen („vector packaging cell“, VPC) optimiert werden. Diese migratorischen VPC sollen Gliome *in vivo* gezielt infiltrieren und dabei kontinuierlich retrovirale Vektoren freisetzen. Die Fähigkeit zur Infiltration von Gliomen *in vivo* wurde bereits zuvor bei neuronalen und mesenchymalen Stammzellen beobachtet [3-5]. In dieser Arbeit wurde ein gliomzpezifisches Migrationsverhalten erstmals auch für multipotente adulte Stammzelle (MAPC) gezeigt: MAPC infiltrierten nach Injektion in etablierte Gliome *in vivo* den Tumor großflächig, drangen aber nicht in gesundes Hirngewebe vor.

MAPC werden wie mesenchymale Stammzellen aus dem adulten Knochenmark isoliert, besitzen aber ein breiteres Differenzierungspotential und sind *in vitro* stark expandierbar [6]. Die schnelle und anhaltende Expansion von MAPC ermöglicht deren genetische Manipulation und das Isolieren von Klonen, wie es bei der Etablierung retroviraler VPC erforderlich ist. Gammaretrovirale *gag-pol* Sequenzen und das *lcmv-gp* Gen wurden durch stabile Transfektion bzw. durch Transduktion mit einem lentiviralen selbstinaktivierenden Vektor in MAPC eingebracht. Nach Transduktion mit einem verpackbaren retroviralen Vektor produzierten MAPC Verpackungszellen kontinuierlich retrovirale Vektorpartikel. Vektortiter lagen durchschnittlich bei 3×10^3 TU/ml und blieben auch nach mehrwöchiger Kultivierung und mehrmaligem Einfrieren der Zellen konstant. MAPC Verpackungszellen setzten jedoch keine replikationskompetenten Retroviren frei. Nach Injektion in Gliome infiltrierten MAPC Verpackungszellen den Tumor und vermittelten die Transduktion von Gliomzellen *in vivo*. MAPC Verpackungszellen waren auch in unmittelbarer Nähe zu infiltrierenden Gliomzellen nachweisbar und bewirkten Transduktion dieser Zellen. Damit wurde in dieser Arbeit erstmals eine Verpackungszelllinie für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren auf Basis von tumorinfiltrierenden Stammzellen generiert.

In nachfolgenden Studien ist nun die Kombination der hier verfolgten Strategien, also die Etablierung einer lentiviralen Verpackungszelllinie für LCMV-GP Pseudotypen auf MAPC Basis, anzustreben. Auf diese Weise könnte die Transduktion von Gliomen mit geringer Zellteilungsrate, die effiziente Vektordistribution im Tumorgewebe und die spezifische Transduktion von Gliomzellen in der Infiltrationszone optimiert werden.

3 Einleitung

3.1 Gliome

Primäre Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS), welche in ihrer Morphologie und Genexpression den Gliazellen ähneln, werden als Gliome bezeichnet. Gliome sind mit rund 50% die häufigsten aller primären Hirntumore [7] und können aufgrund ihrer Histologie und Pathologie in vier klinische Grade unterteilt werden (Tabelle 3.1). Höhergradige Gliome wachsen typischerweise stark expansiv und infiltrieren frühzeitig das Hirnparenchym, wodurch sie einen Anstieg des Hirndrucks und die Zerstörung von gesundem Gewebe verursachen [8]. Die häufigsten primären Hirntumore sind die als Grad IV beschriebenen Glioblastome (GBM) mit einer mittleren Überlebenszeit von nur einem Jahr nach Diagnose. Glioblastome können de Novo Auftreten (primäres GBM), häufig entwickeln sich aber auch niedrigmaligne Astrozytome im Laufe der Erkrankung zu hochmalignen Glioblastomen (sekundäres GBM) [9, 10].

Die Ursprungszelle für Gliome ist bisher nicht bekannt, in den letzten Jahren konnten jedoch tumorinitiierende Zellen aus Gliomen isoliert und näher charakterisiert werden. Diese Tumorstammzellen teilen interessanterweise eine Reihe von Eigenschaften mit den im adulten ZNS existierenden neuralen Stammzellen (NSC). So exprimieren NSC [11, 12] und Tumorstammzellen die Markerproteine Nestin und CD133 und besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in Neurone und Gliazellen [13-17]. Es wird daher spekuliert, dass Gliome aus transformierten neuralen Stammzellen hervorgehen.

Tabelle 3.1 WHO Klassifizierung der Gliome (Auszug aus [18])

Tumorbezeichnung	Grad	Häufigkeit *	Mittlere Überlebenszeit
Pilozytisches Astrozytom	I	0,3	5-50 Jahre
Diffuses Astrozytom	II	0,2	3-5 Jahre
Oligodendrogliom	II	0,3	3-5 Jahre
Ependymom	II	0,2-0,3	3-5 Jahre
Anaplastisches Astrozytom	III	0,5	2-3 Jahre
Glioblastom	IV	2,0-3,0	6 Monate bis 2 Jahre

* Neuerkrankungen pro 100.000 Personen und Jahr

3.2 Möglichkeiten und Grenzen der konventionellen Therapie von Gliomen

Gliome werden standardmäßig mit einer möglichst umfassenden Resektion sowie mit Bestrahlung und Chemotherapie behandelt. Trotz verbesserter neurochirurgischer Techniken und Entwicklung neuer Chemotherapeutika ist die Prognose für Gliompatienten über die letzten dreißig Jahren hinweg gleich geblieben [19]. Die außerordentlich schlechte Therapierbarkeit von hochgradigen Gliomen hat verschiedenen Ursachen. Zum Einen ist die Resektion in Abhängigkeit von der anatomischen Lage des Tumors nicht immer möglich. Darüber hinaus kann eine vollständige Resektion aufgrund des stark infiltrativen Wachstums der Tumore nicht erreicht werden. Die nach Resektion zurückbleibenden Tumorzellen verursachen daher regelmäßig Tumorrezidive. Chemotherapie und Bestrahlung führt bei einem Teil der Patienten mit hochgradigen Gliomen zu einem Rückgang des Tumorwachstums, der jedoch in praktisch allen Fällen nur vorübergehender Natur ist. Die nur begrenzte Wirksamkeit der Chemotherapie bei Gliomen beruht zum Teil auf der relativen Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für polare Moleküle und Makromoleküle. Die meisten Chemotherapeutika erreichen daher keine therapeutisch effektiven Konzentrationen in der Umgebung des Hirntumors. Darüber hinaus wirken Chemotherapeutika hauptsächlich toxisch auf Zellen, die sich in aktivem Zellzyklus befinden. Dies ist aber bei einer Mehrzahl der Gliomzellen in einem gegebenen Therapiefenster nicht der Fall.

3.3 Gentherapie von Gliomen

Gliome sind wegen ihrer außerordentlich schlechten Prognose und Therapierbarkeit ein Hauptfokus gentherapeutischer Ansätze. Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien mit viralen Gentransfervektoren sowie mit unterschiedlichen therapeutischen Genen wurden bereits durchgeführt.

3.3.1 Retrovirale Vektoren

Die Mehrheit der bislang durchgeführten präklinischen [20-26] und klinischen [27-30] Studien zur Gentherapie von Gliomen wurde mit gammaretroviralen, vom murinen Leukämievirus (MLV) abgeleiteten Vektoren durchgeführt. Diese Vektoren infizieren nur mitotisch aktive Zellen [31]. Da das adulte ZNS hauptsächlich aus postmitotischen Zellen besteht, beschränkt sich Transduktion durch gammaretrovirale Vektoren im ZNS weitgehend auf proliferierende

Tumor- und Endothelzellen, sowie reaktive Astrozyten in der Tumorperipherie [32]. Retrovirale Vektoren enthalten keine viruseigenen Gene, sondern lediglich die sogenannten *cis*-aktiven Elemente, die zur Verpackung, reversen Transkription, Integration und Expression des Vektorgenoms essentiell sind. Dies sind unter anderem die Long Terminal Repeats (LTR) und das Verpackungssignal Ψ [33] (Abbildung 3.1). Durch Deletion der viralen Gene wird die Immunogenität retroviraler Vektoren und das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCR) durch Rekombination minimiert [34].

Ebenfalls zu den retroviralen Vektoren zählen die erst in den 90er Jahren entwickelten lentiviralen Vektoren [35]. Diese Vektoren haben den Vorteil, dass sie auch ruhende Zellen infizieren können, und so im Gegensatz zu den gammaretroviralen Vektoren nicht auf aktive Proliferation der Zielzellen angewiesen sind [2]. Ein Nachteil dieser Unabhängigkeit vom Zellzyklus ist allerdings der Verlust der tumorspezifischen Transduktion, die mit gammaretroviralen Vektoren im ZNS erzielt werden kann.



Abbildung 3.1 Retroviraler Vektor nach reverser Transkription. Die Long terminal repeats bestehen aus U3, R und U5 Regionen. Transkription des Transgens steht unter der Kontrolle des Enhancer/Promotors in der U3 Region der 5' LTR. Das Polyadenylierungssignal befindet sich in der R Region. Das im 5' untranslatierten Bereich lokalisierte Verpackungssignal Ψ vermittelt die Interaktion der Vektor RNA mit Gag Proteinen und somit den Einbau der RNA in virale Partikel.

3.3.2 Verpackungszellen

Retrovirale Vektoren werden in Verpackungszellen produziert, welche Gene für retrovirale Strukturproteine und Enzyme enthalten. Diese viralen Gene werden auf DNA-Abschnitten codiert, die kein Verpackungssignal enthalten, und deren Transkripte somit nicht in retrovirale Partikel verpackt werden.

Zur transienten Produktion retroviraler Vektoren werden die viralen Gene und der retrovirale Vektor in Form von Plasmiden in Produzentenzellen kotransfiziert. Zur Produktion retroviraler Vektoren in klinischem Maßstab werden jedoch stabile Verpackungszelllinien (vector packaging cell, VPC) benutzt, da diese im Vorfeld klinischer Studien genauestens

charakterisiert und auf Kontamination mit Pathogenen, insbesondere mit RCR getestet werden können. Verpackungszelllinien sind so konzipiert, dass sie alle Proteine, die zur Produktion retroviraler Partikel benötigt werden und auch den retroviralen Vektor stabil exprimieren, jedoch keine replikationskompetenten Viren freisetzen (Abbildung 3.2). Moderne, sogenannte „Split-function“ Verpackungszellen enthalten zwei getrennte Expressionskonstrukte für retrovirale Proteine und zusätzlich ein Konstrukt zur Expression des retroviralen Vektors, wobei Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Konstrukten weitgehend vermieden werden [36]. Diese Maßnahmen verringern das Risiko der RCR Entstehung durch Rekombination erheblich. Die mit stabilen Verpackungszelllinien erzielten Titer variieren zwischen 1×10^4 und 4×10^7 , und sind unter anderem abhängig vom transferierten retroviralen Vektor und von den jeweiligen Zielzellen [37, 38].

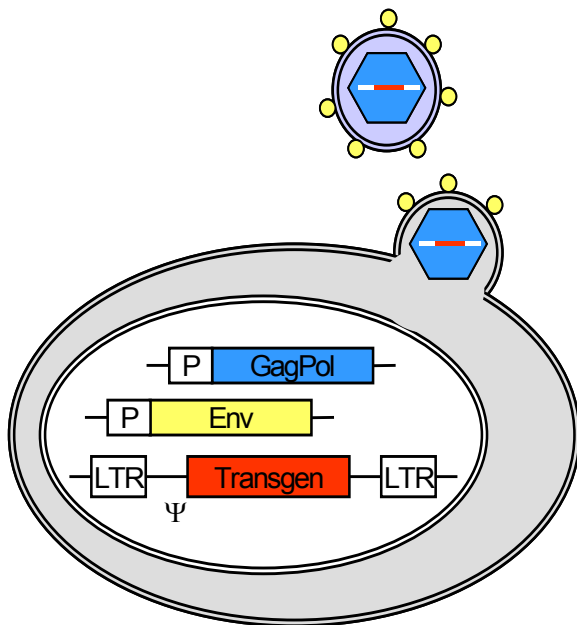


Abbildung 3.2 Stabile Verpackungszelle für retrovirale Vektoren.

Stabile Verpackungszellen enthalten Gene für Strukturproteine und Enzyme (Gag-Pol), Hüllproteine (Env) und den Transfervektor auf getrennten DNA Abschnitten. Diese sind in der Regel in das Genom der Verpackungszelle integriert. Virale Proteine und Vektor RNA versammeln sich an der Plasmamembran, Hüllproteine sind in die Plasmamembran integriert. Neu gebildete Vektoren schnüren sich von der Plasmamembran ab.

Beispiele für verfügbare stabile Verpackungszelllinien sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Die bisher in der klinischen Gentherapie von Gliomen verwendeten Verpackungszelllinien basierten auf der murinen Fibroblastenlinie NIH 3T3 [36, 39-41].

Tabelle 3.2 Stabile Verpackungszelllinien für retrovirale Vektoren

Referenz	Name	Zelltyp	Spezies	Titer (TU/ml)
[40]	Ψ-AM	NIH 3T3	Maus	2×10^5
[41]	PA317	NIH 3T3	Maus	4×10^7
[36]	Ψ-CRIP	NIH 3T3	Maus	1×10^6
[42]	GP+envAm12	NIH 3T3	Maus	1×10^6
[43]	FLYA4	HT1080	Mensch	2×10^7
[43]	TELCeB6	TE617	Mensch	3×10^7
[44]	293-SPA	293	Mensch	6×10^6

3.3.3 Pseudotypisierung retroviraler Vektoren

Der Zelltropismus retroviraler Vektoren wird durch das virale Hüllprotein (Envelope protein, Env) bestimmt, welches mit einem spezifischen zellulären Rezeptor interagiert und die Aufnahme des Virus in die Zelle vermittelt [45]. In der Gentherapie von Gliomen wurden bisher retrovirale Vektoren mit amphotropem Hüllprotein von MLV (A-MLVenv) eingesetzt [36, 39-41]. Austausch des retroviralen Hüllproteins gegen das Hüllprotein eines anderen (retroviralen oder nicht-retroviralen) Virus wird als Pseudotypisierung bezeichnet. Die Pseudotypisierung retroviraler Vektoren beeinflusst durch eine veränderte Rezeptorbindung den Zelltropismus der Vektoren. Retrovirale Vektoren wurden bereits erfolgreich mit Glykoproteinen des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) [46] und des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV-GP) pseudotypisiert [47, 48]. Der zelluläre Rezeptor für LCMV-GP ist das Membranprotein α -Dystroglycan [49]. Der zelluläre Rezeptor für VSV-G, möglicherweise ein Membranlipid, konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden [50, 51].

3.3.4 Therapeutische Gene

Zwei Hauptgruppen der möglichen therapeutischen Gene in der Gliomtherapie bilden die sogenannten Suizidgene und die immunstimulatorischen Gene. Daneben existiert noch eine Vielzahl weiterer therapeutischer Gene. Beispiele sind antisense-RNA gegen VEGF (vascular endothelial growth factor) [52], welche der Neubildung von Tumervaskulatur entgegenwirken soll, oder das Tumorsuppressorgen *p53*, welches ein fehlendes oder defektes *p53* Gen in Tumorzellen ersetzen soll [53].

3.3.4.1 Suizidgene

Suizidgene codieren Enzyme, welche die Umwandlung nichttoxischer Substrate in zytotoxische Produkte katalysieren. Diese Enzyme kommen natürlicherweise nicht in Säugerzellen vor. In der Tumorthherapie werden Suizidgene in Tumorzellen eingebracht und exprimiert. Das jeweilige nichttoxische Substrat wird nach systemischer Verabreichung in den Tumorzellen metabolisiert, was zum Tod der Zelle führt. Der Gentransfer sollte dabei möglichst spezifisch in Tumorzellen erfolgen, da andernfalls auch gesunde Körperzellen durch die Suizidgentherapie zerstört werden können.

Das meistverwendete Suizidgen in der Gliomgentherapie ist die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSV-TK) [54, 55]. HSV-TK wird dabei in Kombination mit dem Nucleosidanalogen Ganciclovir (GCV) eingesetzt. GCV ist ein Analogon des natürlicherweise in Zellen vorhandenen Nucleosids Desoxyguanosin. HSV-TK phosphoryliert GCV zu GCV-Monophosphat (GCV-P). Dabei hat HSV-TK eine ca. 1000-fach höhere Affinität zu GCV als eukaryotische Thymidikinasen [56]. Phosphoryliertes GCV wird während der DNA Replikation in neusynthetisierte DNA eingebaut. Dies führt zur Schädigung der DNA und zum Tod der Zelle durch Apoptose (Abbildung 3.3) [57, 58].

Zusätzlich wurde im Zusammenhang mit der HSV-TK Suizidgentherapie ein sogenannter „Bystander Effekt“, also die Ausweitung der GCV Toxizität auf umliegende nicht transduzierte Zellen, beobachtet [24]. Eine wichtige Rolle im HSV-TK Bystander Effekt spielen die als Gap Junctions (GJ) bezeichneten Membrankanäle. GJ werden von Connexinen gebildet und verbinden das Zytoplasma zweier benachbarter Zellen. Moleküle <1kDa, wie z.B. Nukleotide und Zucker, können durch GJ in benachbarte Zellen diffundieren [59]. Auch GCV-P diffundiert vermutlich durch GJ aus HSV-TK exprimierenden Zellen in umliegende Zellen und verursacht dort einen Bystander Effekt [60]. *In vivo* trägt wahrscheinlich auch das Immunsystem, stimuliert durch die Expression des Fremdproteins HSV-TK oder durch Apoptose der HSV-TK exprimierenden Zellen, zum Bystander Effekt bei [61].

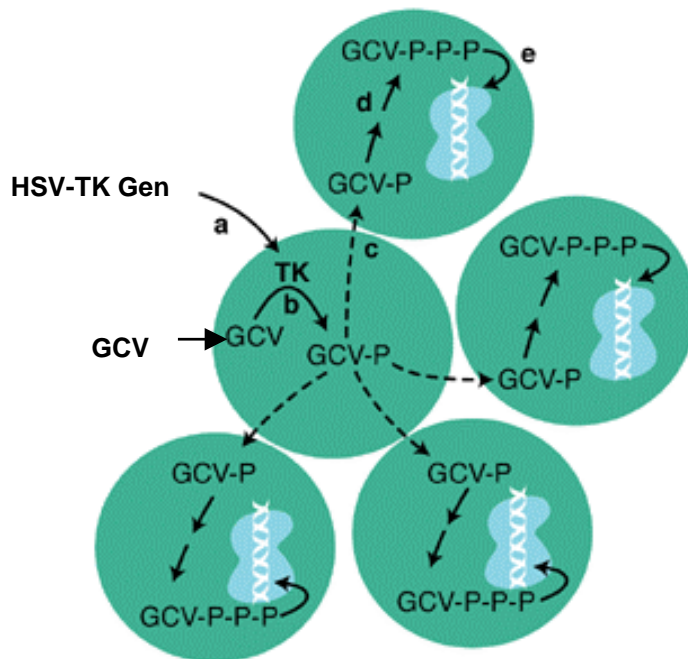


Abbildung 3.3 Mechanismus der HSV-TK Gentherapie. a) HSV-TK wird nach viralem Gentransfer in der Tumorzelle exprimiert. b) Systemisch verabreichtes Ganciclovir dringt in die Tumorzelle ein und wird von HSV-TK zu Ganciclovir-Monophosphat (GCV-P) phosphoryliert. c) GCV-P wird in Nachbarzellen aufgenommen. d) Zelleigene Kinasen katalysieren die Umwandlung von GCV-P zu Ganciclovir-Triphosphat (GCV-P-P-P). e) GCV-P-P-P wird in neu synthetisierte DNA eingebaut, die Zelle begeht Apoptose. Modifiziert nach [62]

3.3.4.2 Immunstimulatorische Gene

Immunstimulatorische Gene sollen eine Immunantwort gegen Gliomzellen provozieren. Im Allgemeinen werden Gliomzellen vom Immunsystem des Patienten toleriert, ein Angriff des Immunsystems auf den Tumor findet nicht statt. Dies ist zum Einen auf die Lokalisation des Glioms in einem immunprivilegierten Gewebe zurückzuführen. Das Gehirn wird von Blut- und Lymphsystem durch die Blut-Hirn-Schranke getrennt, was die Einwanderung von Lymphozyten erschwert. Auch befinden sich kaum dendritischen oder andere antigenpräsentierenden Zellen im ZNS [63]. Zum Anderen sezernieren Gliomzellen typischerweise immunsuppressive Zytokine wie Transforming Growth Factor β (TGF- β) und unterdrücken dadurch aktiv eine mögliche Abstoßung durch das Immunsystem [64].

Transfer von Zytokingenen wie Interleukin 2 (IL2) [65], Interleukin 4 (IL4) [66], [67], Interleukin 12 (IL12) [68] oder RNA komplementär zu TGF- β mRNA (antisense-RNA) in Gliomzellen soll helfen, die Immuntoleranz gegen den Tumor zu brechen und eine wirkungsvolle Tumorabstoßung induzieren. Eine Kombinationstherapie mit immunstimulatorischen Genen und Suizidgenen, wie zum Beispiel HSV-TK mit IL4 [69] oder IL2 [70] scheinen besonders Erfolg versprechend.

3.3.5 Präklinische Studien zur retroviralen Gentherapie von Gliomen

Tierexperimente zur Suizidgentherapie von Gliomen zeigten, dass Injektion von Verpackungszellen im Vergleich zur Vektorinjektion die Transduktionseffizienz stark erhöht, da auf diese Weise eine größere Gesamtmenge an Vektoren über einen längeren Zeitraum hinweg freigesetzt wird [26]. Transfer des HSV-TK Gens in Gliome durch VPC Injektion brachte im Tiermodell sehr gute Erfolge, wobei Abhängig von der Anzahl der injizierten VPC eine komplette Rückbildungen von Gliomen [24, 25, 71] oder eine deutlich verlängerte Überlebenszeit erzielt werden konnte [22]. Folgestudien zeigten, dass Transduktion von nur ca. 10% des Tumorgewebes bereits zu einem Rückgang des Tumorwachstums führt. Dieses Ergebnis ist sehr wahrscheinlich auf den Bystander Effekt der HSV-TK/GCV Therapie zurückzuführen [21, 23-25].

3.3.6 Klinische Studien zur retroviralen Gentherapie von Gliomen

In zahlreichen klinischen Studien zur Gentherapie von Gliomen wurden bereits retrovirale Verpackungszelllinien eingesetzt (Tabelle 3.3). Therapeutische Vektoren trugen das amphotrope Hüllprotein von MLV und transferierten das Suizidgen *hsv-tk*. Ebenso wie im Tiermodell basierten die verwendeten Verpackungszelllinien auf murinen Fibroblastenzelllinien. VPC Injektion erfolgte entweder direkt in den Tumor oder in die Resektionshöhle nach operativer Entfernung des Tumors, um so zurückbleibende Tumorzellen zu eliminieren. Zusammenfassend lässt sich aus diesen klinischen Studien schließen, dass die Applikation retroviraler VPC ausreichend sicher und verträglich für die Patienten war, jedoch in der Mehrzahl der Studien kein signifikanter therapeutischen Effekt erzielt werden konnte. Der geringe Erfolg der ersten klinischen Gentherapiestudien mit retroviralen Vektoren steht in starkem Gegensatz zu den vielversprechenden Erfolgen, die mit ähnlichen Ansätzen im Tiermodell erzielt werden konnten. Eine Hauptursache für die bisherige Ineffizienz der klinischen Gentherapie von Gliomen war sicherlich die extrem geringe Gentransferrate. Harsh et al. bestimmten die Transduktionseffizienz in Gliomgewebe nach intratumoraler VPC Injektion und fanden weniger als 0,002% transduzierte Gliomzellen [72]. Ähnlich niedrige Transduktionsraten fanden Long et al. nach VPC Injektion in den Tumor oder in die Resektionshöhle [73].

Diese vergleichsweise geringen Transduktionsraten in klinischen Studien ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Erstens haben humane Gliome im Allgemeinen eine geringere Proliferationsrate als experimentelle Tumore, was eine effiziente Transduktion

mit retroviralen Vektoren erschwert [74, 75]. Zweitens erreichen humane Gliome im Gegensatz zu Gliomen im Rattenmodell einen Durchmesser von mehreren Zentimetern. Eine ausreichende Durchdringung der Tumormasse mit retroviralen Vektoren bzw. VPC ist dadurch im Patienten nicht mehr gewährleistet [28, 30, 76, 77]. Drittens wachsen humane Gliome anders als experimentelle Gliome typischerweise stark inaktiv [78, 79]. Einzelne Tumorzellen, welche bereits ins gesunde Hirngewebe eingewandert sind, wurden durch die bisher verfolgten Strategien der Vektorapplikation nicht erreicht.

Tabelle 3.3 Klinische Studien zur retroviralen Gentherapie von Gliomen*

Referenz	Klinische Phase	Anzahl der Patienten	VPC-Applikation	Ergebnis
[28]	I	15	Intratumoral	Rückbildung kleinerer, nicht jedoch großer Tumore
[29]	I/II	48	Resektionshöhle	In Einzelfällen verzögertes Tumorwachstum
[80]	I/II	12	Resektionshöhle	
[30]	I	14	Resektionshöhle	Kein signifikanter Unterschied zwischen Gentherapiegruppe und Kontrollgruppe
[22]	III	248	Resektionshöhle	

* Die Tabelle enthält eine unvollständige Auflistung der bis heute durchgeführten Gentherapiestudien mit retroviralen VPC und *hsv-tk* Suizidgen in Gliompatienten.

3.4 Verbesserte Strategien zur Gentherapie von Gliomen

Ergebnisse aus klinischen Studien zur Gentherapie von Gliomen zeigten, dass ein effizienter Gentransfer als erste und wichtigste Voraussetzung gewährleistet sein muss. Verschiedene Strategien zur Steigerung der Effektivität in der retroviralen Gentherapie von Gliomen sind denkbar.

3.4.1 Optimierung der Gentransfervektoren

Historisch bedingt trugen die bisher in klinischen Studien zur Gentherapie von Gliomen verwendeten retroviralen Vektoren das amphotrope Hüllprotein von MLV (A-MLVenv). Infektiösität retroviraler Vektoren kann jedoch durch Pseudotypisierung verbessert werden. So transduzieren sowohl VSV-G als auch LCMV-GP pseudotypisierte retrovirale Vektoren humane Gliomzellen effizienter als amphotrope Vektoren (Abbildung 3.4) [81] [82].

Im Gegensatz zu VSV-G können für LCMV-GP jedoch stabile Verpackungszelllinien etabliert werden [82], da LCMV-GP weniger zytotoxisch wirkt als VSV-G [83] und so konstitutiv in Verpackungszellen exprimiert werden kann.

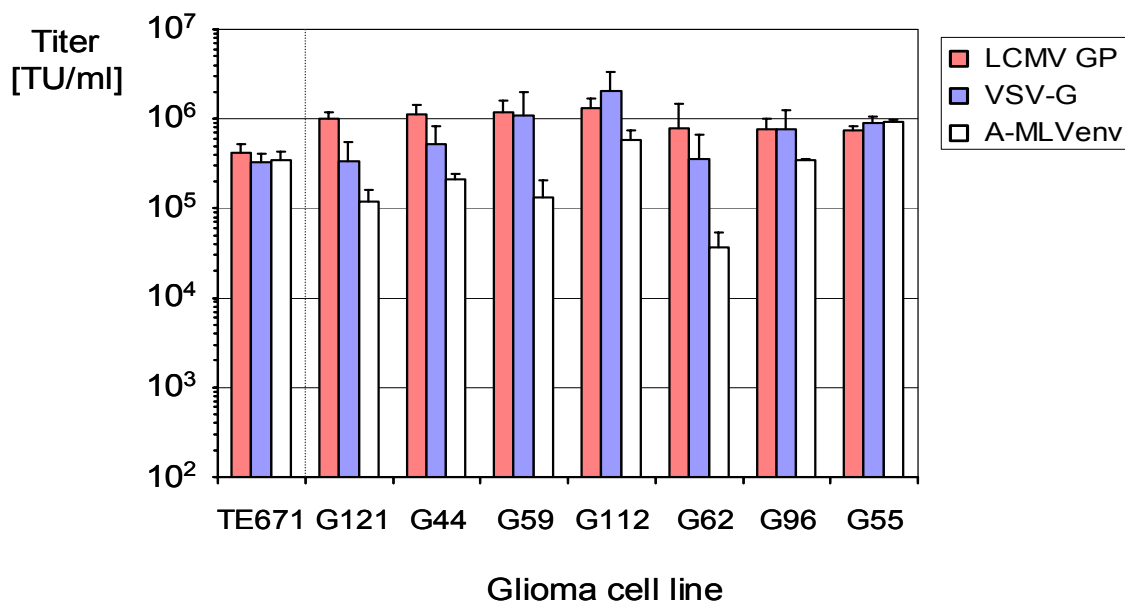


Abbildung 3.4 Transduktion humaner Gliomzellen mit gammaretroviralen Pseudotypvektoren. Humane Gliomzelllinien wurden mit gammaretroviralen Vektoren mit A-MLVenv, VSV-G oder LCMV-GP Hüllprotein transduziert. Die humane Fibroblastenzelllinie TE671, die von den getesteten Vektortypen mit ähnlicher Effizienz transduziert wird, diente als Referenzzelllinie. Modifiziert nach [82]

3.4.2 Optimierung der Vektordistribution

Verpackungszelllinien, die in der Gentherapie von Gliomen zum Einsatz kamen, basierten auf der murinen Fibroblastenlinie NIH 3T3. Nach Injektion in das Hirnparenchym bzw. den Tumor verbleibt diese Zelllinie an der Injektionsstelle und migriert nicht in angrenzendes Tumorgewebe [22, 25]. Zudem diffundieren retrovirale Vektoren nur wenige hundertstel Millimeter weg von der Injektionsstelle [76]. Dadurch bleibt die Distribution der therapeutischen Vektoren weitgehend auf die Injektionsstelle beschränkt, ein Großteil der Tumorzellen wird also selbst mit multiplen VPC Injektionen nicht erreicht. Verwendung migratorischer Verpackungszelllinien, welche eine effiziente Verbreitung des therapeutischen Vektors vermitteln, könnte die Gentransferrate erhöhen und damit den therapeutischen Effekt verbessern.

Die Etablierung von VPC auf Stammzellbasis ist in diesem Zusammenhang besonders vielversprechend. So weisen neurale Stammzellen (NSC) einen gezielten Tropismus für Gliome *in vivo* auf und infiltrieren effizient das Tumorgewebe, ohne in gesundes Hirngewebe vorzudringen (Abbildung 3.5) [3]. Mittlerweile konnte ein spezifischer Tropismus für Gliome auch bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) [84], Endothelvorläuferzellen [85] und hematopoietischen Stammzellen [86] beobachtet werden. Der Einsatz gentechnisch veränderter neuraler oder mesenchymaler Stammzellen, welche Interleukine [4, 68, 84], Suizidgene [3, 87, 88] oder apoptoseinduzierende Liganden [89] exprimierten, führte in tierexperimentellen Studien bereits zu Erfolgen in der Gliomtherapie. Ein weiterer vielversprechender Stammzelltyp sind multipotente adulte Stammzellen (MAPC). Diese werden wie MSC aus Knochenmark isoliert, differenzieren jedoch neben Mesoderm auch zu Ektoderm (Neurone, Gliazellen) und Endoderm (Leberzellen) [6]. MAPC besitzen außerdem eine hohe Selbsterneuerungskapazität und können über mehr als 100 Passagen hinweg in Kultur gehalten werden, ohne dass Seneszenz eintritt. Damit ähneln MAPC in ihrem Wachstums- und Differenzierungsverhalten den embryonalen Stammzellen (ES). Anders als ES sind MAPC aber nicht karzinogen *in vivo*.

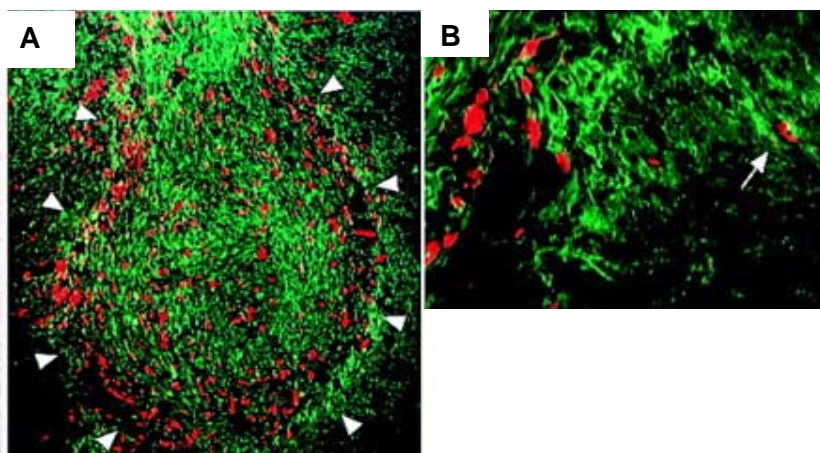


Abbildung 3.5 Tropismus neuraler Stammzellen für intracranielle Gliome. (A) Neurale Stammzellen (rot) infiltrieren Gliomgewebe (grün) *in vivo*, dringen aber nicht in gesundes Hirngewebe vor. (B) Einzelne neurale Stammzellen „folgen“ invasiv wachsenden Gliomzellen. Modifiziert nach [3]

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Humane Gliome können durch konventionelle Therapien nur unzureichend behandelt werden, die Mortalität bei Gliompatienten ist demzufolge sehr hoch. Gentherapie mit retroviralen Vektoren ist eine alternative Strategie zur Behandlung von Gliomen. In bisherigen klinischen Studien zur Gentherapie von Gliomen wurden amphotrope gammaretrovirale Vektoren verwendet, die von murinen Fibroblastenzelllinien produziert wurden [1]. Verpackungszellen wurden hierbei direkt *in situ* appliziert. Der retrovirale Gentransfer war in diesen Studien jedoch ineffizient [72, 73], so dass ein therapeutischer Effekt nicht erzielt werden konnte [22].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Strategien zum effizienteren und gleichzeitig tumorspezifischen Gentransfer in Gliomzellen zu entwickeln. Dies sollte erreicht werden durch:

1. **Verwendung lentiviraler, mit dem Glykoprotein von LCMV (LCMV-GP) pseudotypisierter Vektoren.**

Lentivirale Vektoren transduzieren anders als gammaretrovirale Vektoren auch ruhende Zellen [2]. Dies ermöglicht die effiziente Transduktion von Tumoren mit geringer Zellteilungsaktivität. LCMV-GP wiederum vermittelt einen effizienteren Gentransfer in humane Gliomzellen als das amphotrope Hüllprotein von MLV [82]. Durch Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren mit LCMV-GP sollten daher optimierte Vektoren für die Gentherapie von Gliomen generiert werden.

2. **Etablierung tumorinfiltrierender Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypvektoren.**

Murine Fibroblasten verbleiben *in situ* nahe der Injektionsstelle und vermitteln somit keine ausreichende Vektordistribution [22]. Die effiziente Vektordistribution im Tumorgewebe sollte durch migratorische Verpackungszelllinien ermöglicht werden. Zelllinien mit der Fähigkeit zur tumorspezifischen Migration sollten zunächst identifiziert werden. Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypen sollten danach auf Basis dieser Zelllinien etabliert werden.

Die entwickelten Vektoren bzw. Verpackungszelllinien sollten anschließend *in vitro* sowie *in vivo* bezüglich Effizienz und Spezifität der Transduktion von Gliomzellen getestet werden. Es sollte außerdem getestet werden, ob mit Hilfe der neuartigen Vektoren bzw. Verpackungszelllinien durch Transfer des Suizidgens *hsv-tk* ein therapeutischer Effekt erzielt werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Bestandteile der Nährmedien und Agar zur Anzucht von Bakterien wurden von Difco (Augsburg) und Gibco BRL (Eggenstein) bezogen. Plastikwaren und Filtersysteme wurden von BD (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Costar (Bodenheim), Sarstedt (Nürnbrecht), Corning (Schiphol-Rijkund, Niederlande) Millipore (Eschborn) verwendet. Für die PCR wurden Oligonukleotide MWG Biotech GmbH (Ebersberg) bezogen. Molekulargewichtsmarker und DNA-Restriktionsenzyme sowie deren Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) geliefert. Medien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur wurden von BioWhittaker (Verviers, Belgien), Gibco BRL (Eggenstein), Sigma oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Fötale Kälberserum (FCS) und Horse Serum (HS) stammten von PAN Biotech (Aidenbach). Verwendete *E.coli* Top10 und *E.coli* One-Shot Bakterien wurden von Invitrogen bezogen.

4.1.1 Verwendete Kits

Tabelle 4.1 Kits in der Molekularbiologie

Kit	Firma
Rneasy-Kit zur RNA-Isolierung	Qiagen, Hilden
JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit	Genomed, Löhne
JETquick, Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Löhne
JETquick Plasmid miniprep Spin Kit	Genomed, Löhne
DNeays Genomic DNA Kit	Qiagen, Hilden
Nucleobond AX Maxiprep Kit	Machery&Nagel, Düren
Zero Blunt TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
iQ Sybgreen	BioRad, München

Tabelle 4.2 Kits in der Zellkultur

Kit	Firma
Transfektin	BioRad, München
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Calcium Phosphat Transfektion Kit	Sigma, Taufkirchen
Fix & Perm Zellpermeabilisationskit	Caltag, Hamburg
Vectashield Kit	Vektor Laboratories, Burlingame, USA
WST Reagenz	Roche, Penzberg

4.1.2 Enzyme

Tabelle 4.3 Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Alkalische Shrimp Phosphatase & 10X Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Biotherm Polymerase	NatuTec, Frankfurt
DNA-Ligase & 10 X Ligasepuffer	New England Biolabs
Klenow-Fragment von <i>E.coli</i> DNA-Polymerase	Fermentas, Heidelberg
Reverse Transkriptase, Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
iQ SYBR Green Supermix	Biorad, München
DNA Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
DNAseI	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 4.4 Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

Name	Primer-Sequenz in 5'→3' Richtung
Aktin F	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC
Aktin R	CAA ACA TGAT CTG GGT CAT CTT CTC
Gag_F	CTT CCT AGA GAG ACT TAA GG
Gag_R	GTT GGG ACC TCC TTC GTT CTC
BamHI_GPopt_F	TCG GAT CCG CCA TGG GCC AGA TCG TGA CCA
Sbfl_GPopt_R	TTC CCT GCA GGT TAT CTC CTC TTC CAG ATG GTT T

Name	Primer-Sequenz in 5'→3' Richtung
BglIII_TK_F	TTA AAG ATC TGC CGC CAT GGC TTC GTA CCC CTG CC
AgeI_TK_R	TTA AAC CGG TGG TAA GTT AGC CTC CCC CAT CTC C
TK_R+Stop	TCA GTT AGC CTC CCC CAT CTC
IRES_F	TAA CGT TAC TGG CCG AAG CCG CT
Puro_R_EcoRV	GAT ATC TCA GGC ACC GGG CTT GC
LCMV-GP_F	GCA GCC AGA CCA GCT ACC
LCMV-GP_F	GCT GTT CAC GGT GGT CTT G
A-MLV env 5'_F	TGT AAC CTG GAG AGT CAC CAA C
A-MLV env 5'_R	CTC CGA CCA GAT CAC ATA GAT C
A-MLV env 3'_F	CTG TTT AAT AGA TCC CCC TGG TTT A
A-MLV env 3'_R	GAG CCT GGA CCA CTG AGA TCC TGT
GapDH_F	GATGACATCAAGAAGGTGGTG
GapDH_R	GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC
α -DG/1_F	CGT CAA CTA CCA CAA CTC GAA G
α -DG/1_R	TTG TCA TAG AAG GTG TCT GAT GG
α -DG/2_F	GAT CAC CAG ATT GGA GAC CG
α -DG/2_R	CAA CTG CTG CTC TCG CAG C
α -DG/3_F	ACC AGC GGC CAG AGC TTA AG
α -DG/3_R	CTG AAC CCA AGA TTT CTC ACC

4.1.4 Plasmide

Tabelle 4.5 Verwendete Plasmide (Plasmidkarten siehe Anhang)

Name	Beschreibung	Referenz/Hersteller
M5	Expressionsplasmid für VSV-G mit CMV Promotor und β -Globin Intron	[90]
M23	Klonierungsplasmid mit multiple cloning site (MCS)	Stratagene, Heidelberg
M56a	Gammaretroviraler Vektor mit MP71-Leader und dem Markergen <i>gfp</i>	[91]
M57	MLV Gag-Pol Expressionsplasmid mit SV40 Promotor	[91]
M107	Lentiviraler SIN Vektor mit <i>gfp</i> Markergen und CMV Promotor	[92]

Name	Beschreibung	Referenz/Hersteller
M108	Expressionsplasmid für LCMV-GP WE (HPI) mit CMV Promotor und β -Globin Intron	[82]
M159	Gammaretroviraler Vektor mit MP71-Leader und dem Markergen <i>DsRed1</i>	Dr. N. Dinauer
M242	Expressionsplasmid für MLV Gag-Pol mit EF1- α Promotor und IRES-Blasticidin-Resistenzgen Kasette	[93]
M243	Expressionsplasmid für LCMV-GP mit EF1- α Promotor und IRES-Puromycin-Resistenzgen Kasette	[93], Dr. W.Beyer
M289	Expressionsplasmid mit MCS, β -Globin Intron und CMV-Promotor	Dr. T. Giroglou
M332	Expressionsplasmid für amphotropes MLV Env (pALF-MLVenv)	[43]
M334	Expressionsplasmid für HIV Gag-Pol, Rev (publizierte Bezeichnung: pCMV-dR8.91)	[92]
M335	Plasmid zur Klonierung von Fusionsgenen mit C-terminalem <i>gfp</i> Gen	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
M369	Expressionsvektor für synthetisches, codon-optimiertes LCMV-GP mit EF1- α Promotor und IRES-Puromycin-Resistenzgen Kasette	Geneart GmbH, Regensburg
M377	Gammaretroviraler Vektor mit MP91 leader und MCS	Prof. D.von Laer
M387	Gammaretroviraler Vektor mit MP91 leader, MCS und IRES- <i>gfp</i> Kasette	Prof. D.von Laer
M420	Lentiviraler SIN Vektor mit SFFV Promotor und <i>gfp</i> Markergen	[94]
M429	Gammaretroviraler Vektor mit <i>hsv-tk39/CD34trunc</i> Fusionsgen	Dr. M. Grez

4.1.5 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Lösungen und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Puffer und Nährmedien wurden für 20 Min bei 121°C und 2 bar sterilisiert, bei Hitzeinstabilität steril filtriert oder bereits steril bezogen.

Tabelle 4.5 Lösungen, Puffer und Nährmedien in der Molekularbiologie

Name	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	100mg/ml in Wasser
DNA-Ladepuffer	0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylene, 15% Ficoll Typ 400 in 20ml Wasser
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid in H ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	6 mg/ml in sterilem Wasser
LB-Medium	10g Trypton / Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1000ml H ₂ O und autoklavieren
LB-Ampicillin für Platten	10g Trypton /Peton aus Casein, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, 15g Agar-Agar ad 1000ml H ₂ O, pH 7.0 einstellen und autoklavieren, hinzufügen von 4mg/ml Ampicillin kurz vor gießen der Platten
10x TBE	Tris 540 g, Borsäure 270 g, EDTA (0.5 M) 200ml, H ₂ O ad 5 l, einstellen des pH auf 8.0

Tabelle 4.6 Lösungen, Puffer und Nährmedien in der Zellkultur

Name	Zusammensetzung
0,25% Trypsin / 1 mM EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroquin	25mM in H ₂ O, sterilfiltriert
DMEM C17.2	10% (v/v) Glutamin 5% (v/v) Penicillin/ Streptomycin (100x), 10% (v/v) FCS, 5% (v/v) HS
DMEM standard	10% (v/v) Glutamin 5% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x) , 10% (v/v) FCS
RIPA Puffer	150mM NaCl, 50mM Tris, 1% (v/v) TritonX 100 pH 7,3
RPMI standard	10% (v/v) Glutamin 5% (v/v) Penicillin/ Streptomycin (100x) , 10% (v/v) FCS

Tabelle 4.7 Medium für MAPC

Firma	Katalognummer	Produkt	Endkonzentration
Sigma, Taufkirchen	D2915	Dexamethason	50nM
Sigma, Taufkirchen	A8960	L-Ascorbinsäure-2-PO42	100µM
Sigma, Taufkirchen	L9530	LA-BSA	0,5mg/ml
Sigma, Taufkirchen	A8806	BSA	0,5mg/ml
Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	41400-045	ITS	1x
Sigma, Taufkirchen	M6770	MCDB 201	40%
Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	15140-122	Penicillin/Streptomycin	1x
Pan Biotech, Aidenbach	3302-P211409	FCS	2%
Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	11885-023	DMEM/LG	54%
Sigma, Taufkirchen	E4127	EGF	10ng/ml
Sigma, Taufkirchen	P4056	rhPDGF-BB	10ng/ml
Chemicon, Hofheim/TS	LIF2010	mLIF	1000U/ml

4.1.6 Zelllinien

Zelllinien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Primäre adulte multipotente Stammzellen aus der Wistar Ratte wurden von Dr. H. Neumann (European Neuroscience Institute, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.8 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies	Referenz/ ATCC Nummer	Zellkulturmedium
TE671	Rhabdomyosarkomzelllinie	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CRL-1573	DMEM standard
293T	Embryonale Nierenzelle	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CRL-11268	DMEM standard
C17.2	Neurale Stammzelle	<i>Mus musculus</i>	[95]	DMEM C17.2
9L	Gliosarcomzelllinie	<i>Rattus norvegicus</i>	ATCC CRL-2200	DMEM standard
G62	Glioblastomzelllinie	<i>Homo sapiens</i>	[96]	DMEM standard

Name	Beschreibung	Spezies	Referenz/ ATCC Nummer	Zellkulturmedium
Jurkat	T-Lymphoblast	<i>Homo sapiens</i>	ATCC TIB-152	RPMI standard
Raji	B-Lymphoblast	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CRL-86	RPMI standard
K562	Myeloischer Lymphoblast	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CCL-243	RPMI standard
U937	Monozytäre Zelllinie	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CRL-1593.2	RPMI standard
NIH 3T3	Embryonale Fibroblastenzelllinie	<i>Mus musculus</i>	ATCC CRL-1658	DMEM standard
MAPC	Multipotente adulte Vorläuferzellen	<i>Rattus norvegicus</i>	[6]	MAPC Medium

4.1.7 Antikörper

Tabelle 4.9 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Spezifität	Spezies	Hersteller/Referenz
KL25	LCMV-GP1	Maus	[97]
α -p30	MLV p30	Kaninchen	Dr. C. Stocking (UKE Hamburg)
KL VIA4-1	α -Dystroglycan	Maus	Upstate (Lake Placid, USA)
MAB3068	Connexin 43	Maus	Chemicon (Hofheim/TS)
Sekundäre Antikörper	Spezifität	Markierung	Hersteller/Referenz
Goat- α -Maus-PE	Maus IgG	Phycoerythrin	Caltag (Hamburg)
Goat- α -Maus-PE	Maus IgG	Phycoerythrin	Sigma (Taufkirchen)
Goat-Fab- α -Kaninchen-PE	Kaninchen IgG	Phycoerythrin	Caltag (Hamburg)
Goat- α -Maus-APC	Maus IgG	Allophycocyanin	Caltag (Hamburg)
Goat-Fab- α -Kaninchen-Biotin	Kaninchen IgG	Biotin	Caltag (Hamburg)
Streptavidin-APC	-	Allophycocyanin	BD Pharmingen (Heidelberg)

4.2 Methoden

4.2.1 Gentechnische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

Plasmidtragende *Escherichia coli*-Stämme wurden in mit 100µg/ml Ampicillin versetztem LB-Selektivmedium kultiviert. Einzelkolonien wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit LB-Agar-Medium und Inkubation im Brutschrank bei 37°C erhalten. Zur Konservierung konnten die Platten bei 4°C gelagert werden und waren für mehrere Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendbar. Flüssigkulturen wurden zur dauerhaften Konservierung über Nacht geschüttelt und jeweils 500µl einer Übernachtskultur mit 500µl sterilem 7% DMSO/H₂O gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Identifizierung neuer Transformanden erfolgte die Isolierung von Plasmid DNA im analytischen Maßstab aus einer 2ml-Übernachtskultur. Das verwendete JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit von Genomed ergab dabei in der Regel eine Ausbeute von je 10-20µg Plasmid DNA. Für die Isolierung im präparativen Maßstab wurde eine 250ml Übernachtskultur angesetzt und die Plasmid DNA mit dem Nucleobond AX Maxiprep Kit von Macherey & Nagel isoliert. Beim Maxi Kit betragen die Plasmid DNA Ausbeuten zwischen 500-1000µg. Die Plasmid DNA Lösungen wurden zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

4.2.1.3 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei der Neukonstruktion oder Testung von Plasmiden wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen gespalten. Dabei wurden in der Regel Restriktionsendonucleasen der Firma New England Biolabs verwendet. Die Auswahl des geeigneten Puffers erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Etwa 0.5µg Plasmid DNA wurden zur Restriktionsanalyse eingesetzt, im präparativen Maßstab bis zu 5µg. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25µl, wobei 5 Units der Restriktionsendonuclease eingesetzt wurden. Die Puffer wurden als zehnfach konzentrierte Lösungen hinzugefügt und

die Inkubationszeit betrug je nach Enzymkombination und Verwendungszweck zwischen 1 und 12 Stunden. Bei Bedarf wurden die erhaltenen Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert oder für den Einsatz in Ligationen das Restriktionsenzym bei 65°C hitzeinaktiviert.

4.2.1.4 Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA Enden

Zur Eliminierung von 5'-Phosphatresten an DNA Fragmenten wurde der Restriktionsverdau mit Wasser, 10x Phosphatase-Puffer auf 50µl aufgefüllt und mit Shrimp Alkalischer Phosphatase 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde bei 65°C für 20 Min hitzeinaktiviert. Die so erhaltene DNA konnte sofort für Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

4.2.1.5 Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow-Polymerase

Die nach Behandlung mit Restriktionsenzymen entstandenen überhängenden Einzelstrangenden wurden bei Bedarf mit Hilfe der Klenow-Polymerase in glatte Enden überführt. Dazu wurde 1 Unit des Enzyms DNA Klenow-Polymerase in dem vom Hersteller mitgeliefertem 10x Puffer, 1µl dNTP-Mix (je 1mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) mit 1µg DNA vereinigt. Der Ansatz wurde für 15 Min bei 37°C inkubiert. Die Klenow-Polymerase wurde für 20 min bei 75°C hitzeinaktiviert und die DNA konnte anschließend für die weitere Klonierung verwendet werden.

4.2.1.6 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen mit TBE oder TAE als Laufpuffer. Standardmäßig wurden dabei 1%ige Agarosegele eingesetzt. Sind die zu untersuchenden Fragmente kleiner als 500 bp, so wurden höherprozentige Gele mit bis zu 2% Agarose eingesetzt. Waren die Fragmente deutlich größer, so wurden 0.5-0.8%ige Gele verwendet. Die gewünschte Menge an Agarose wurde mit TBE- bzw. TAE-Puffer in der MikroWelle erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Dann wurde 1/1000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1% w/v in Wasser) zugegeben und die Flüssigkeit in die Gelkammer mit einem Geltaschenformer gegossen. Nach Erstarrung des Agarose-Gels wurde der Geltaschenformer entfernt und das Gel in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer

gelegt.

Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurden 0.5µg 100-Basenpaarmarker oder 1-kb-Marker verwendet (New England Biolabs). Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 100 Volt für die Dauer von 20 Min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Sofern erforderlich wurden gewünschte Fragmente ausgeschnitten und isoliert (siehe 4.2.1.7).

4.2.1.7 Isolierung von DNA aus Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die für die Klonierung gewünschten Banden aus dem Gel isoliert. Dazu wurde die Bande mit einem Skalpell vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung wurde das Jetquick Gel Extraction Kit von Genomed verwendet. Die erhaltene DNA konnte direkt für weitere Klonierungen, Restriktionsanalysen und Sequenzierungen verwendet werden.

4.2.1.8 Gesamt RNA Isolierung aus Zellen

Gesamte zelluläre RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Adhärente Zellen wurden trypsinisiert (siehe 4.2.2.1), 5×10^5 Zellen wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß pelletiert und mit 350µl RLT Puffer lysiert oder bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Lysate wurden laut dem RNeasy Protokoll aufgearbeitet. RNA wurde in 50µl H_2O eluiert. Die RNA Konzentration der Eluate wurde anschließend anhand der Absorption der Lösung bei 260nm photometrisch bestimmt. Um DNA-Kontaminationen zu beseitigen wurden 50ng gesamt RNA mit 1Unit DNaseI für 7 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Inaktivierung der DNaseI erfolgte bei 65°C für 15 Min. Die isolierte RNA konnte nun zur reversen Transkription verwendet werden.

4.2.1.9 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe einer thermostabilen reversen Transkriptase (RT). Für die RT-Reaktion wurden standardmäßig 20ng RNA eingesetzt. Als Primer wurde ein Gemisch von Oligo-Hexamerprimern mit zufallsbedingten Sequenzen (Random-Primer) eingesetzt. Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

- 1 μ l dNTPs (10mM)
- 1 μ l Random-Primer (250nM)
- 5 μ l gesamt RNA (1 μ g)
- 5 μ l H₂O

bei 65°C 5 Min inkubieren

-
- 4 μ l Superscript Puffer

- 1 μ l RNaseOut

- 2 μ l 0,1 M DTT

10 Min bei Raumtemperatur inkubieren

-
- 1 μ l Superscript zugeben

60 Min bei 37°C inkubieren

4.2.1.10 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Genomische DNA aus Zellen wurde mit dem Qiagen DNeasy Kit isoliert. Es wurden hierfür 5×10^5 - 5×10^6 Zellen pelletiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. DNA Extraktion erfolgte nach Anleitung. DNA wurde anschließend in 100 μ l H₂O eluiert. Die DNA-Konzentration der Eluate wurde anschließend anhand der Absorption der Lösung bei 260nm photometrisch bestimmt.

4.2.1.11 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von Genen oder Genbereichen verwendet [98]. Dabei wurden jeweils zwei gegenläufige Oligodesoxynukleotide im Überschuss eingesetzt, die etwa 20 Basenpaare der Zielsequenz flankierten. Die Reaktion wurde zu präparativen Zwecken mit der Pfx-DNA-Polymerase durchgeführt, die aufgrund ihrer Proofreading-Aktivität eine sehr geringe Fehlerrate besitzt und DNA mit glatten Enden (blunt ends) bildet. Analytische PCRs wurden mit der Biotherm-Polymerase durchgeführt.

Die folgenden Komponenten wurden in einer Standard-PCR in ein 200 μ l PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

	PFX-Polymerase	Biotherm-Polymerase
10x Amplifikationspuffer	5µl	5µl
50 mM MgSO ₄	1,5µl	Im Puffer enthalten
dNTP-Lösung (10mM ATP, GTP, CTP, TTP)	1,0µl	1,0µl
Forwardprimer (10µM)	1,0µl	1,0µl
Reverseprimer (10µM)	1,0µl	1,0µl
Polymerase	0,5µl (2,5 U/µl)	0,25µl (1,2U/µl)
Wasser auf 48µl	37,5µl	40,7 µl
CDNA	2,0µl	1µl
Gesamt	50µl	50µl

Standardprogramm für präparative PCR mit PFX-Polymerase:

93°C	3 Min	Denaturierung	
93°C	30s	Denaturierung	30x
55°C	30s	Annealing	
68°C	1 Min	Elongation	
68°C	3 Min	Vervollständigung	

Standardprogramm für analytische PCR mit Biotherm-Polymerase:

93°C	3 Min	Denaturierung	
93°C	30s	Denaturierung	40x
55°C	30s	Annealing	
72°C	1 Min	Elongation	
72°C	3 Min	Vervollständigung	

Die Annealing-Temperatur wurde für jede PCR in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer zwischen 53°C und 65°C gewählt. Dabei wurde die Temperatur für jeden verwendeten Primer nach folgender Formel berechnet, wobei G, C, A und T die Häufigkeit der entsprechenden Nukleotide im Primer angibt:

$$T_m = 4 \times (G \text{ oder } C) + 2 \times (A \text{ oder } T)$$

Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Produktgröße gewählt und betrug 1 Min pro Kilobase. Die Aufreinigung des PCR Produktes erfolgte, falls nötig, mit dem JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit nach Herstelleranweisung.

4.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25µl mit 2,5µl vom Hersteller mitgelieferten 10x Ligase-Puffer und 1µl T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C. Für die Ligation wurden etwa 200ng des geschnittenen Plasmids und ein etwa dreifacher Überschuss des Inserts eingesetzt. Je 10µl des Reaktionsansatzes und eine Kontrolle ohne Insert wurden zur Transformation von *E. coli* verwendet. Nach 12-14 Stunden waren die Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von kleinen Minikulturen mit je 2ml LB-Medium eingesetzt werden.

4.2.1.13 Ligation von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren

PCR Produkte mit blunt ends nach Amplifikation mit der Pfx Polymerase wurden in den Topo Zero Blunt Vektor ligiert. Das Protokoll erfolgte weitgehend nach der Gebrauchsanweisung des Topo Zero Blunt Cloning Kit. Der mit dem Kit mitgelieferte Vektor ist bereits geschnitten und trägt an beiden Enden das Enzym Topoisomerase, das eine effiziente und schnelle Insertion des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistet. Nach Inkubation wurden die Ligationsprodukte in *E. coli* One-Shot Bakterien transformiert und auf einer LB-Agarplatte, versetzt mit Kanamycin, ausplattiert. Nach 12-14 Stunden waren die Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von kleinen Minikulturen mit je 2ml LB-Medium eingesetzt werden.

4.2.1.14 Herstellung kompetenter Bakterien aus *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* mit Ligationsprodukten oder Plasmiden wurden zunächst kompetente Bakterien hergestellt. Hierfür wurde 2ml einer Übernachtskultur von *E. coli* zum Animpfen einer 200ml-Kultur verwendet und bis zu einer $OD_{600}=0.5-0.7$ herangezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren mit 20ml kalter 0.1M $MgCl_2$ -Lösung, wurden die

Zellen erneut für 10 Min bei 4°C zentrifugiert, in 20ml 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 10 Min bei 4°C pelletiert und in 2ml 50mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 20µl in Eppendorf-Gefäße verteilt und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Die Zellen hatten in der Regel eine Kompetenz von etwa 5×10^5 bis 1×10^6 Kolonien/µg DNA.

4.2.1.15 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Ligationsprodukte oder Plasmide wurden in *E. coli* transformiert. 50µl der kompetenten *E. coli* Top10 Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 10µl Ligationsansatz beziehungsweise 50ng Plasmid hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 Min auf Eis inkubiert und anschließend für 2 Min im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 500µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 45min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 8000 U/Min abzentrifugiert und 450µl Überstand verworfen. Im Restvolumen wurden die Zellen resuspendiert und auf einer LB-Platte versetzt mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach 12-14 Stunden wurden die einzelnen Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von Minikulturen (2ml) verwendet werden.

4.2.1.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Ursula Dietrich) auf einem 3100 Avant Genetic Analyzer durchgeführt. Die Methode erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. [99]. Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 10µl DNA-Lösung verwendet und mit 1µl 10µM Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0.5 bis 1µg Plasmid-DNA in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 15µl (~ 0,5µg) des aufgereinigten PCR-Ansatzes mit 1µl einer 10µM Primerlösung versetzt.

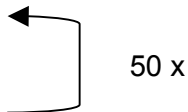
4.2.1.17 Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) diente der quantitativen Bestimmung der Menge an α -Dystroglycan Transkripten innerhalb einer cDNA-Probe. Die Quantifizierung erfolgte dabei relativ zum Referenzgen Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GapDH). Die Menge des gebildeten DNA-Amplifikats wird durch Zunahme der Fluoreszenz bei Einlagerung von Sybrgreen in die doppelsträngige DNA gemessen. Der Amplifikationszyklus, bei dem die Bildung eines Amplifikates detektierbar wird, wird C_T Wert genannt und korreliert mit der Kopienzahl des jeweiligen Transkriptes innerhalb der Probe. qPCR wurde mit Hilfe eines iCyclers von BioRad und unter Verwendung des iQ Sybrgreen Mix durchgeführt. Für die qPCR wurde cDNA (Abschnitt 4.2.1.9) 1:5 verdünnt mit H_2O eingesetzt. Quantifizierung der α -DG Expression wurde mit drei α -DG-spezifischen Primerpaaren und einem Primerpaar spezifisch für GapDH durchgeführt. Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4.4 angegeben. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen, wozu folgender Ansatz pipettiert wurde:

3x je Probe :

6,5 μ l H_2O
12,5 μ l 2x iQ Sybergreen
0,5 μ l Primer forward
0,5 μ l Primer reverse
5 μ l cDNA

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem 3-Schritt-Protokoll durchgeführt:

180s 95°C	Denaturierung + Aktivierung der Polymerase	
30s 95°C	Denaturierung	
30s 58°C	Annealing	
30s 72°C	Elongation	

Nach der Amplifikation wurde eine Schmelzpunktbestimmung durchgeführt, indem die Temperatur in 0,5°C Schritten von 50°C ausgehend erhöht wurde. Dabei denaturiert die amplifizierte DNA und eingelagertes Sybrgreen wird freigesetzt. Die Erniedrigung der

Fluoreszenz in der Probe zeigt den Schmelzpunkt des amplifizierten DNA-Fragments an. Damit können auch eventuelle Nebenprodukte identifiziert werden.

Die Bestimmung der C_T -Werte erfolgte mit der iCycler Software. Die Quantifizierung der Expression von α -Dystroglycan im Verhältnis zum Referenzgen GapDH wurde mit der q-gene96 Excel-Matrix [100] durchgeführt.

4.2.2 Zellkulturmethoden

4.2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert. Zellen wurden mit in Tabelle 4.8 aufgeführten Medien kultiviert. MAPC wurden in Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen bzw. Flaschen gehalten. Alle 2 bis 5 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:30 gesplittet. Bei adhären wachsenden Zellen wurde dazu das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Bei Suspensionszellen wurde eine entsprechende Menge der Suspensionskultur entnommen und versetzt mit frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche weiterkultiviert.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in FCS mit 10% DMSO bzw., im Falle der MAPC, in 50% FCS, 40% MAPC Medium, 10% DMSO. Zum Einlagern wurden mindestens 5×10^5 Zellen nach dem trypsinieren bei 1500U/min 5min abzentrifugiert, in 1ml FCS/10% DMSO aufgenommen und in ein 2ml Cryogefäß überführt. Die Zellen wurden in einem Einfriergerät langsam auf $-80^\circ C$ abgekühlt und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei $37^\circ C$ schnell erwärmt und in 5 bis 10ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in frischem und vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche bzw. Schale überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurden 100 μ l der Zellsuspension in 10ml Casyton verdünnt und mit dem Zellzählgerät CASY TT vermessen.

4.2.2.2 Stabile Transfektion von C17.2

Zur stabilen Transfektion von C17.2 neuronalen Stammzellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 verwendet. DNA komplexiert mit den in Lipofektamin 2000 enthaltenen polykationischen Lipiden und kann aufgrund der lipophilen Eigenschaften des Reagenz in die Zelle aufgenommen werden. Am Tag vor der Transfektion wurden 5×10^4 C17.2 Zellen in 24-Well Platten in Medium ohne Penicillin/Streptomycin ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde für jedes Well eine Lösung A mit $1 \mu\text{g}$ DNA in $50 \mu\text{l}$ DMEM ohne Zusätze und eine Lösung B mit $1,5 \mu\text{l}$ Lipofektamin 2000 in $50 \mu\text{l}$ DMEM ohne Zusätze angesetzt. Lösungen A und B wurden gemischt und für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend auf die Zellen pipettiert. Zellen wurden für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert, Medium wurde abgenommen und frisches DMEM mit Serum und Penicillin/Streptomycin zugegeben. Zwei Tage nach Transfektion wurden Zellen trypsinisiert, in 6-Well Platten expandiert und in Anwesenheit von Selektionsmedium kultiviert. Selektionsmedium enthielt $5 \mu\text{g/ml}$ Blasticidin (zur Selektion nach Transfektion mit M242) bzw. $5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin (Zur Selektion nach Transfektion mit M533). Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert wobei alle 3-5 Tage frisches Selektionsmedium zugegeben wurde. Heranwachsende Klone wurden trypsinisiert und zu Klonpools vereinigt.

4.2.2.3 Stabile Transfektion von MAPC

Zur stabilen Transfektion der MAPC wurde das Transfektionsreagenz Transfektin verwendet, welches wie Lipofektamin 2000 aus polykationisches Lipiden besteht. Zwei Tage vor der Transfektion wurden 1×10^3 Zellen/Well in 24-Well Platten in 500ml MAPC Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und MAPC Medium ohne Penicillin und Streptomycin zugegeben. Am darauffolgenden Tag wurde die Transfektion vorgenommen. Es wurden für jedes Well zunächst eine Lösung A mit $1 \mu\text{l}$ Transfektin in $50 \mu\text{l}$ DMEM ohne Zusätze sowie eine Lösung B mit $1 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA in $50 \mu\text{l}$ DMEM ohne Zusätze angesetzt. Lösungen A und B wurden gemischt und 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde auf die Zellen pipettiert und nach 6h Inkubation im Brutschrank wurde erneut das Medium gewechselt. Nach 48h wurden die transfizierten Zellen in 10cm Schalen umgesetzt und in Anwesenheit von Selektionsmedium kultiviert. Selektionsmedium enthielt $5 \mu\text{g/ml}$ Blasticidin (zur Selektion nach Transfektion mit M242) bzw. $3-5 \mu\text{g/ml}$ Puromycin (zur Selektion nach Transfektion mit M533). Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert wobei alle 3-5 Tage frisches Selektionsmedium zugegeben wurde. Heranwachsende Klone wurden entweder trypsinisiert und zu Klonpools vereinigt oder mittels

steriler Wattestäbchen gepickt und in 24-Well Platten überführt. Klone wurden weiter in Selektionsmedium kultiviert.

4.2.2.4 Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren

Gammaretrovirale und lentivirale Vektoren wurden durch transiente Transfektion mit einem Calciumphosphat Transfektionskit in der Zelllinie 293T produziert. Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion 6×10^6 Zellen in einer 10cm Petrischale in DMEM standard ausplattiert. Kurz vor der Transfektion wurde am nächsten Tag das Medium mit Chloroquin versetzt (Endkonzentration $25 \mu\text{M}$). In ein 1,5ml Reaktionsgefäß wurde folgender Transfektionsansatz pipettiert:

Plasmid	Lentivirale Vektoren	Gammaretrovirale Vektoren	Menge
Gag-Pol Expressionsplamid	M334	M57, M242	12,5 μg
Vektor Plasmid	M107, M566, M488	M56a, M508, M567	7,5 μg
Env Expressionsplamid	M108, M243, M5	M108, M243, M5	2 μg
CaCl ₂			50 μl
H ₂ O			ad 500 μl

Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise zu 500 μl HEPES-Puffer unter ständigem Vortexen gegeben. Die Lösung wurde für 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 6 bis 8 Stunden mit dem DNA-Präzipitat inkubiert und anschließend das Medium mit 6ml frischem DMEM standard ohne Chloroquin ersetzt. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden 36 und 48 Stunden nach Transfektion abgenommen. Die Überstände wurden durch 0,45 μm Filter filtriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.2.2.5 Konzentration lentiviraler Überstände in der Ultrazentrifuge

Lentivirale Vektorüberstände wurden in sterile Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit jeweils 5ml 30%iger Sucrose-Lösung in PBS unterschichtet. Vektoren wurden bei 19,500 U/Min in einem SW 32Ti Rotor (Beckmann, München) für 2,5h bei 4°C abzentrifugiert. Vektoren wurden in ca. 1% des Ausgangsvolumens resuspendiert, so dass eine ca. 100-fache Konzentration erreicht wurde. Die Resuspension erfolgte in DMEM standard bei 4°C

für 6-12 Stunden auf dem Schüttler. Konzentrierte Vektorüberstände wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.2.2.6 Transduktion von Zellen mit retroviralen Überständen

In eine 24-Well-Platte wurden je 5×10^3 - 5×10^4 der zu transduzierenden Zellen pro Well in 1ml Medium ausgesät und mindestens 4 Stunden inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und durch virushaltige Zellkulturüberstände ersetzt. Die Platten wurden 1h bei 2000 U/min und 31°C zentrifugiert. Nach 6-12h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei Bedarf wurde die Transduktion mehrfach wiederholt. Transduzierte Zellen wurden frühestens 48h nach Transduktion auf Expression des transferierten Gens im FACS getestet (siehe 4.2.2.10) bzw. mit Selektionsmedium versehen. Zur Isolation von Klonen wurden die Zellen nach Transduktion trypsiniert und jeweils 0,5 Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät.

4.2.2.7 Titration retroviraler Überstände aus transienter Produktion in 293T Zellen

Zur Bestimmung des Titers von gammaretroviralen oder lentiviralen Zellkulturüberständen von 293T Zellen wurde die Indikatorzelllinie TE671 mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Von den Zellkulturüberständen wurde eine Verdünnungsreihe in jeweils 10-fachen Verdünnungen bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 hergestellt. Es wurde je 0,5ml/Well der verdünnten Überstände für die Transduktion von TE671 eingesetzt. Die Titrationsen erfolgten in Doppelbestimmung. Nach Zugabe der Überstände zu TE671 Zellen wurden die 24-Well Platten bei 2000 U/min für eine Stunde bei 31°C zentrifugiert und anschließend unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Der Prozentsatz der transduzierten Zellen wurde 3 Tage später durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurde entweder eine Antikörper-Färbung vorgenommen oder, im Falle einer Expression von GFP oder DsRed, direkt die Fluoreszenz der Zellen bestimmt (siehe 4.2.2.10). Die Berechnung des Vektortiters erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{TU/ml} = \text{Verdünnung} \times 5 \times 10^4 \times (\% \text{ transduzierte Zellen}/100)$$

4.2.2.8 Titration retroviraler Überstände von stabilen Verpackungszellen

Zur Überprüfung der Vektorproduktion in C17.2 und MAPC Verpackungszellen wurden C17.2 und MAPC zu 5×10^4 Zellen/Well in 6-Well Platten in 2ml Medium ohne Selektionsantibiotika ausgesät. TE671 Zellen wurden zu 5×10^4 Zellen/Well in 24-Well Platten ausgesät. Zellen wurden über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden Überstände von den Verpackungszellen abgenommen und durch $0,45 \mu\text{m}$ -Filter filtriert. Jeweils 0,5ml Überstand wurde unverdünnt auf TE617 Zellen gegeben. Transduktion und Berechnung der Titer erfolgte wie unter 4.2.2.7 beschrieben.

4.2.2.9 PCR-basierter RCR Test

Zur Testung auf Anwesenheit replikationskompetenter Retroviren in Zellkulturüberständen wurden die murine Fibroblastenlinie NIH 3T3 und die humane Fibroblastenlinie TE671 als Indikatorzellen verwendet. Zu testende Überstände wurden abgenommen und zur Transduktion von 3T3 oder TE617 Zellen verwendet (jeweils 0,5ml Überstand pro 5×10^4 Indikatorzellen). Indikatorzellen wurden anschließend für 5-10 Tage kultiviert, um evtl. vorhandene RCR zu amplifizieren. Überstände wurden dann auf frische Indikatorzellen transferiert. Nach 2-3 Tagen wurden transduzierte Indikatorzellen pelletiert und genomische DNA wurde isoliert (Abschnitt 4.2.1.10). PCR Nachweis erfolgte mittels analytischer PCR (Abschnitt 4.2.1.11) mit einer Kombination von Primern (Tabelle 4.4) zur spezifischen Amplifikation von MLV Gag, amphotropem MLV Env oder LCMV-GP.

4.2.2.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer Eigenschaften einzelner Zellen. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln mittels eines Laserstrahls detektiert. Basierend auf ihren Streulichteigenschaften werden simultan Zellgröße und Granularität jeder einzelnen Zelle gemessen. Nach Färbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper oder durch Expression fluoreszierender Proteine können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Höhe der Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen Zahl der Moleküle des Fluorochroms oder der Bindungsstellen für den fluoreszenzmarkierten Antikörper.

Extrazelluläre FACS Färbung von LCMV-GP

Für jede Probe wurden 2×10^5 - 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Die Zellen wurden mit PBS, 3% Formaldehyd für 5 Min bei RT fixiert und anschließend mit 2ml PBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1200 U/Min, 5 Min wurden die Zellen in 50µl PBS resuspendiert. Es wurden nun 100µl des Primärantikörpers KL25 in einer 1:20 Verdünnung in PBS, 3% FCS zugegeben. Die Zellen wurden 60 Min bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Um den überschüssigen und ungebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und 5 Min bei 1200 U/Min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden 100µl des PE-conjugierten sekundären Antikörpers Goat- α -Maus in einer 1:20 Verdünnung in PBS, 3% FCS zugegeben. Nach 30 Min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und 5 Min bei 1200 U/Min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 2x wiederholt. Die Zellen wurden zuletzt in 300µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen.

Intrazelluläre FACS Färbung von MLV Gag

Für die intrazelluläre Färbung der Zellen wurden für jede Probe 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Zellpellets wurden in 50-100µl der Lösung A des Fix&Perm Kits (Caltag) resuspendiert und 5 Min bei RT inkubiert, was die Fixierung der Zellen bewirkte. Zellen wurden anschließend mit 2ml PBS gewaschen und bei 1200 U/min für 5 Min zentrifugiert. Zellpellets wurden in 50-100µl der Lösung B des Fix&Perm Kits resuspendiert und 5 Min bei RT inkubiert, was zur Permeabilisierung der Zellmembranen führte. Die Zellen wurden anschließend mit 2ml PBS gewaschen, 1200 U/Min für 5 Min zentrifugiert und in 50ul PBS resuspendiert. Die Färbung mit 100µl des Primärantikörpers α -Gag p30, verdünnt 1:25 in PBS, 3% FCS erfolgte nun für 60 Min bei 4°C. Die Zellen wurden mit 2ml PBS gewaschen und 5 Min bei 1200U/Min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden 100µl des PE-conjugierten sekundären Antikörpers Fab- α -Rabbit in einer 1:50 Verdünnung in PBS, 3% FCS zugegeben. Nach 30 Min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und 5 Min bei 1200 U/Min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 2x wiederholt. Die Zellen wurden zuletzt in 300µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen.

4.2.2.11 FACS-Sortierung

Die Zellseparation mittels FACS-Sortierung diente der Anreicherung von GFP-exprimierenden Zellen, sofern diese keinen Selektionsmarker koexprimierten. In ein steriles FACS-Röhrchen wurden etwa 1×10^7 Zellen in 1ml sterilem PBS pipettiert. Das FACS-Calibur Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde für 30 Min mit 70% Ethanol sterilisiert und anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Während des Sortiervorgangs wurde die Frequenz unter 1000 Zellen pro Sekunde belassen. Direkt nach dem Sortieren wurde ein Teil der Zellen für die Reanalyse verwendet und die Effizienz der Sortierung überprüft. In der Regel betrug die Reinheit der sortierten Zellen >95 %.

4.2.2.12 Immunfluoreszenz zum Nachweis von Connexin 43

Zum Nachweis von endogenem Connexin 43 in den Gliomzelllinien G62 und 9L wurden die Zellen zu 2×10^4 Zellen/Well in 8-Well Objektträger ausgesät und inkubiert. Wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten wurden sie mit Aceton (-20°C) bei RT für 10 Min fixiert. Anschließend wurde ein Blockierungsschritt mit 5% Milchpulver in PBS für 1h bei RT durchgeführt. Der Primärantikörper MAB 3068 wurde dann 1:100 in PBS verdünnt und je $200\mu\text{l}$ /Well wurden zum Färben der Zellen verwendet. Als Negativkontrolle wurde in jeweils ein Well nur PBS ohne MAB 3068 pipettiert. Die Zellen wurden 1h bei 37°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen wurden Zellen 3x schnell und anschließend 3x über jeweils 10 Min mit $200\mu\text{l}$ PBS/Well gewaschen. Der Sekundärantikörper α -Maus-PE (Sigma) wurde 1:50 in PBS verdünnt und zu $200\mu\text{l}$ /Well zur Färbung der Zellen verwendet. Nach Inkubation bei 37°C für 1h wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden dann mit dem VectaShield Kit eingedeckt und im konfokalen Mikroskop (Leica, Wetzlar) analysiert.

4.2.2.13 Colorimetrischer Test der HSV-TK Zytotoxizität

Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) exprimierende Zellen wurden allein oder gemischt mit nativen Zellen in unterschiedlichen Mischverhältnissen in 96-Well-Platten ausgesät. Die Gesamtzellzahl pro Well betrug 1×10^3 - 1×10^4 Zellen/Well in $100\mu\text{l}$ Medium. Nach vierstündiger Inkubation wurde $100\mu\text{l}$ GCV-haltiges Medium in Konzentrationen zwischen 1nM und 1mM zugegeben. Zellen wurden anschließend für 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zytotoxizität von GCV wurde dann anhand eines WST

Tests bestimmt. Das Medium wurde von den 96-Well Platten abgenommen und durch 100µl frisches Medium, versetzt mit 10µl WST Reagenz, ersetzt. Das WST Reagenz dient in diesem Versuchsaufbau als Substrat, welches von zellulären Enzymen zum Farbstoff Formazan umgewandelt wird. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist dabei proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen zum Zeitpunkt des WST Tests. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption der einzelnen Wells bei 450nm bestimmt.

4.2.2.14 Fluorimetrischer Test des HSV-TK Bystander Effekts

Um den Bystander Effekt von HSV-TK-exprimierenden MAPC auf HSV-TK negative humane und Rattengliomzellen zu bestimmen wurde ein fluoreszenzbasierter Versuchsaufbau verwendet. HSV-TK-exprimierende MAPC wurden allein oder gemischt mit rotfluoreszierenden Gliomzellen in unterschiedlichen Mischverhältnissen in 96-Well-Platten ausgesät. Insgesamt wurden 1×10^4 Zellen/Well in 100µl DMEM mit 5% FCS ausgesät. Nach vierstündiger Inkubation wurde 100µl GCV-haltiges Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die 96-Well Platte wurden einmal mit 100µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann lysiert durch Zugabe von 100µl RIPA Puffer. Die Fluoreszenzintensität der Lysate wurde anschließend mittels eines Fluorostar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg) Fluoreszenzmessgerätes bestimmt, wobei die Fluoreszenzintensität proportional war zur Anzahl der lebenden Gliomzellen zum Zeitpunkt der Lyse.

4.2.2.15 Kultivierung und Transduktion primärer Hirnzellen

Versuche mit primären Hirnzellen wurden in Kooperation mit Prof. Harald Neumann, Universität Bonn und Dr. Hrvoje Miletic, Universität Köln durchgeführt. Neurone und Astrozyten wurden aus Hippocampi von 16 Tage alten Embryonen der Wistar Ratte isoliert. Zellen wurden zu 5×10^4 /ml in 4-Well Objektträger, die zuvor mit Poly-L-Ornithin beschichtet worden waren, ausgesät. Kulturmedium für Neurone bestand aus BME (basal medium Eagle) mit 2% B27 Supplement und 1% Glucose kultiviert. Astrozyten wurden in Poly-L-Lysin-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. Kulturmedium für Astrozyten bestand aus MEM (minimal essential medium) mit D-Valin, 10% FCS und 1% L-Glutamin. Nach 10-20 Tagen in Kultur wurden Astrozyten in 4-Well Objektträger zu 2×10^4 Zellen/ml in BME mit 2% B27 Supplement und 1% Glucose ausgesät. Vierzehn Tage nach dem Aussäen in Objektträger wurden Neurone und Astrozyten mit lentiviralen LCMV-GP oder VSV-G

Pseudotypvektoren mit GFP Transgen transduziert. Zwei Tage nach Transduktion wurden Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen Tubulin III (Neurone) oder GFAP (Astrozyten) gefärbt. Die Anzahl der transduzierten Neurone und Astrozyten wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) durch Auszählung von 10 Kamerafeldern für jeden Pseudotyp und Zelltyp bestimmt.

4.2.3 Tierexperimente

Sämtliche Tierexperimente wurden in Kooperation mit Dr. Hrvoje Miletic, Universität Köln durchgeführt.

9L Gliome wurden durch stereotaktische Injektion von 6×10^4 - 1×10^5 9L-DsRed Zellen in das rechte Striatum von Fischer Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) etabliert. Ratten wurden zuvor durch i.p. Injektion von Ketamin (50mg/kg) und Xylazin (2mg/kg) anästhesiert. Zellen oder lentivirale Vektoren wurde 5-6 Tage nach 9L-DsRed Injektion in die Gehirne von Fischer Ratten injiziert. Dabei wurden die selben stereotaktischen Koordination wie zur Etablierung der Tumore verwendet. Nach Beendigung des Versuchs wurden Ratten getötet und mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. G62 Tumore wurden durch stereotaktische Injektion von 1×10^5 G62-DsRed Zellen in das rechte Striatum von Nacktmäusen (Stamm HsdCpb:NMRI-nu/nu, Harlan Winkelmann, Borcheln) etabliert. Mäuse wurden zuvor durch i.p. Injektion von Ketamin (50mg/kg) und Xylazin (2mg/kg) anästhesiert. Nach Beendigung des Versuchs wurden Mäuse getötet und wie Ratten mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Gehirne von Ratten bzw. Mäusen wurden entnommen und 12 μ M dicke Gefrierschnitte wurden angefertigt.

4.2.3.1 Studien mit lentiviralen Vektoren *in vivo*

Sechs Tage nach Injektion von 1×10^5 9L-DsRed Zellen wurden 10 μ l des konzentrierten lentiviralen Vektorüberstands (Abschnitt 4.2.2.5) injiziert. Insgesamt wurden 7 Injektionen pro Tumor durchgeführt. Injektion erfolgte unter Verwendung der selben stereotaktische Koordinaten wie für 9L-DsRed Injektion und zusätzlich in 1mm Abstand zur Injektionsstelle von 9L-DsRed. Im Falle der Injektion von lentiviralen Vektoren mit *gfp* Transgen wurden Ratten 7 Tage nach Vektorinjektion getötet und Gehirne aufgearbeitet. Auswertung erfolgte unter dem konfokalen Mikroskop (Leica, Bensheim). Im Falle der Injektion von lentiviralen Vektoren mit *hsv-tk* Transgen wurde ab Tag 4 nach Vektorinjektion GCV (30mg/kg) an 10

aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert. Überleben der Ratten wurde über 100 Tage hinweg beobachtet. Ein Teil der Ratten wurde bereits 2 Tage nach Vektorinjektion getötet und Gehirne aufgearbeitet, um die Effizienz der Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop zu bestimmen.

4.2.3.2 Zellmigration *in vivo*

Fünf Tage nach Injektion von 1×10^5 9L-DsRed Zellen wurden $2-6 \times 10^5$ Testzellen injiziert. Nach weiteren 3-5 Tagen wurden Ratten getötet und Gehirne aufgearbeitet. Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zum Test der Migration von MAPC in G62 Gliomen wurden 1×10^5 MAPC in etablierte G62 Gliome injiziert. Sieben Tage nach MAPC Injektion wurden Mäuse getötet und Gehirne aufgearbeitet. Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

4.2.3.3 Bystander Effekt von MAPC-TK *in vivo*

Fünf Tage nach Injektion von 6×10^4 9L-DsRed Zellen wurden 6×10^5 MAPC-TK Zellen injiziert. Ab Tag 4 nach MAPC-TK Injektion wurde GCV (30mg/kg) an 10 aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert. Überleben der Ratten wurde über 35 Tage hinweg beobachtet.

4.2.3.4 Studien mit MAPC Verpackungszellen *in vivo*

Fünf Tage nach Injektion von 8×10^4 9L-DsRed Zellen wurden 4×10^5 MAPC Verpackungszellen injiziert. Nach weiteren 4-7 Tagen wurden Ratten getötet und Gehirne aufgearbeitet. Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop und dem konfokalen Mikroskop.

5 Ergebnisse

5.1 Tropismusstudien mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypvektoren

Lentivirale Vektoren zeichnen sich durch eine effiziente Transduktion sowohl mitotischer als auch ruhender Zellen aus. Gegenüber den gammaretroviralen Vektoren haben sie demnach den Vorteil, dass auch in Tumoren mit geringer Zellteilungsrate eine hohe Transduktionseffizienz erzielt werden kann. Aufgrund dieser Eigenschaft besteht jedoch die Gefahr der Transduktion des umliegenden gesunden Gewebes wie etwa des mitotisch inaktiven Hirngewebes. Da der Tropismus lentiviraler Vektoren aber hauptsächlich durch Interaktion des viralen Hüllproteins mit dem zellulären Rezeptor bestimmt wird kann durch Wahl eines geeigneten Hüllproteins die Spezifität für die gewünschte Zielzelle erhöht werden. Die Glykoproteine von LCMV und VSV vermitteln als Hüllprotein gammaretroviraler Vektoren hohe Gentransferraten in humane Gliomzellen [82]. Der Tropismus lentiviraler LCMV-GP und VSV-G Pseudotypvektoren für Gliomzellen und normale Hirnzellen sollte in den folgenden Versuchen bestimmt werden.

5.1.1 Tropismus lentiviraler Pseudotypen für Gliomzellen und normale Hirnzellen *in vitro*

Die humane Gliomzelllinie G62 und die Rattengliomzelllinie 9L wurden mit lentiviralen VSV-G und LCMV-GP Pseudotypvektoren mit *gfp* Transgen (M107, Plasmidkarte siehe Anhang) inkubiert. Die humane Fibroblastenlinie TE617, die von beiden Pseudotypen transduziert werden kann [82], diente als Referenz. Titer der VSV-G Pseudotypen waren auf allen Zelllinien niedriger als LCMV-GP Vektortiter. Besonders deutlich war dieser Effekt aber auf G62 Zellen, die von LCMV-GP Pseudotypen mit 30-fach höherer Effizienz transduziert wurden als von VSV-G Pseudotypen (Abbildung 5.1). Damit gilt, wie schon für gammaretrovirale Vektoren [82], dass lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen humane Gliomzellen effizienter transduzieren als VSV-G Pseudotypen.

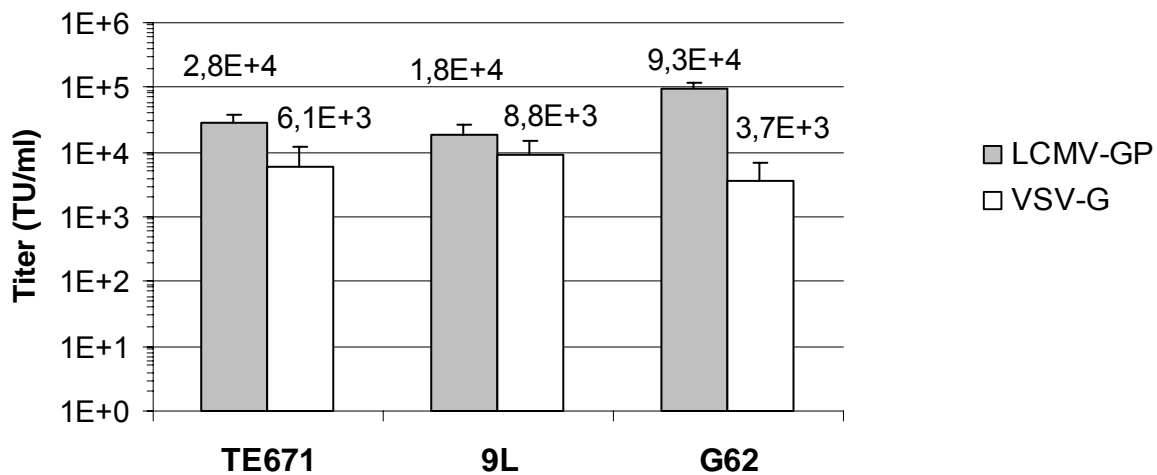


Abbildung 5.1 Lentivirale VSV-G und LCMV-GP Pseudotypen transduzieren Gliomzellen *in vitro*. Die Zelllinien TE671 (humane Fibroblasten), 9L (Rattengliomzellen) und G62 (humane Gliomzellen) wurden mit lentiviralen VSV-G und LCMV-GP Pseudotypvektoren mit *gfp* Transgen transduziert. Vektortiter wurden in vier (TE671, 9L) oder zwei (G62) unabhängigen Titrationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Nachdem gezeigt wurde, dass lentivirale LCMV-GP und VSV-G Pseudotypvektoren Gliomzellen *in vitro* effizient transduzieren, wurde der Tropismus beider Pseudotypen für normale Hirnzellen bestimmt. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Prof. H. Neumann, Universität Göttingen und Dr. H. Miletic, Universität Köln durchgeführt. Kultivierte Astrozyten und Neurone der Ratte wurden mit lentiviralen Pseudotypvektoren mit *gfp* Gen (M107) transduziert. Die humane Gliomzelllinie G62 diente als Infektionskontrolle. Wie in Abbildung 5.2 dargestellt transduzierten LCMV-GP Pseudotypen Neurone mit sehr geringer Effizienz (2% transduzierte Neurone). Im Gegensatz dazu zeigten VSV-G Pseudotypen einen starken Tropismus für Neurone (62% transduzierte Neurone). Auch Astrozyten wurden von VSV-G Pseudotypen stärker transduziert als von LCMV-GP Pseudotypen. Die Gefahr des Gentransfers in normale Hirnzellen *in vivo* ist daher vermutlich bei Verwendung von lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen geringer als bei Verwendung von VSV-G Pseudotypen.

Der zelluläre Rezeptor für LCMV ist α -Dystroglycan (α -DG) [49]. Um zu untersuchen, ob die α -DG Expressionshöhe in Neuronen, Astrozyten und 9L Gliomzellen mit dem beobachteten Tropismus lentiviraler LCMV-GP Pseudotypen korreliert, wurde die relative Menge an α -DG Transkripten in diesen Zellen bestimmt. Quantitative PCR ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der α -DG Expressionshöhe in Neuronen, Astrozyten und 9L Zellen auf mRNA Ebene (Abbildung 5.3).

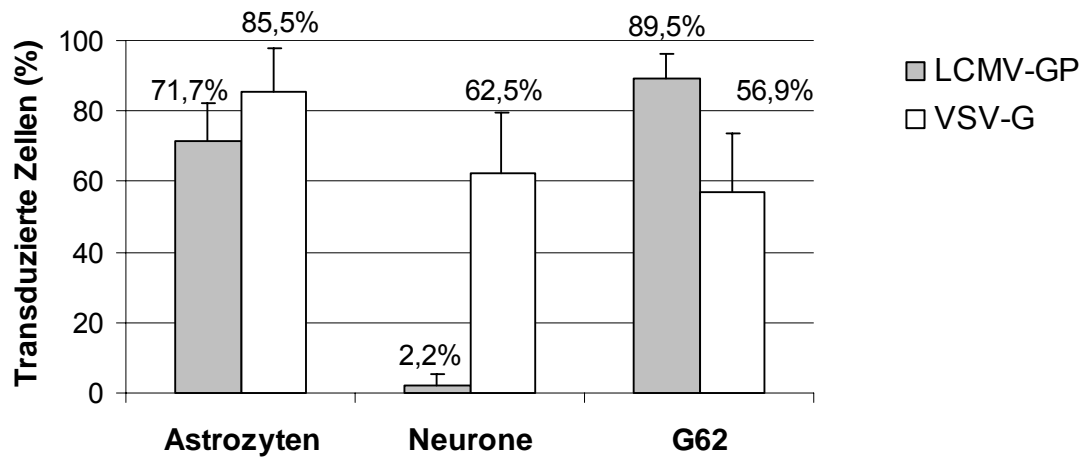


Abbildung 5.2 Lentivirale VSV-G Pseudotypen zeigen eine stärkeren Tropismus für primäre Neurone und Astrozyten als LCMV-GP Pseudotypen *in vitro*. Kultivierte Astrozyten und Neurone aus der Ratte sowie die humane Gliomzelllinie G62 wurden mit 3×10^3 lentiviralen VSV-G Pseudotypen oder 8×10^3 LCMV-GP Pseudotypen mit *gfp* Transgen transduziert. Der Prozentsatz transduzierter GFAP+ Astrozyten und β -Tubulin III+ Neurone wurde durch Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zehn Kamerafeldern ($0,75 \text{mm}^2$).

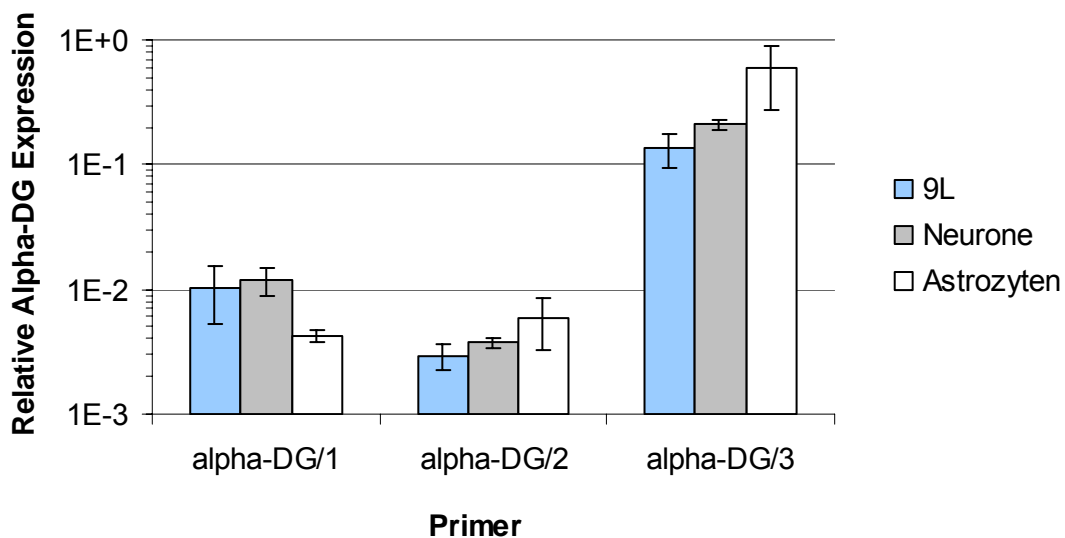


Abbildung 5.3 Die Menge an α -Dystroglycan Transkripten ist ähnlich in 9L Zellen, Neuronen und Astrozyten. RNA aus kultivierten Neuronen und Astrozyten der Ratte, sowie aus 9L Rattengliomzellen wurde isoliert und zu cDNA revers transkribiert. Quantitative PCR wurde mit drei unterschiedlichen α -DG-spezifischen Primerpaaren für jede Probe in Triplikaten durchgeführt. Als interne Referenz wurden für jede Probe GapDH Transkripte amplifiziert. Dargestellt ist die Expressionshöhe von α -DG relativ zur Expressionshöhe von GapDH.

5.1.2 Transduktion von Gliomen mit lentiviralen Pseudotypen *in vivo*

LCMV-GP Pseudotypen vermittelten eine effiziente Transduktion von Gliomzellen *in vitro*, während Astrozyten weniger effizient und Neurone kaum transduziert wurden (Abschnitt 5.1.1). Der Tropismus lentiviraler LCMV-GP und VSV-G Pseudotypen *in vivo* wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Miletic, Universität Köln, bestimmt. Die Rattengliomzelllinie 9L wurde zuvor mit dem retroviralen Vektor M159 (Plasmidkarte siehe Anhang) transduziert und exprimierte daraufhin das rotfluoreszierende Protein DsRed. Ein Klon, welcher DsRed zu über 90% exprimierte wurde isoliert und zur Durchführung der weiteren *in vivo* Experimente verwendet. Lentivirale LCMV-GP und VSV-G Pseudotypvektoren mit *gfp* Gen (M107) wurden in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. Wie in Abbildung 5.4 gezeigt transduzierten LCMV-GP Pseudotypen (A) solide Tumoranteile effizienter als VSV-G Pseudotypen (D). Auch infiltrierende Tumorzellen wurden von LCMV-GP Pseudotypen effizient und spezifisch transduziert, während kein signifikanter Gentransfer in umliegendes normales Hirngewebe stattfand (B, C). Im Gegensatz dazu transduzieren VSV-G Pseudotypen in der Infiltrationszone hauptsächlich normales Hirngewebe (E). Der *in vivo* Tropismus beider Pseudotypen entspricht somit deren Tropismus *in vitro* (Abschnitt 5.1.1).

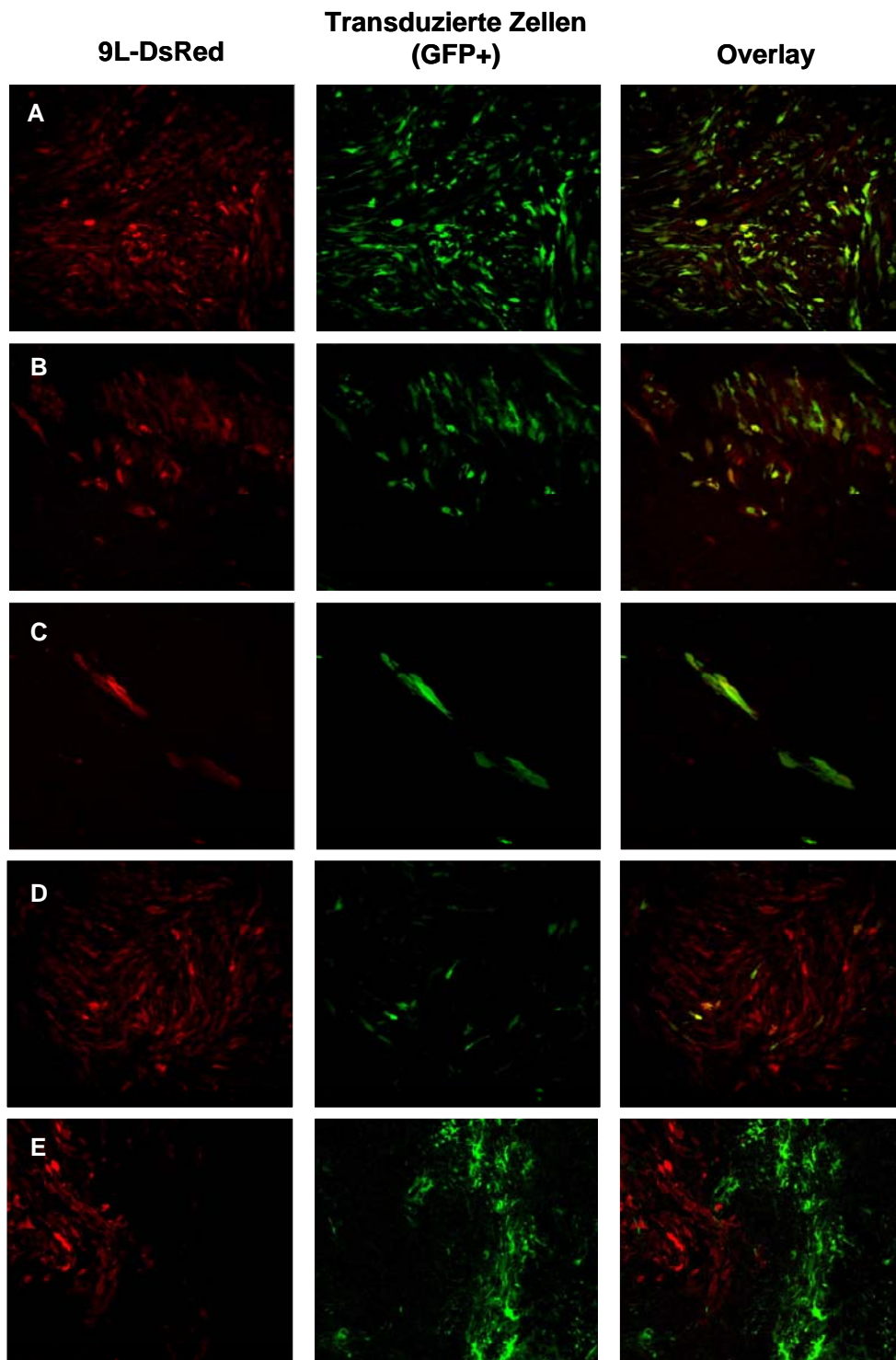


Abbildung 5.4 Lentivirale LCMV-GP Pseudotypen transduzieren 9L-DsRed Gliome *in vivo* effizienter und spezifischer als VSV-G Pseudotypen. Konzentrierte lentivirale LCMV-GP oder VSV-G Pseudotypen (2×10^4 - 1×10^5 TU) mit *gfp* Transgen wurden in das Zentrum oder die Peripherie von etablierten 9L-DsRed Gliomen injiziert. Sieben Tage nach Vektorinjektion wurden die Ratten getötet, Gehirne entnommen und Gefrierschnitte ($12 \mu\text{m}$) angefertigt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. A-C: LCMV-GP Pseudotypen; A: Tumorzentrum; B: Tumorperipherie; C: infiltrierende Tumorzellen, D-E: VSV-G Pseudotypen; D: Tumorzentrum; E: Tumorperipherie Vergrößerungen: A, B, D, E: 20-fach; C: 40-fach

5.2 Gentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen

LCMV-GP-pseudotypisierte lentivirale Vektoren, welche Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* effizient und mit hoher Spezifität transduzieren (Abschnitt 5.1), sollten nun auf ihre therapeutische Wirksamkeit in der Suizidgentherapie von Gliomen getestet werden.

5.2.1 Suizidgentransfer mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen in Gliomzellen *in vitro*

Es wurde zunächst untersucht, ob lentivirale Transduktion mit dem *hsv-tk* Suizidgen die Sensitivität von Gliomzellen gegen GCV erhöht. Außerdem wurde getestet, ob transduzierte Gliomzellen einen Bystander Effekt auf native Gliomzellen ausüben. Gliomzellen wurden mit dem lentiviralen SIN Vektor M488 mit SFFV Promotor und *hsv-tk/gfp* Fusionsgen (Klonierungsstrategie und Plasmidkarte siehe Anhang) transduziert. Transduzierte Zellen wurden mit nativen Gliomzellen in verschiedenen Mischverhältnissen ausgesät und mit GCV in steigenden Konzentrationen inkubiert. Während native 9L und G62 Zellen resistent gegen GCV bis zu einer Konzentration von 100µM waren, führte Transduktion mit M488 zu einer deutlichen Sensibilisierung der Zellen gegen GCV (Abbildung 5.5). EC_{50} Werte für 9L Zellen lagen bei <100nM in Kulturen mit 80%, 50% oder 10% HSV-TK exprimierenden Zellen (Abbildung 5.6). Bei höheren GCV Konzentrationen sank der Anteil lebender Zellen auf <10% des Kontrollwertes. Dies war auch der Fall, wenn nur 50% bzw. 10% der 9L Zellen HSV-TK exprimierten, was auf einen starken HSV-TK Bystander Effekt in 9L Mischkulturen hindeutet.

G62 Zellen waren resistenter gegen eine HSV-TK/GCV Therapie als 9L Zellen. EC_{50} Werte in Kulturen mit 80% HSV-TK exprimierenden G62 Zellen waren 6-fach höher als bei 9L (Abbildung 5.6). Auch der Bystander Effekt war bei G62 Zellen weniger stark ausgeprägt. EC_{50} Konzentrationen in G62 Kulturen mit 10% transduzierten Zellen waren 10-fach höher als in Kulturen mit 80% transduzierten Zellen, während bei 9L hier nur eine 3-fache Erhöhung der EC_{50} Konzentration festgestellt wurde. Anders als bei 9L wurde bei G62 Zellen ein Abtöten von 90% der Kultur nur dann erreicht, wenn 80% der Zellen HSV-TK exprimierten (Abbildung 5.5).

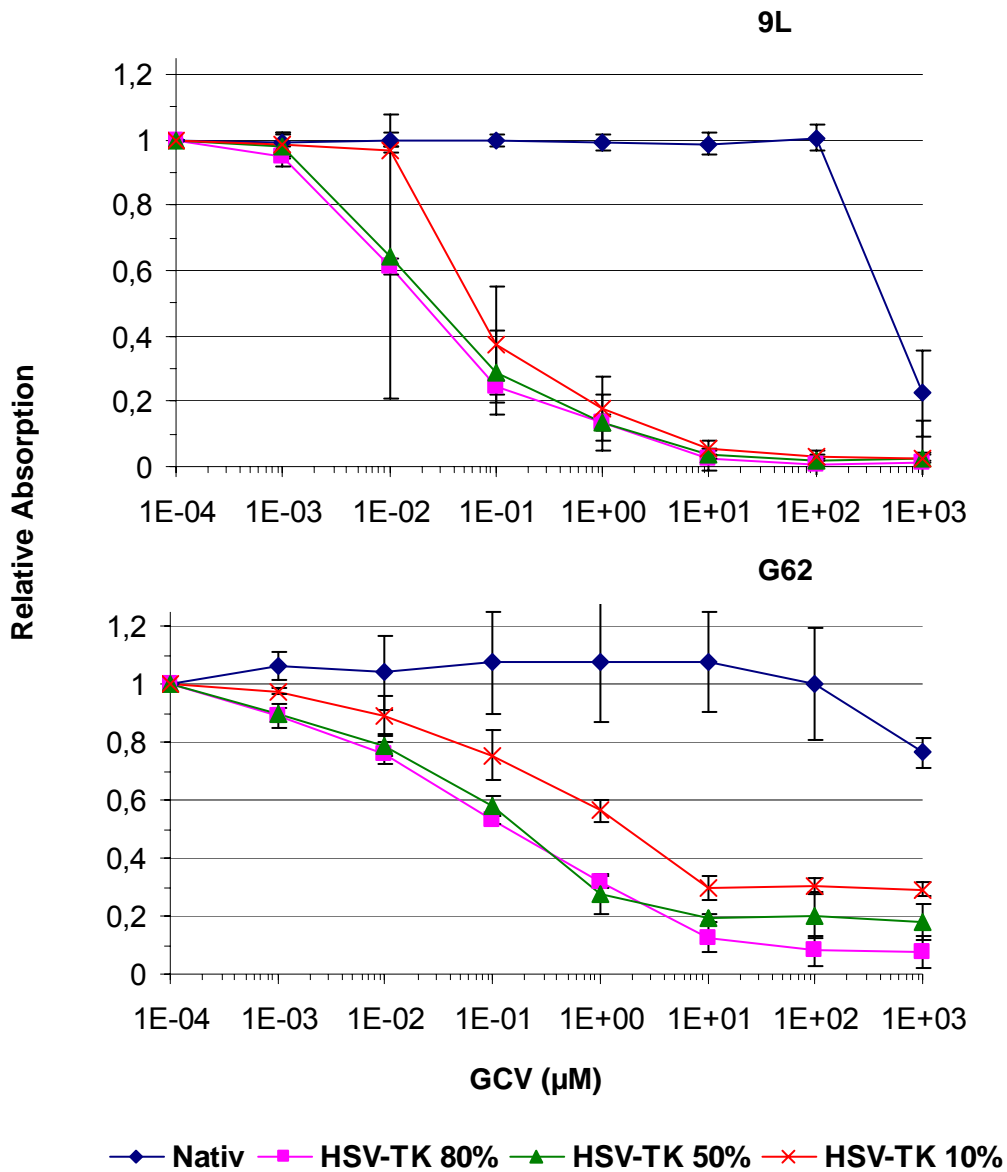


Abbildung 5.5 Lentivirale Transduktion mit dem *hsv-tk* Gen sensibilisiert Gliomzellen gegen GCV. Die Gliomzelllinien 9L und G62 wurden mit dem lentiviralen Vektor M488 transduziert und gemischt mit nativen Gliomzellen ausgesät. Kulturen mit 80%, 50% oder 10% HSV-TK-exprimierenden Zellen wurden mit GCV in Konzentrationen von 1nM bis 1mM versetzt. Nach dreitägiger Inkubation wurde der Anteil lebender Zellen mittels eines WST-Tests quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Absorptionen relativ zu Kontrollen (ohne Zugabe von GCV) aus zwei unabhängigen Versuchen.

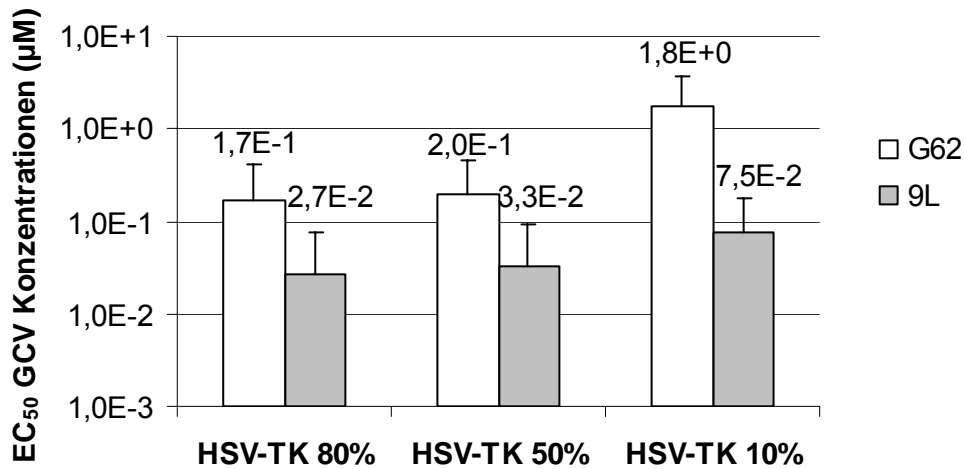


Abbildung 5.6 Lentivirale Transduktion mit dem *hsv-tk* Gen sensibilisiert Gliomzellen gegen GCV: EC₅₀ Konzentrationen. Die Gliomzelllinien 9L und G62 wurden mit dem lentiviralen Vektor M488 transduziert und gemischt mit nativen Gliomzellen ausgesät. Kulturen mit 80%, 50% oder 10% HSV-TK exprimierenden Zellen wurden mit GCV in Konzentrationen von 1nM bis 1mM versetzt. Nach dreitägiger Inkubation wurde der Anteil lebender Zellen mittels eines WST-Tests quantifiziert. GCV Konzentrationen, bei welchen die Zellviabilität relativ zu Kontrollansätzen um 50% abgenommen hatte (EC₅₀ Konzentration) wurde durch Extrapolation ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der EC₅₀ Konzentrationen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Der Bystander Effekt der HSV-TK/GCV Therapie wird durch die Diffusion von GCV-P über Gap Junctions vermittelt [101]. Das Protein Connexin 43 (Cx43) ist hauptsächlich an der Ausbildung von Gap Junctions zwischen Gliazellen beteiligt [102]. Unterschiede in der Cx43 Expression bei 9L und G62 Zellen könnten daher auf unterschiedliche Gap Junction Funktionalität hinweisen. Expression von Cx43 konnte durch Immunfluoreszenzfärbung jedoch sowohl in 9L Zellen als auch in G62 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.7). In beiden Zelllinien war Cx43 aber vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und nur an wenigen Stellen konnte vermutlich eine Ansammlung von Cx43 an Zell-Zell-Kontaktstellen beobachtet werden (siehe Pfeile in Abbildung 5.7).

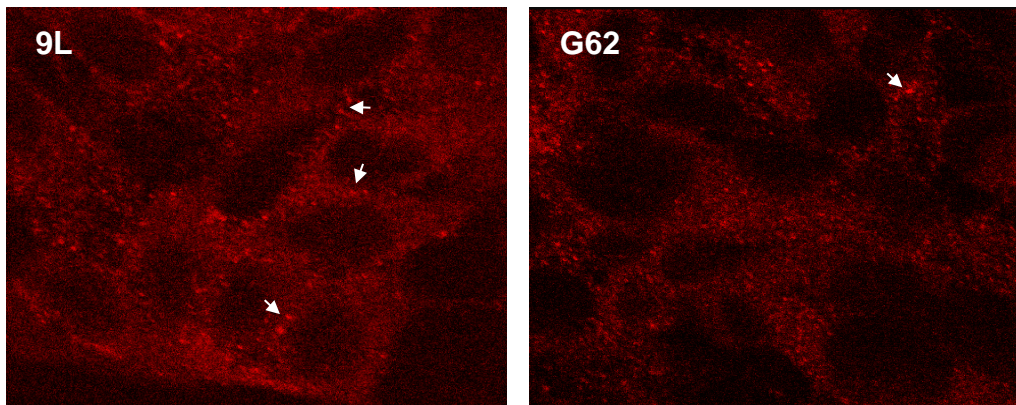


Abbildung 5.7 Connexin 43 wird in G62 und 9L Zellen exprimiert. Confluente Monolayerkulturen der Gliomzelllinien G62 und 9L wurden mit einem monoklonalen MAB 3068 (α -Cx43) Primärantikörper und PE-conjugiertem Sekundärantikörper gefärbt. Auswertung erfolgte unter dem konfokalen Mikroskop. Vergrößerung: 60x

5.2.2 Suizidgentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen *in vivo*

Die Wirksamkeit einer Suizidgentherapie mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Miletic, Universität Köln, im 9L Gliommodell der Ratte getestet. Lentivirale Pseudotypvektoren mit *hsv-tk/gfp* Fusionsgen (M488, Plasmidkarte siehe Anhang) wurden in etablierte 9L Gliome injiziert. Dies führte zu einer effizienten Transduktion und Expression des therapeutischen Vektors im Tumorgewebe (Abbildung 5.8). Nach erfolgter Vektorinjektion wurden Ratten mit GCV therapiert. Kontrollgruppen erhielten nur Vektorinjektionen oder nur GCV. In Abbildung 5.9 sind die Überlebenszeit der Tiere in der Therapiegruppe sowie in den beiden Kontrollgruppen dargestellt. Ratten, welche sowohl Vektorinjektionen als auch GCV erhalten hatten, überlebten zu 90% bis zum Ende des Experiments (100 Tage nach Tumorimplantation). Im Gegensatz dazu starben 90% der Tiere in den Kontrollgruppen innerhalb von 40 Tagen. Unterschiede in der Überlebenszeit der Tiere in der therapeutischen Gruppe verglichen mit den beiden Kontrollgruppen sind statistisch signifikant ($P < 0.001$).

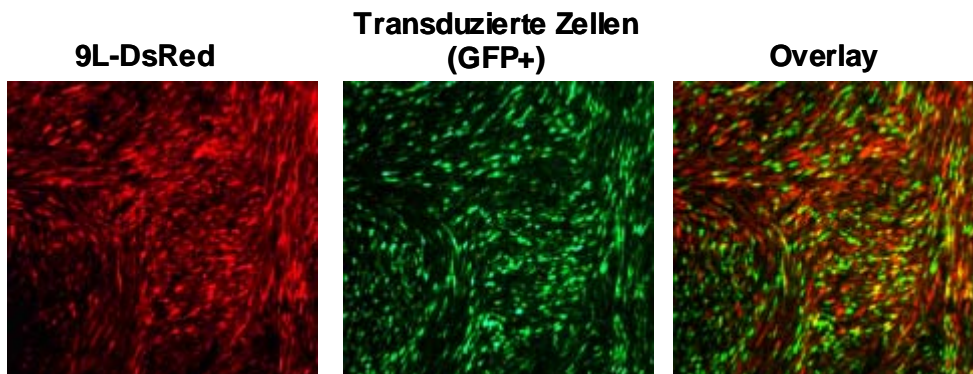


Abbildung 5.8 Lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren vermitteln die effiziente Transduktion und Expression eines *hsv-tk/gfp* Fusionsgens in 9L-DsRed Gliomen *in vivo*. Konzentrierte lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren mit *hsv-tk/gfp* Fusionsgen (10^5 TU) wurden in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. Vier Tage nach Vektorinjektion wurden die Ratten getötet und Gefrierschnitte ($12\mu\text{m}$) angefertigt. Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Vergrößerung: 10x

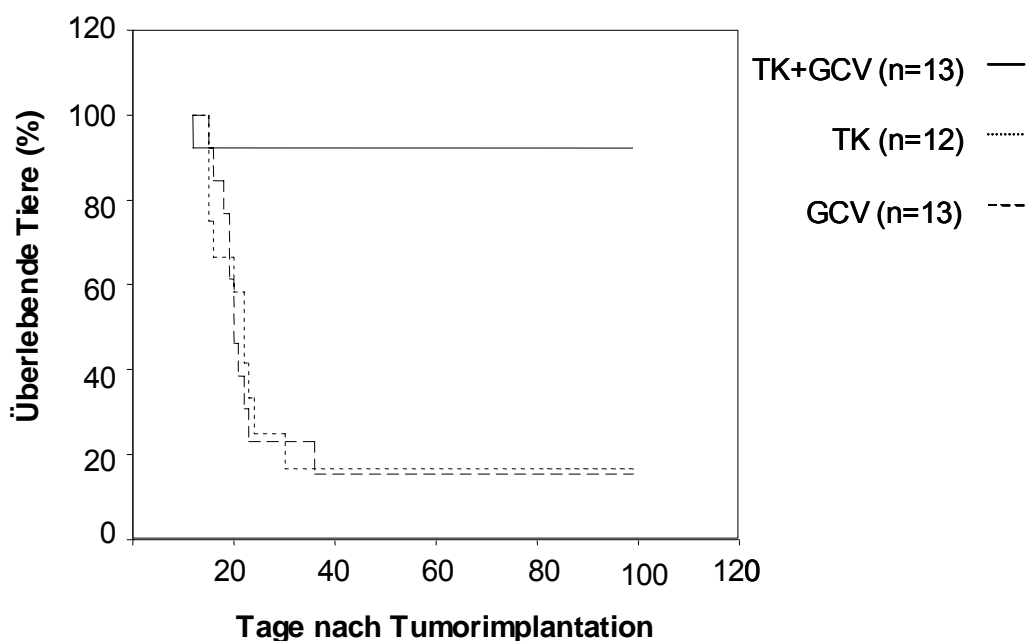


Abbildung 5.9 Transfer des *hsv-tk* Suizidgens durch lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren in 9L Gliome *in vivo* führt zum Überleben der behandelten Ratten. Konzentrierte lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren (10^5 TU) mit *hsv-tk/gfp* Fusionsgen wurden in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. GCV (30mg/kg) wurde an zehn darauffolgenden Tagen durch i.p. Injektion appliziert. Eine Kontrollgruppe (TK) erhielt nur Vektorinjektion, eine zweite Kontrollgruppe nur GCV ohne vorangehende Vektorinjektion. Überleben der Ratten wurde über 100 Tage beobachtet.

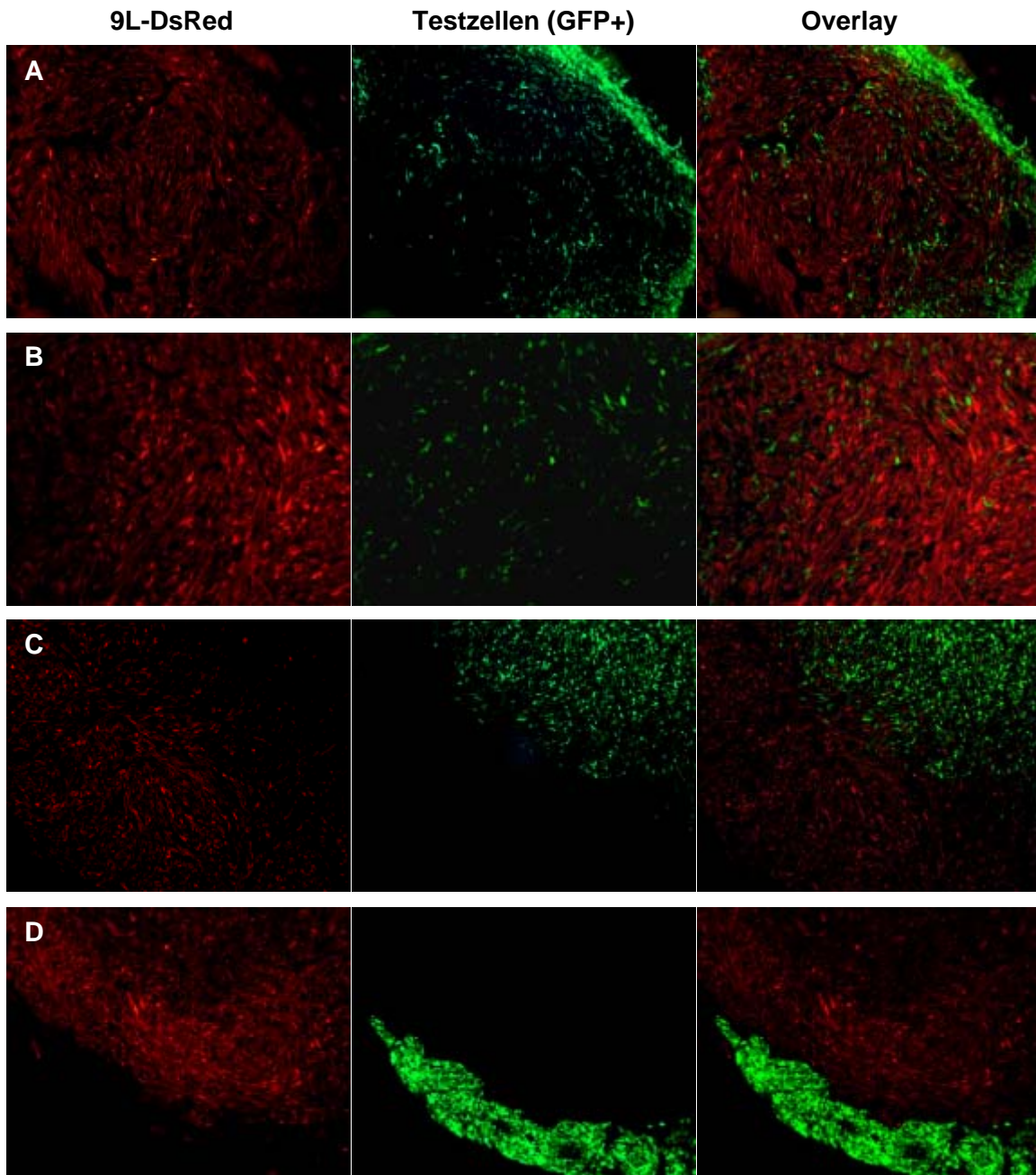
5.3 Tumorspezifische Migration verschiedener Zelltypen im Gliommodell *in vivo*

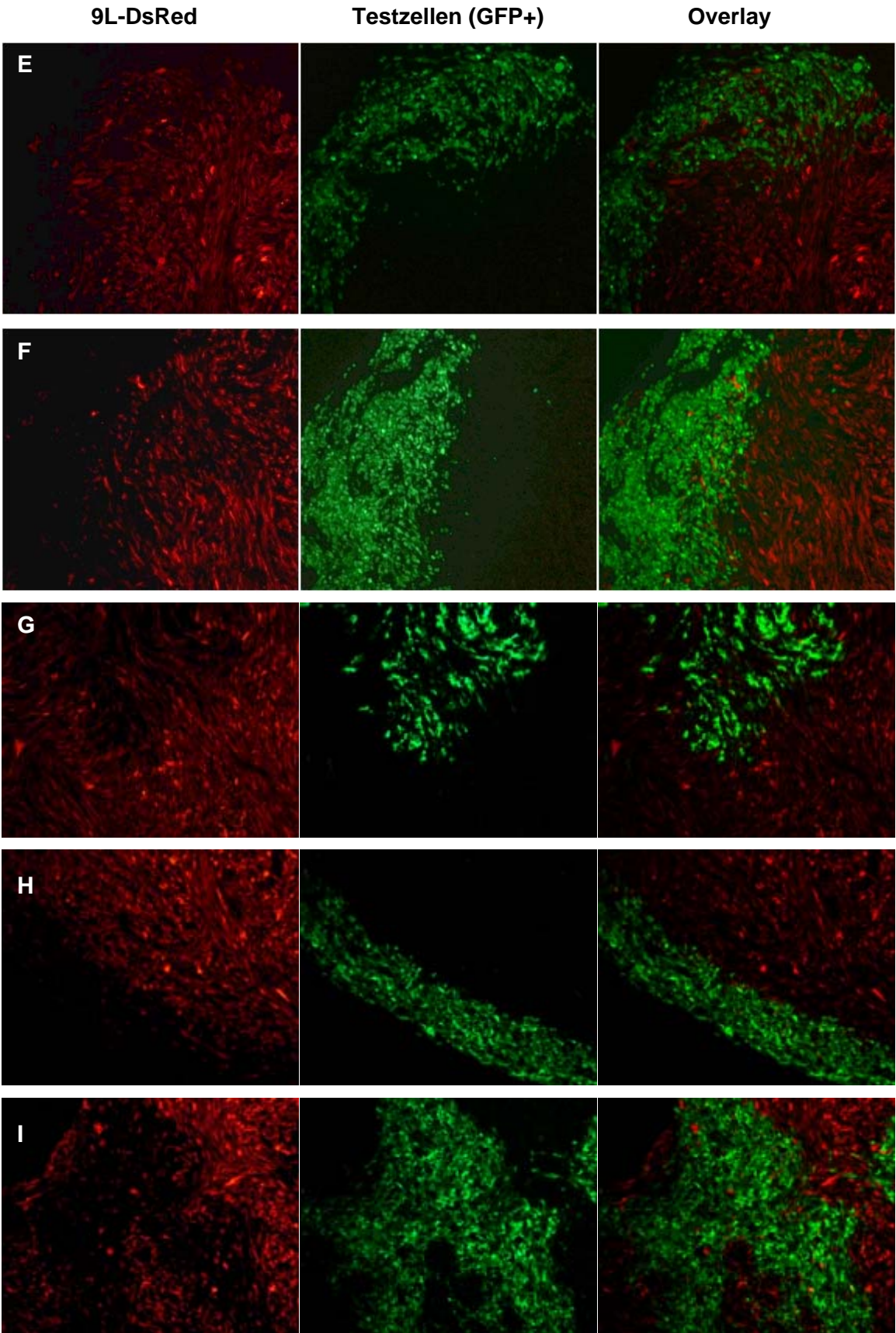
Durch Injektion lentiviraler LCMV-GP Pseudotypvektoren mit *hsv-tk* Transgen in etablierte 9L Gliome konnte bereits ein guter therapeutischer Effekt im Tiermodell erzielt werden (Abschnitt 5.2.2). Erfahrungsgemäß kann jedoch eine effiziente Durchdringung größerer Hirntumore im Patienten durch bloße Vektorinjektion nicht erreicht werden [72]. Besonders ins Gehirngewebe infiltrierende Tumorzellen, welche für die Entstehung von Rezidivtumoren verantwortlich sind, können mit dieser Technik nicht erreicht werden. Eine Option zur effizienteren Distribution retroviraler Vektoren innerhalb eines soliden Tumors ist die Verwendung migratorischer, tumorinfiltrierender Verpackungszellen. Um einen geeigneten Zelltyp zur Etablierung einer solchen Verpackungszelllinie zu identifizieren, wurden zunächst Migrationstests *in vivo* durchgeführt. Diese erfolgte in Kooperation mit Dr. H. Miletic, Universität Köln. In die Testung einbezogen wurde die humane Fibroblastenlinie TE671 und die humane embryonale Nierenzelllinie 293T, aus welchen bereits erfolgreich Verpackungszellen generiert werden konnten [43, 103]. Aufgrund ihrer intrinsischen Migrationsfähigkeit wurden außerdem Zellen hematopoietischen Ursprungs und Stammzellen getestet. Die murine Fibroblastenlinie NIH 3T3, die in klinischen Studien zur Gentherapie von Gliomen eingesetzt wurde, wurden ebenfalls in die Testung eingeschlossen. Testzellen wurden zuvor mit GFP (grünfluoreszierendes Protein) markiert, indem die Zellen mit dem retroviralen Vektor M56a (Plasmidkarte siehe Anhang) transduziert wurden. Kulturen, welche nach der Transduktion zu weniger als 90% GFP exprimierten, wurden noch einer Sortierung im FACS unterzogen. Testzellen wurden anschließend in 9L-DsRed Gliome injiziert.

Wie in Abbildung 5.10 dargestellt infiltrierten C17.2 Zellen 9L Tumore mit hoher Effizienz (A), drangen jedoch nicht in gesundes Hirngewebe vor (B). Die gliomspezifische Migration von C17.2, die bereits von Aboody et al. beschrieben wurde [3], konnte damit in diesen Versuchen bestätigt werden. NIH 3T3 Fibroblasten verblieben nach Injektion an der Injektionsstelle im Zentrum des Tumors und zeigten keine Tumordinfiltration (C). Auch die monozytären Zelllinien K562 (D) und U937 (E) und die T-Zelllinie Jurkat (F) waren hauptsächlich in der Peripherie des Tumors lokalisiert und zeigten keinerlei Infiltration des Tumors. Ähnlich verhielten sich die Nierenzelllinie 293T (G) und die humane Fibroblastenlinie TE671 (H, I). Auch diese Zelllinien waren in der Tumorperipherie bzw. im Zentrum des Tumors lokalisiert, ohne jedoch das Tumorgewebe zu infiltrieren. MAPC dagegen zeigten eine effiziente Infiltration des Tumors auf Einzelzellebene (J), ähnlich wie bei C17.2 beobachtet. Die Zellen wanderten weite Strecken von der Injektionsstelle (Pfeil in Abbildung 5.10 J) weg in Richtung des Tumors, drangen jedoch nicht in gesundes Gewebe

vor. Infiltration durch MAPC blieb nicht auf den Randbereich des Tumors beschränkt, vielmehr wurde auch weite Teile des soliden Tumorbereichs mit einbezogen (K).

Diese Ergebnisse zeigen dass sowohl neurale Stammzellen als auch MAPC zur Applikation therapeutischer Vektoren in Gliomen eine attraktive Alternative zu den vormals verwendeten NIH 3T3 Fibroblasten darstellen.





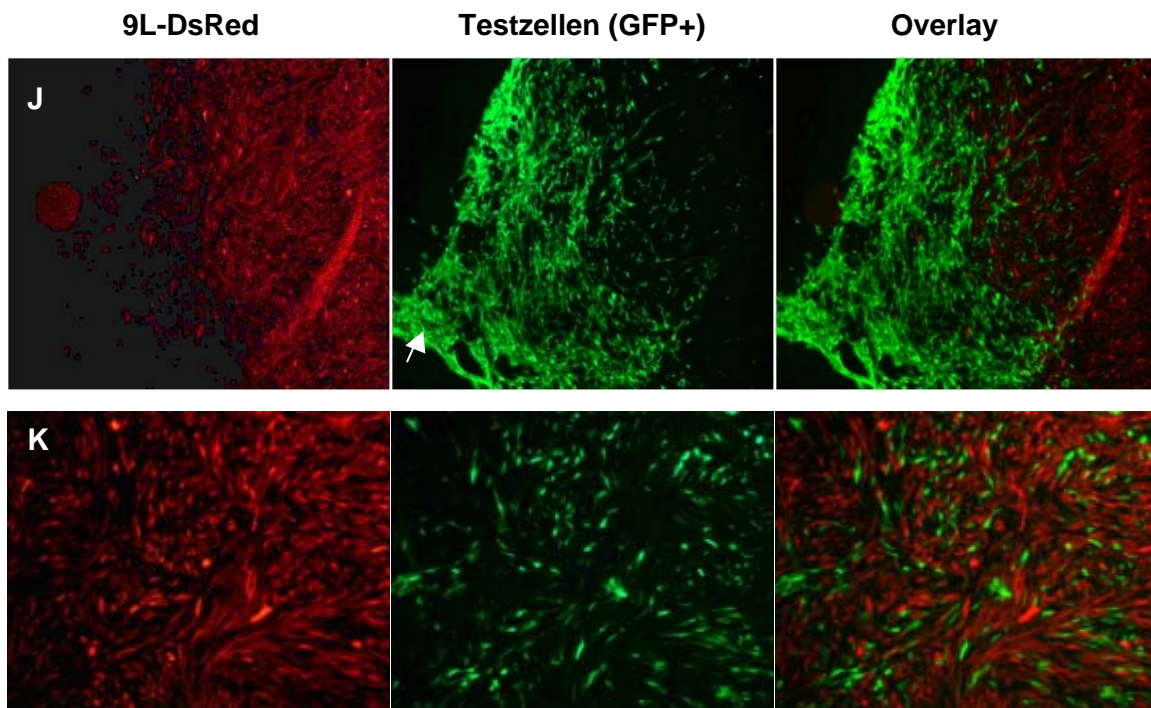


Abbildung 5.10 Neurale und multipotente adulte Stammzellen infiltrieren 9L-DsRed Gliome *in vivo*. GFP-exprimierende Testzellen ($2-6 \times 10^5$) wurden intratumoral in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. Nach 3 (A-J) Tagen oder 7 Tagen (K) wurden die Ratten getötet, Gehirne entnommen und Schnitte angefertigt ($12 \mu\text{M}$). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Pfeile deuten die Injektionsstelle der Testzellen an. Vergrößerung: A, C, D, J: 5-fach; B, E-I, K: 10-fach

Um zu untersuchen, ob MAPC auch humane Gliome infiltrieren wurde deren Migrationsfähigkeit im G62 Tumormodell getestet. Die humane Gliomzelllinie G62 wurde mit dem retroviralen Vektor M159 (Plasmidkarte siehe Anhang) transduziert und exprimierte anschließend das rotfluoreszierende Protein DsRed. MAPC wurden in G62-DsRed Tumore injiziert. Wie in Abbildung 5.11 dargestellt infiltrierten MAPC auch G62 Gliome spezifisch und auf Einzelzellebene. Dabei drangen MAPC auch in Tumorbereiche weit entfernt von der Injektionsstelle (Pfeil in Abbildung 5.11 A) vor (A). Gesundes Hirngewebe wurde dagegen nicht infiltriert (B). Dies zeigt, dass Infiltration von Gliomen durch MAPC nicht auf 9L Gliome beschränkt ist, sondern dass auch humane Gliome von MAPC infiltriert werden können.

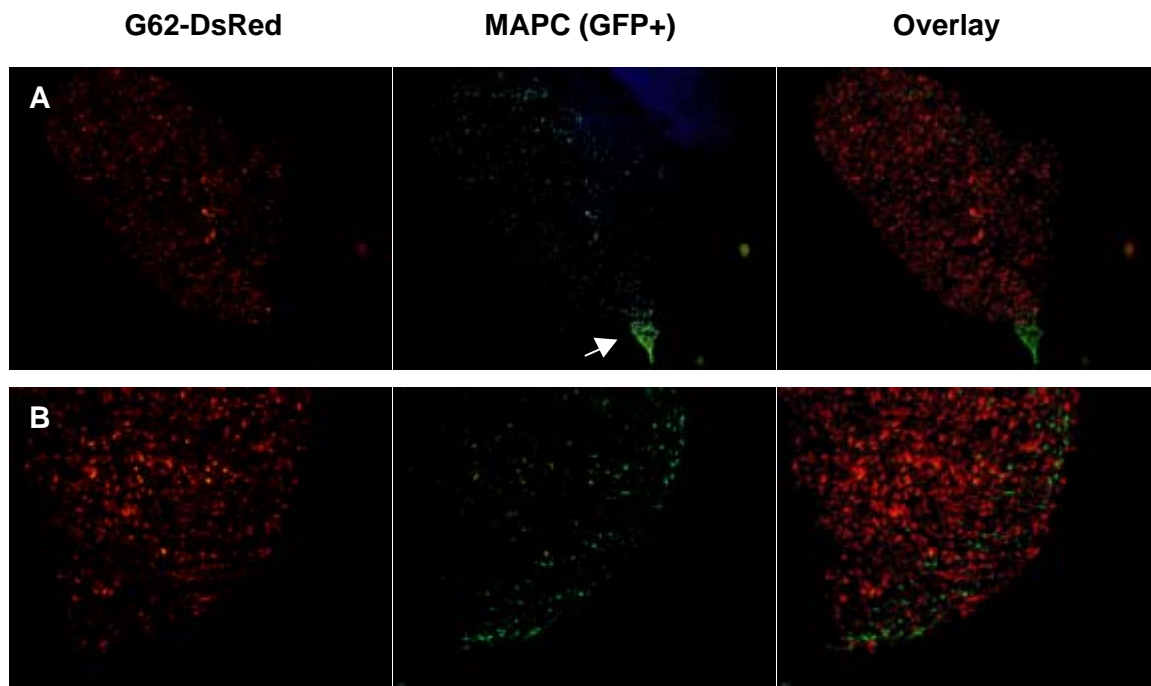


Abbildung 5.11 Multipotente adulte Stammzellen infiltrieren G62-DsRed Gliome *in vivo*. GFP- exprimierende MAPC (1×10^5) wurden intratumoral in etablierte G62-DsRed Gliome injiziert. Nach 7 wurden die Mäuse getötet, Gehirne entnommen und Schnitte angefertigt ($12 \mu\text{m}$). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Pfeile deuten die Injektionsstelle an. Vergrößerung: A : 2,5-fach; B: 5-fach

5.4 Neurale Stammzellen als stabile Verpackungszellen für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren

Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben zeigt die neurale Stammzelllinie C17.2 ein tumorspezifisches Migrationsverhalten und kann als Vehikel zur Applikation therapeutischer Substanzen im Tumorgewebe eingesetzt werden [3]. Diese Zelllinie sollte daher zu einer Verpackungszelllinie für LCMV-GP Pseudotypen modifiziert werden. Da die Etablierung lentiviraler Verpackungszellen wegen der Toxizität lentiviraler Genprodukte mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist, sollte zunächst als „Proof-of-Principle“ eine gammaretrovirale Verpackungszelllinie etabliert werden.

5.4.1 Stabile Expression von MLV Gag-Pol und LCMV-GP in C17.2 Zellen

C17.2 Zellen wurden zur Etablierung stabiler Verpackungszellen zunächst mit dem Expressionsplasmid M242, welches ein MLV *gag-pol* Gen, eine IRES Region und ein Blasticidinresistenzgen enthält (Plasmidkarte siehe Anhang), stabil transfiziert. Die erhaltenen Klone wurden zum Pool C17.2/242 vereinigt. Zur Überprüfung der Gag Expression wurde eine RT-PCR mit MLV Gag-spezifischen Primern durchgeführt. Wie in Abbildung 5.12 gezeigt exprimierten C17.2/242 Zellen MLV Gag (Spur 2), während in cDNA aus native C17.2 Zellen keine MLV Gag Transkripte nachgewiesen werden konnten (Spur1).

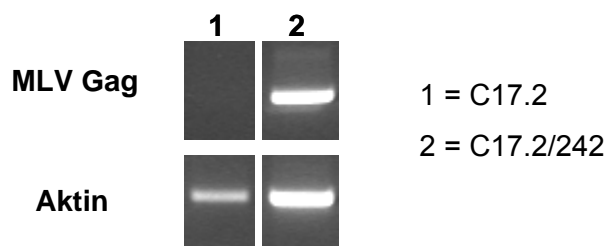


Abbildung 5.12 C17.2 Zellen exprimieren nach stabiler Transfektion mit M242 MLV Gag. RNA wurde aus Zelllysaten von C17.2 und C17.2/242 isoliert und in cDNA revers transkribiert. PCR aus cDNA wurde mit MLV Gag-spezifischen Primern durchgeführt.

Der Klonpool C17.2/242 wurde anschließend stabil mit dem Expressionsplasmid M533 mit *lcmv-gp* Gen, IRES Region und Puromycinresistenzgen (Plasmidkarte siehe Anhang) transfiziert. Nach Selektion mit Puromycin wurden die erhaltenen Klone vereinigt. LCMV-GP Expression im resultierenden Pool C17.2/242/533 wurde durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 5.13 zeigt, dass C17.2 nach stabiler Transfektion mit M533 LCMV-GP auf der Zelloberfläche exprimierten.

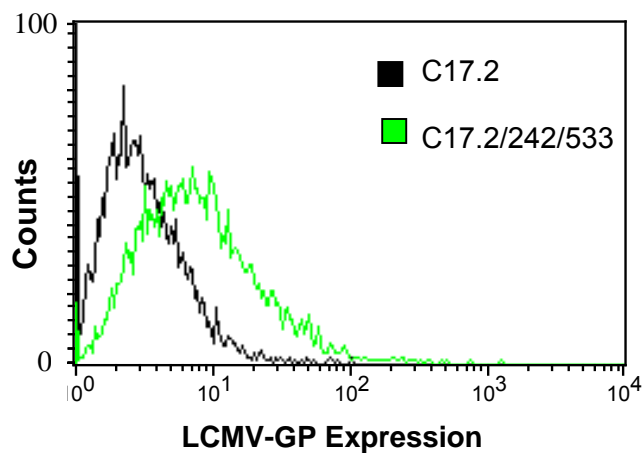


Abbildung 5.13 C17.2 Zellen exprimieren nach stabiler Transfektion mit M533 LCMV-GP an der Zelloberfläche. LCMV-GP Expression im Klonpool C17.2/242/533 wurde durch Färbung der Zelloberfläche mit dem LCMV-GP-spezifischen Antikörper KL25 und PE-gekoppeltem Sekundäantikörper nachgewiesen und durchflusszytometrisch quantifiziert.

5.4.2 Produktion retroviraler Pseudotypvektoren in C17.2 Zellen

C17.2 Zellen exprimierten nach stabilen Transfektionen mit *gag-pol* und *lcmv-gp* Genen alle Strukturproteine und Enzyme, welche zur Produktion retroviraler Vektoren benötigt werden. Es wurde daraufhin überprüft, ob C17.2 Verpackungszellen retrovirale Vektoren produzierten. C17.2/242/533 wurden dazu mit den retroviralen Vektoren M56a bzw. M508 transduziert. Beide Vektoren enthalten ein intaktes Verpackungssignal sowie ein *gfp* Gen, welches im Falle von M508 mit *hsv-tk* über eine IRES Region koexprimiert wird (Plasmidkarten siehe Anhang). Überstände der C17.2 Verpackungszellen wurden 3, 7 und 18 Tage nach Transduktion abgenommen und auf TE671 Zellen titriert. M56a Vektortiter variierten zwischen $1,1 \times 10^4$ und $4,7 \times 10^4$ TU/ml. M508 Vektortiter waren niedriger und betragen zwischen $7,9 \times 10^2$ und $1,9 \times 10^4$ TU/ml (Abbildung 5.14). Während M56a Titer innerhalb von 18 Tagen in Kultur weitgehend konstant blieben, nahmen M508 Titer in diesem Zeitraum jedoch um den Faktor 5 ab.

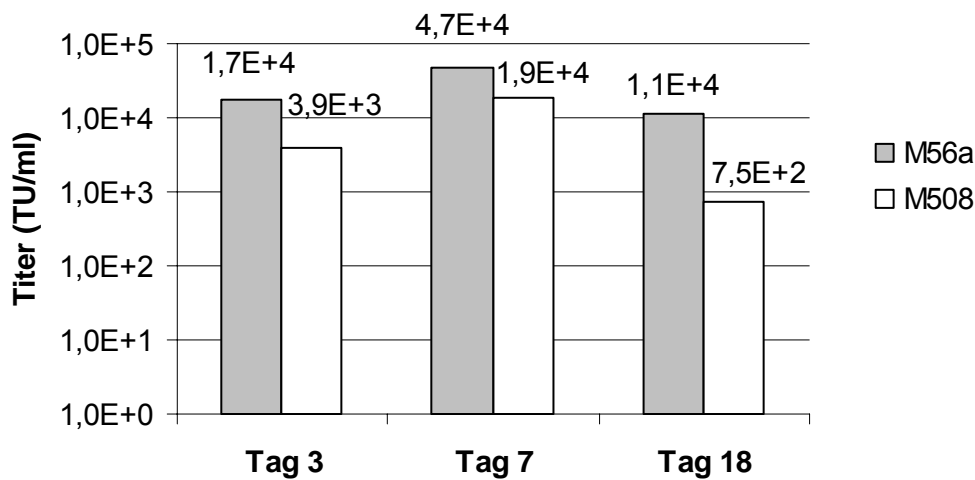


Abbildung 5.14 C17.2 Verpackungszellen produzieren retrovirale Vektoren mit *gfp* bzw. *hsv-tk* Transgen. Der Klonpool C17.2/242/533 wurde mit dem retroviralen Vektor M56a bzw. M508 transduziert. Titration der produzierten Vektoren wurde 3, 7 und 18 Tage nach Transduktion auf TE671 Zellen durchgeführt.

5.4.3 Test auf Produktion replikationskompetenter Retroviren in C17.2

Die Freisetzung replikationskompetenter Retroviren (RCR) in stabilen Verpackungszelllinien muss stets ausgeschlossen werden können, da dies ein Sicherheitsrisiko darstellt. Überstände von C17.2 Verpackungszellen (vor und nach Transduktion mit M56a) wurden deshalb auf Anwesenheit von RCR getestet. Zusätzlich wurden auch Überstände von C17.2/242 getestet. Genomische DNA der Indikatorzelllinie TE671 war negativ für *MLV gag*, amphotropes Hüllprotein von MLV (*A-MLVenv*) und *lcmv-gp* Sequenzen (Abbildung 5.15, Spur 5), während A-MLV infizierte TE671 Zellen positiv sowohl für *gag* als auch für *A-MLVenv* Sequenzen getestet wurden (Spur 1). Nach Kontakt mit einmal auf TE671 Zellen passagierten Überständen von C17.2/242/533/56a konnten *gag* und *A-MLVenv* Sequenzen in TE617 Zellen nachgewiesen werden (Spur 4), was auf RCR Kontamination der Überstände von C17.2 Verpackungszellen hinweist. Darüber hinaus konnten auch nach Transduktion von TE617 mit Überständen von C17.2/242/533 *MLV gag* und *A-MLVenv* Sequenzen nachgewiesen werden (Spur 3). Dagegen waren geringe Mengen an *gag* und keine *A-MLVenv* Sequenzen nach Transduktion mit C17.2/242 Überständen in TE671 nachweisbar (Spur 2). *Lcmv-gp* Sequenzen waren nicht nachweisbar, was die Entstehung eines replikationskompetenten LCMV-GP Pseudotyps ausschließt.

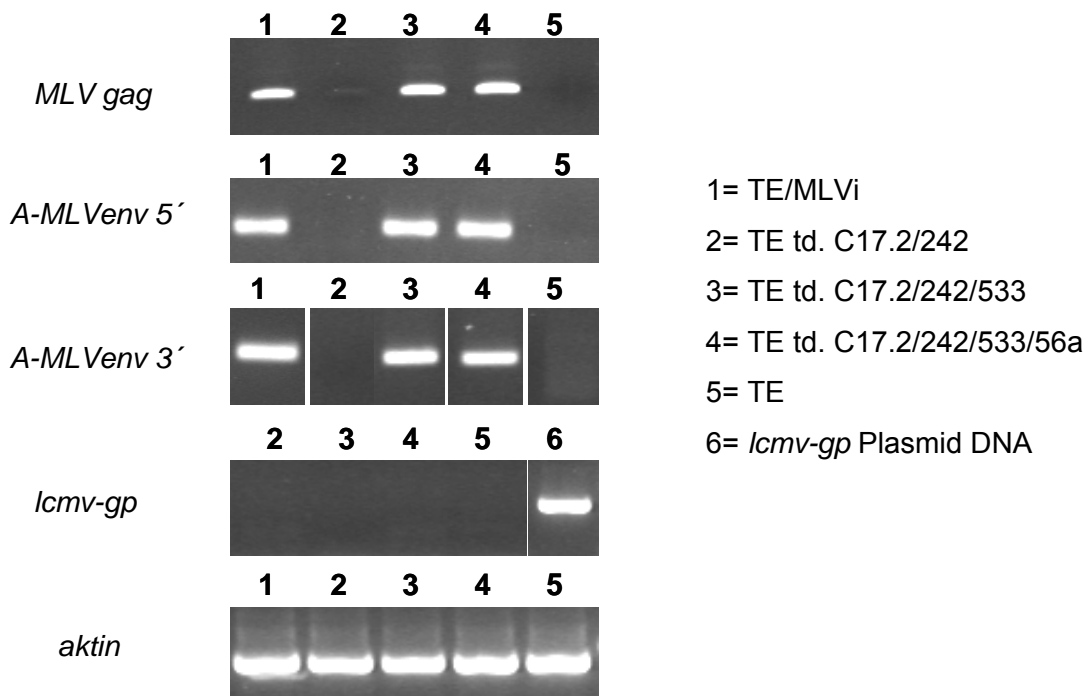


Abbildung 5.15 C17.2 Verpackungszellen produzieren replikationskompetente amphotrope Retroviren. TE671 Zellen wurden mit Überständen von C17.2/242, C17.2/242/533 oder C17.2/242/533/56a transduziert. Nach fünf Tagen wurden Überstände auf frische TE671 Zellen transferiert. Nach weiteren 2 Tagen wurden TE671 Zellen pelletiert, genomische DNA wurde extrahiert und einer PCR mit *aktin*-, *MLV gag*-, *A-MLVenv 5'*-, *A-MLVenv 3'*- und *lcmv-gp*-spezifischen Primern unterzogen. Als PCR Kontrolle für *lcmv-gp* diente Plasmid DNA (50ng/Ansatz).

TE671 Zellen enthielten nach Inkubation mit Überständen von C17.2 Verpackungszellen Sequenzen des amphotropen Hüllproteins von MLV. Die Expression von A-MLVenv Protein in TE671 wurde durch Infektionsversuche verifiziert. Hierzu wurden TE671 Zellen mit Überständen von C17.2 Verpackungszellen transduziert. Die Überstände wurden einmal auf frischen TE671 Zellen passagiert. Anschließend wurden TE671 Zellen mit amphotropen retroviralen Vektoren mit *gfp* Transgen (M56a, Plasmidkarte siehe Anhang) inkubiert. Wenn A-MLVenv in TE671 Zellen exprimiert wird, dann ist zu erwarten, dass diese aufgrund von Rezeptorinterferenz nicht mit amphotropen Vektoren transduziert werden können [104].

Ergebnisse sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Sowohl native TE671 Zellen als auch TE671 nach Transduktion mit Überstände von C17.2/242 und C17.2/242/533 wurden von LCMV-GP Pseudotypvektoren mit gleicher Effizienz transduziert (Reihe A). Native TE671 Zellen waren mit amphotropen MLV Vektoren transduzierbar (Reihe B). Auch nach Kontakt mit Überständen von C17.2/242 waren TE671 Zellen noch empfänglich für amphotrope Vektoren, während nach Inkubation mit C17.2/242/533 Überständen keine Transduktion mit

amphotropen Vektoren mehr möglich war. Dies lässt auf Expression von A-MLVenv in TE617 Zellen schließen und bestätigt somit die Ergebnisse der PCR, wonach C17.2 Verpackungszellen amphotrope replikationskompetente Retroviren freisetzen.

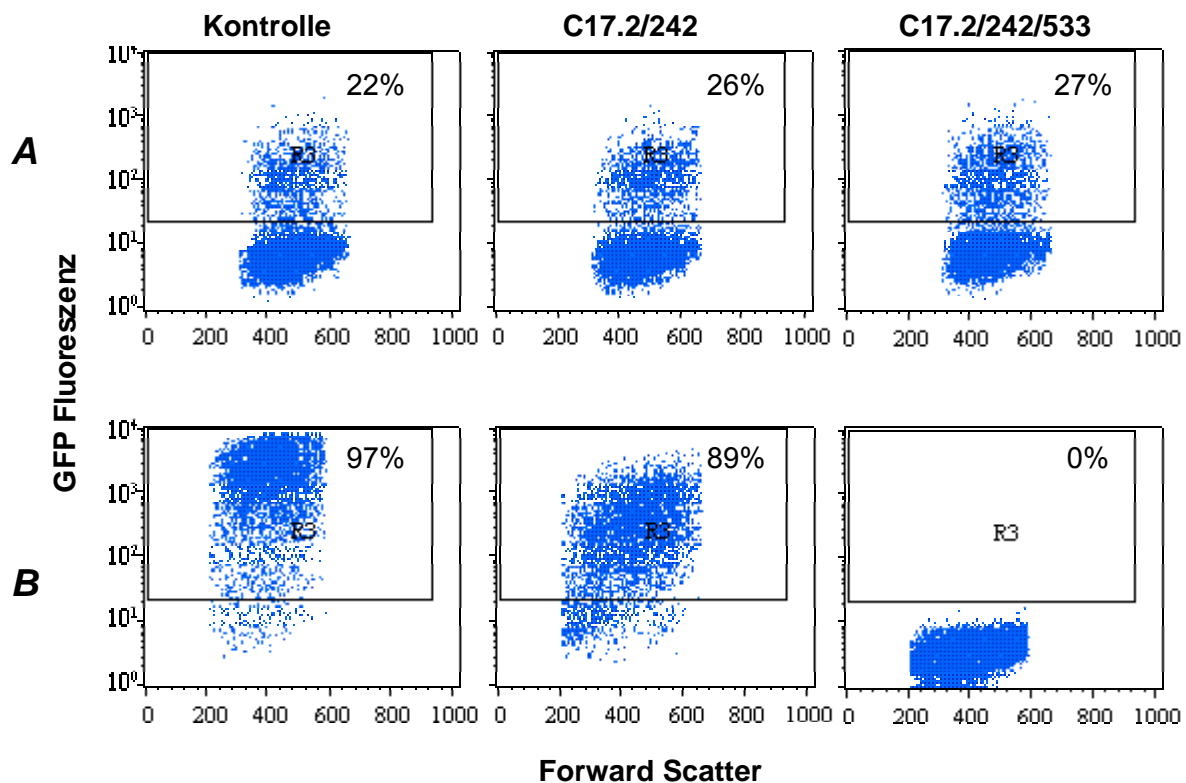


Abbildung 5.16 Inkubation von TE671 Zellen mit Überständen von C17.2 Verpackungszellen verhindert die Transduktion mit amphotropen Vektoren. Überstände von TE671 Zellen wurden fünf Tage nach Transduktion mit Überständen von C17.2/242 oder C17.2/242/533 abgenommen und zur Infektion frischer TE617 Zellen verwendet. Acht Tage nach Infektion wurden TE617 Zellen mit LCMV-GP pseudotypisierten Vektoren (Reihe A) oder amphotropen retroviralen Vektoren (Reihe B) mit *gfp* Transgen transduziert. Native TE617 Zellen dienten als Infektionskontrolle. GFP Expression in TE617 Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

RCR Tests mit Überständen der C17.2 Verpackungszellen (Abbildungen 5.15 und 5.16) deuteten auf Anwesenheit von A-MLVenv Sequenzen in nativen C17.2, bzw. auf Kontamination der Zelllinie mit amphotropem MLV hin. Um dies zu überprüfen wurde eine PCR mit A-MLVenv-spezifischen Primern mit genomischer DNA und cDNA aus nativen C17.2 Zellen durchgeführt. Die hier verwendeten A-MLVenv 5' und 3' Primer sind komplementär zu 5' bzw. 3' Bereichen der A-MLVenv cDNA. PCR mit genomischer DNA war schwach positiv für A-MLVenv und *gag* (Abbildung 5.17 A, Spur 1). cDNA aus C17.2 war

negativ mit *A-MLVenv* 5'- und *gag*-spezifischen Primern, aber deutlich positiv mit *A-MLVenv* 3'-spezifischen Primern (Spur 2).

Überstände von nativen C17.2 Zellen wurden auf NIH 3T3 Zellen transferiert, um so das Vorhandensein infektiöser Viren zu testen. Genomische DNA aus NIH 3T3 Zellen wurde nach Kontakt mit Überständen von MLV-infizierten TE617 Zellen positiv für *A-MLVenv* und *gag* Sequenzen getestet (Abbildung 5.17 B, Spur 1). Mit C17.2 Überständen wurden dagegen keine *A-MLVenv* und *gag* Sequenzen auf NIH 3T3 Zellen übertragen. Diese Ergebnisse zeigen, dass aus nativen C17.2 Zellen kein infektiöses MLV freigesetzt wird.

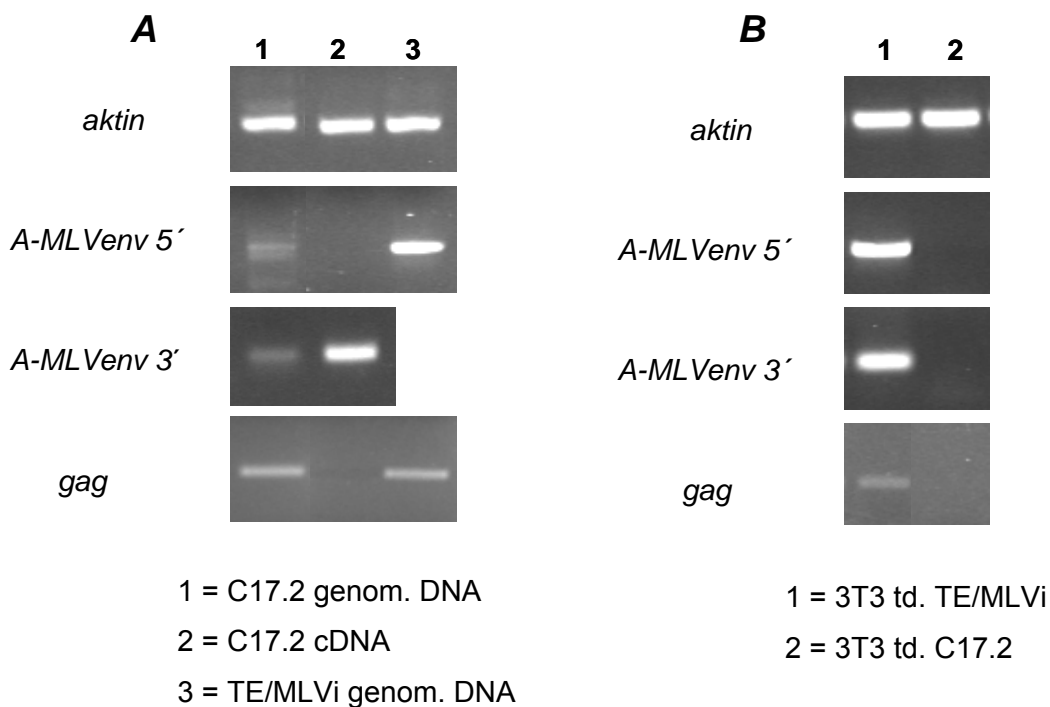


Abbildung 5.17 Native C17.2 Zellen enthalten endogene MLV Gag und A-MLVenv Sequenzen, produzieren aber keine replikationskompetenten Retroviren. A) RNA wurde aus Zelllysaten von C17.2 Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert. Genomische DNA wurde aus Zelllysaten von C17.2 und TE/MLVi isoliert. B) NIH 3T3 Zellen wurden sechs Tage nach Transduktion mit C17.2 oder TE/MLVi Überständen geerntet und genomische DNA wurde isoliert. PCR aus genomische DNA und cDNA wurde mit *aktin*-, *A-MLVenv* 5', *A-MLVenv* 3'- und *MLV gag*-spezifischen Primern durchgeführt.

5.5 MAPC als tumorinfiltrierende Vehikel zur Gentherapie von Gliomen

C17.2 Zellen enthielten endogene MLV Sequenzen und produzierten nach Transfektion mit MLV Gag-Pol und LCMV-GP Expressionsplasmiden replikationskompetente Retroviren (Abschnitt 5.4.3). Diese Zelllinie wurde daher zur Etablierung stabiler Verpackungszellen nicht weiter verwendet. Die in Abschnitt 5.3 durchgeführten Migrationsstudien zeigten, dass multipotente adulte Stammzellen ähnlich wie neurale Stammzellen Hirntumore effizient infiltrierten, wobei die Infiltration auf Tumorgewebe beschränkt blieb und nicht auf normales Hirngewebe übergriff. Durch Expression eines Suizidgens in C17.2 konnten Aboody et al. einen therapeutischen Effekt *in vivo* erzielen [3]. Es wurde nun untersucht, ob durch tumorinfiltrierende MAPC ebenfalls eine effiziente Verbreitung eines Suizidgens im Tumor und damit ein therapeutischer Effekt erzielt werden kann.

5.5.1 Bystander-Effekt von HSV-TK-exprimierenden MAPC auf Gliomzellen *in vitro*

MAPC wurden mit dem retroviralen Vektor M567 (Plasmidkarte und Klonierungsstrategie siehe Anhang), welcher ein *hsv-tk* Gen, eine IRES Region und ein Puromycinresistenzgen enthält, transduziert. Transduzierte Zellen wurden durch Zugabe von Puromycin selektioniert und zum Pool MAPC-TK vereinigt. Es wurde nun zunächst *in vitro* getestet, ob MAPC-TK einen Bystander Effekt auf Gliomzellen ausüben können. MAPC-TK wurden in verschiedenen Mischverhältnissen mit 9L-DsRed und G62-DsRed Zellen kokultiviert. Nach Zugabe von GCV wurde die Toxizität auf 9L bzw. G62 Zellen bestimmt, indem die Fluoreszenzintensität in den Mischkulturen gemessen wurde.

Wie in Abbildung 5.18 dargestellt waren 9L Zellen sehr sensitiv gegen eine Bystander Effekt-vermittelte Zytotoxizität. Selbst wenn die Kultur nur 10% MAPC-TK enthielt wurden 90% der 9L Zellen abgetötet. G62 Zellen waren dagegen relativ resistent gegen den Bystander Effekt von MAPC-TK. Durch Beimischung von 50% bzw. 10% MAPC-TK zu G62 konnten ca. 60% bzw. 50% der G62 Zellen abgetötet werden. In Mischkulturen von 9L bzw. G62 mit nativen MAPC konnte erwartungsgemäß keine Toxizität bis zu hohen GCV Konzentrationen festgestellt werden.

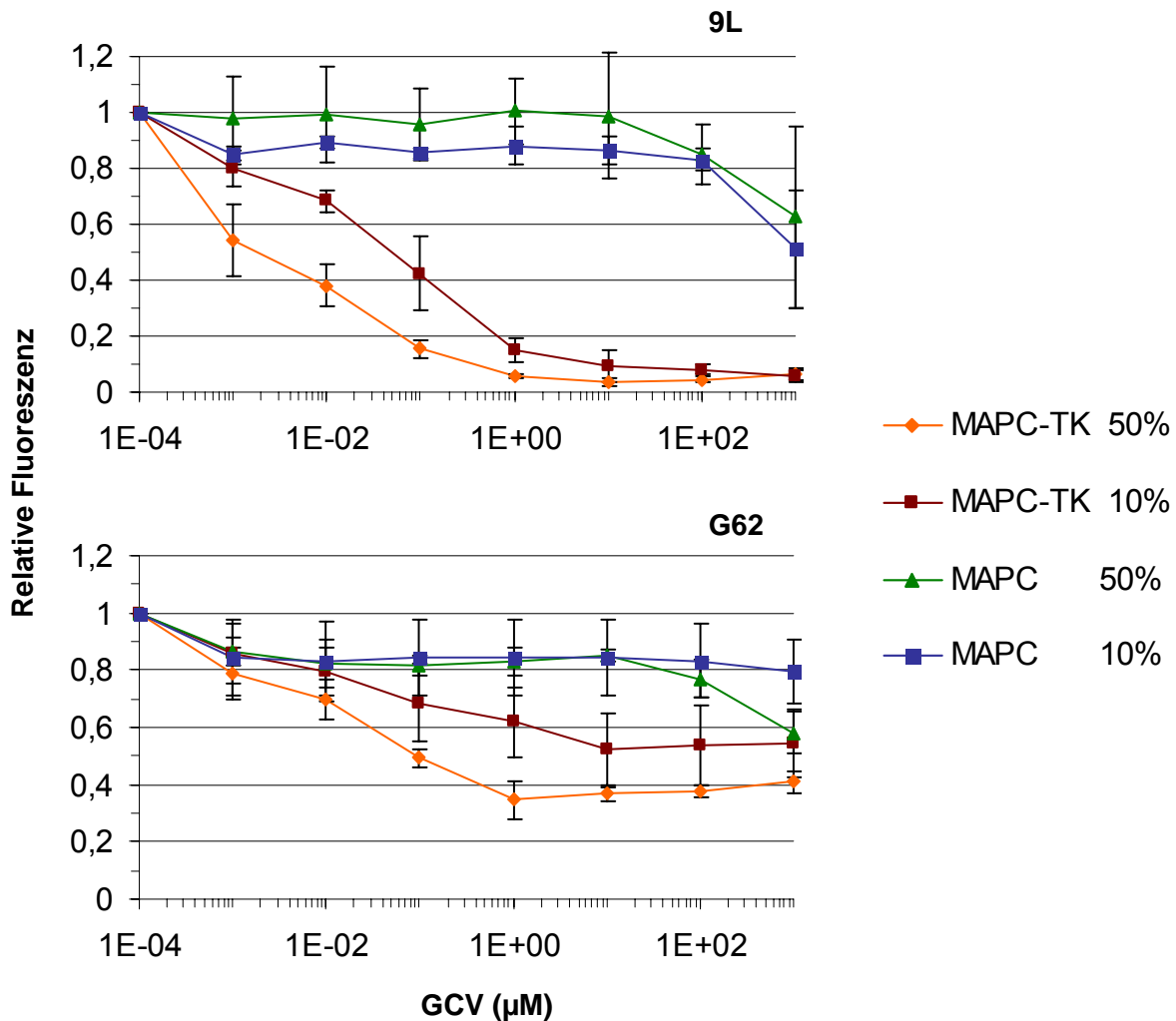


Abbildung 5.18 Die Gliomzelllinien 9L und G62 sind unterschiedlich sensitiv gegen den Bystander Effekt von MAPC-TK Zellen. Die Gliomzelllinien 9L-DsRed und G62-DsRed wurden gemischt mit 50% oder 10% nativen MAPC oder MAPC-TK ausgesät. Nach Zugabe von GCV und dreitägiger Inkubation wurden Zellen lysiert und die Fluoreszenzintensität in den Lysaten quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten aus drei unabhängigen Versuchen relativ zu Kontrollen (ohne Zugabe von GCV).

GCV Konzentrationen, die zum Absterben von 50% der Gliomzellen führten (EC_{50} Konzentrationen), sind in Abbildung 5.19 gezeigt. Fünfzig Prozent der 9L Zellen wurden bei GCV Konzentrationen von 1,5nM (50% MAPC-TK) bzw. 30nM (10% MAPC-TK) abgetötet. EC_{50} Konzentrationen bei G62 Zellen betrug 100nM (50% MAPC-TK) bzw. 3,8µM (10% MAPC-TK). G62 Zellen waren damit 100-fach resistenter gegen den von MAPC-TK ausgeübten Bystander Effekt als 9L Zellen.

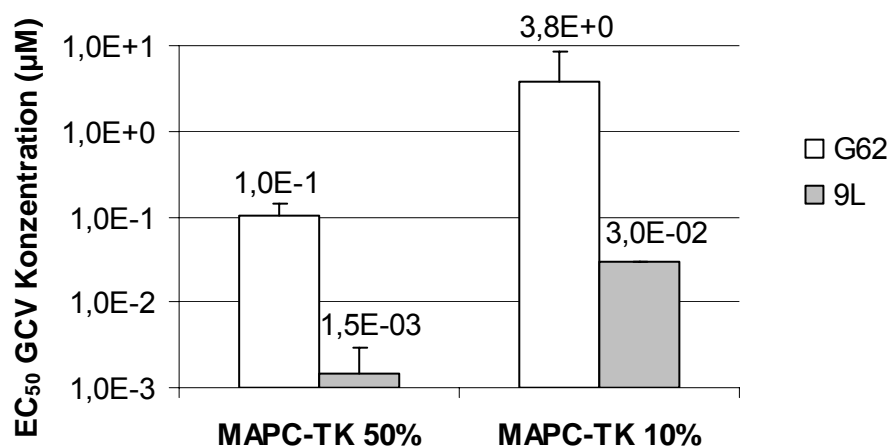


Abbildung 5.19 Die Gliomzelllinien 9L und G62 sind unterschiedlich sensitiv gegen den Bystander Effekt von MAPC-TK Zellen: EC₅₀ Konzentrationen Die Gliomzelllinien 9L-DsRed und G62-DsRed wurden gemischt mit 50% oder 10% nativen MAPC oder MAPC-TK ausgesät. Nach Zugabe von GCV und dreitägiger Inkubation wurden Zellen lysiert und die Fluoreszenzintensität in den Lysaten quantifiziert. Konzentrationen von GCV, bei welchen die Fluoreszenz relativ zu Kontrollansätzen um 50% abgenommen hatte (EC₅₀ Konzentration), wurde durch Extrapolation ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der EC₅₀ Konzentrationen aus drei unabhängigen Versuchen.

5.5.2 Gliomtherapie mit HSV-TK-exprimierenden MAPC *in vivo*

HSV-TK-exprimierende MAPC übten nach Zugabe von GCV einen starken Bystander Effekt auf 9L Gliomzellen *in vitro* aus (Abbildung 5.18). Es wurde nun getestet, ob der MAPC-TK Bystander Effekt auf 9L Gliomzellen einen therapeutischen Effekt *in vivo* bewirkt. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Miletic, Universität Köln, durchgeführt. MAPC-TK Zellen wurden in etablierte 9L-DsRed Gliome in Ratten injiziert und den Ratten wurde anschließend GCV verabreicht.

Ergebnisse sind in Abbildung 5.20 dargestellt. Mit MAPC-TK und GCV therapierte Ratten überlebten 22-31 Tage, während Ratten in den beiden Kontrollgruppen nach 15-19 Tagen starben. Damit war die Überlebenszeit in der mit MAPC-TK therapierten Gruppe signifikant höher als in den Kontrollgruppen ($P < 0,01$).

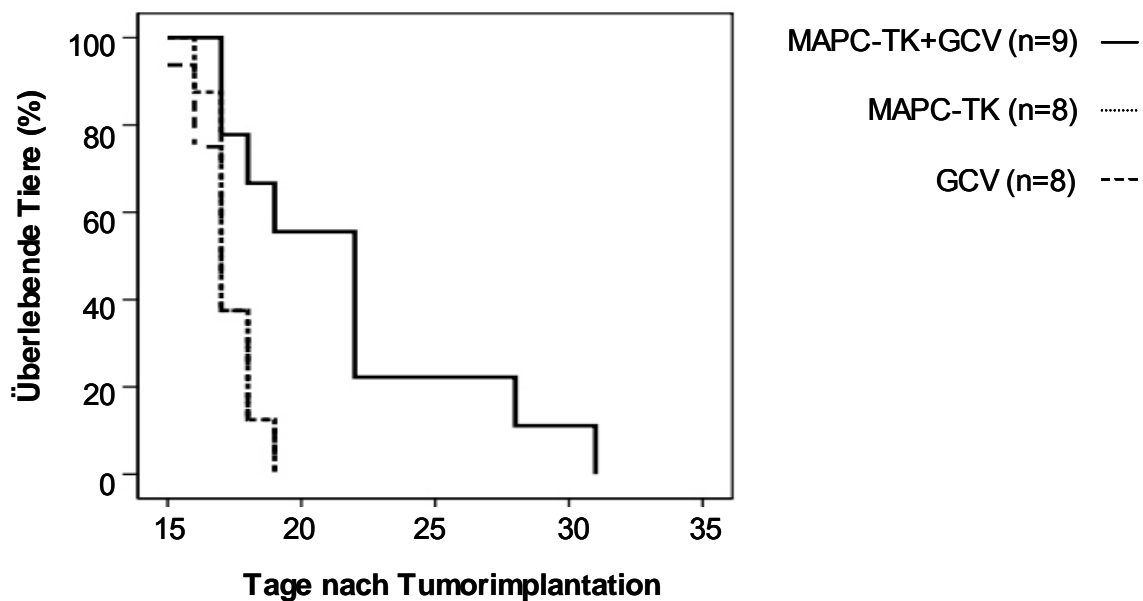


Abbildung 5.20 Der MAPC-TK Bystander Effekt bewirkt einen therapeutischen Effekt im 9L Gliommodell *in vivo*. 9L-DsRed Zellen (6×10^4) wurden in Gehirne von Fischer Ratten injiziert. Nach 5 Tagen wurden MAPC-TK (6×10^5) intratumoral injiziert. Nach weiteren 4 Tagen wurde GCV (30mg/kg) an zehn darauffolgenden Tagen durch i.p. Injektion appliziert. Eine Kontrollgruppe (TK) erhielt nur MAPC-TK Injektion, eine zweite Kontrollgruppe nur GCV Injektion. Überleben der Ratten wurde über 35 Tage hinweg beobachtet.

5.6 MAPC als stabile Verpackungszellen für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren

Im Abschnitt 5.5 wurde gezeigt, dass HSV-TK-exprimierende MAPC einen Bystander Effekt auf Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* ausüben können. Zur Intensivierung eines Antitumoreffekts wurde jedoch eine stärkere Distribution des therapeutischen Gens sowie dessen direkte Expression in Gliomzellen angestrebt. Die folgenden Experimente zielten deshalb darauf, eine stabile Verpackungszelllinie für retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren auf der Basis von MAPC zu etablieren.

5.6.1 Stabile Expression von MLV Gag-Pol in MAPC

MAPC wurden mit dem MLV Gag-Pol Expressionsplasmid M242 transfiziert. Durch Zugabe von Blasticidin wurden Zellen, welche M242 stabil exprimierten, selektioniert. Vier der heranwachsenden Klone wurden isoliert (Klone 3.1 bis 3.4), die restlichen Klone wurden zum Pool P3 vereinigt. Gag Expression in Klonen 3.1 bis 3.4 wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. In den vier Klonen konnte Gag Protein in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden, wobei Klon 3.1 die stärkste Gag Expression zeigte (Abbildung 5.21).

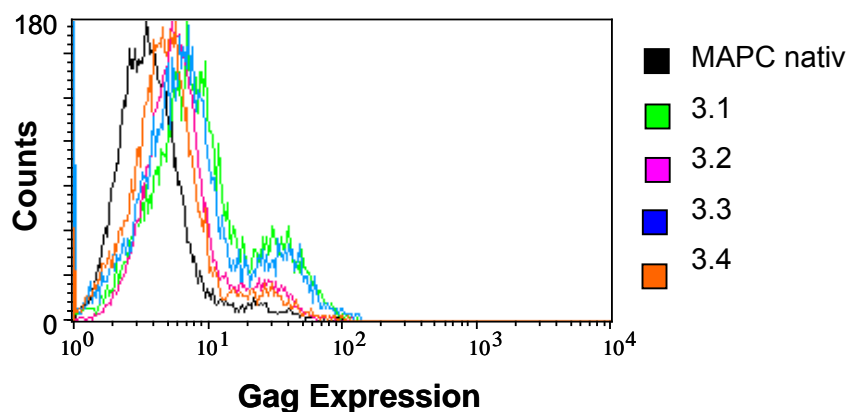


Abbildung 5.21 MAPC exprimieren nach stabiler Transfektion mit M242 MLV Gag. Gag Expression in den Klonen 3.1 bis 3.4 wurde durch intrazelluläre Färbung mit einem MLV-Gag (p30)-spezifischen Antikörper nachgewiesen und durchflusszytometrisch quantifiziert.

5.6.2 Stabile Expression von LCMV-GP in MAPC

Zur stabilen Expression von LCMV-GP in MAPC wurden verschiedene Strategien getestet. Der Klonpool P3 wurde zunächst mit dem Plasmid M533 (Plasmidkarte siehe Anhang) transfiziert und anschließend mit Puromycin selektioniert um Klone zu isolieren, welche die *lcmv-gp/IRES/puroR* Kasette in ihr Genom integriert hatten. Wie nach stabiler Transfektion mit M242 wuchsen zunächst Klone. Diese stellten ihr Wachstum aber zumeist nach wenigen Tagen ein. Im Gegensatz dazu wuchsen zahlreiche Klone nach stabiler Transfektion mit dem Kontrollplasmid M525 (Plasmidkarte und Klonierungsstrategie siehe Anhang), welches nur eine *IRES/puroR* Kasette beinhaltet, heran. Diese Klone unterschieden sich außerdem in Größe und Morphologie von Klonen, welche mit M533 transfiziert worden waren (Abbildung 5.22).

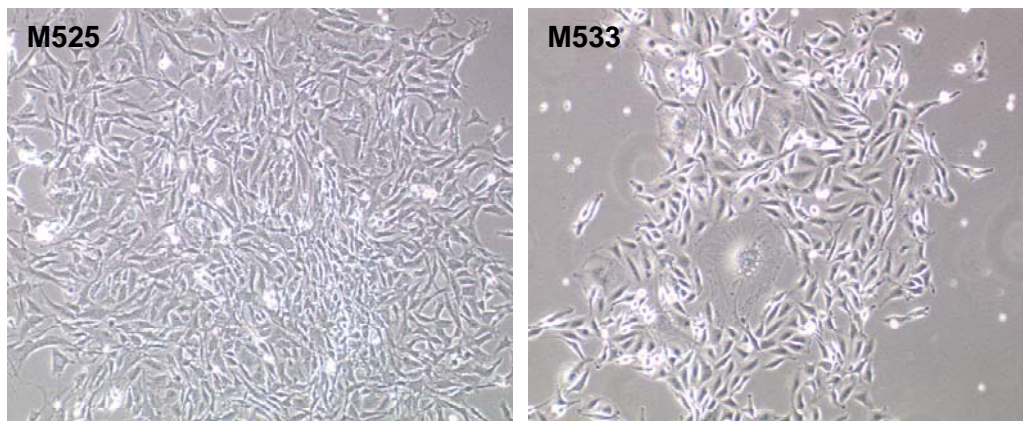


Abbildung 5.22 MAPC zeigen nach Transfektion mit einem LCMV-GP Expressionsplasmid verlangsamtes Wachstum und veränderte Morphologie. Der Klonpool P3 wurde mit M533 bzw. mit dem Kontrollplasmid M525 transfiziert und mit Puromycin selektioniert. Die Kolonien wurde 12 Tage nach Transfektion im Phasenkontrastmikroskop visualisiert und fotografiert. Vergrößerung 20x

Da nach stabiler Transfektion mit M533 keine Klone expandiert werden konnten, sollte LCMV-GP durch lentivirale Transduktion stabil in MAPC exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde der lentivirale SIN Vektor M566 kloniert (Plasmidkarten und Klonierungsstrategie siehe Anhang). M566 enthält das *lcmv-gp* Gen unter Kontrolle des SFFV Promotors sowie eine IRES Region und ein Puromycinresistenzgen. Der Klonpools P3 sowie der Klone 3.1 bis 3.4 wurden mit M566 transduziert und mit Puromycin selektioniert. Transduzierte Zellen wurden dann zu den Pools P3/566, 3.1/566, 3.2/566 und 3.3/566 und 3.4/566 vereinigt. Wie in Abbildung 5.23 A dargestellt führte Transduktion mit M566 zu Expression von LCMV-GP in MAPC. LCMV-GP Expression blieb über mehrerer Wochen in Kultur hinweg stabil (Abbildung 5.23 B).

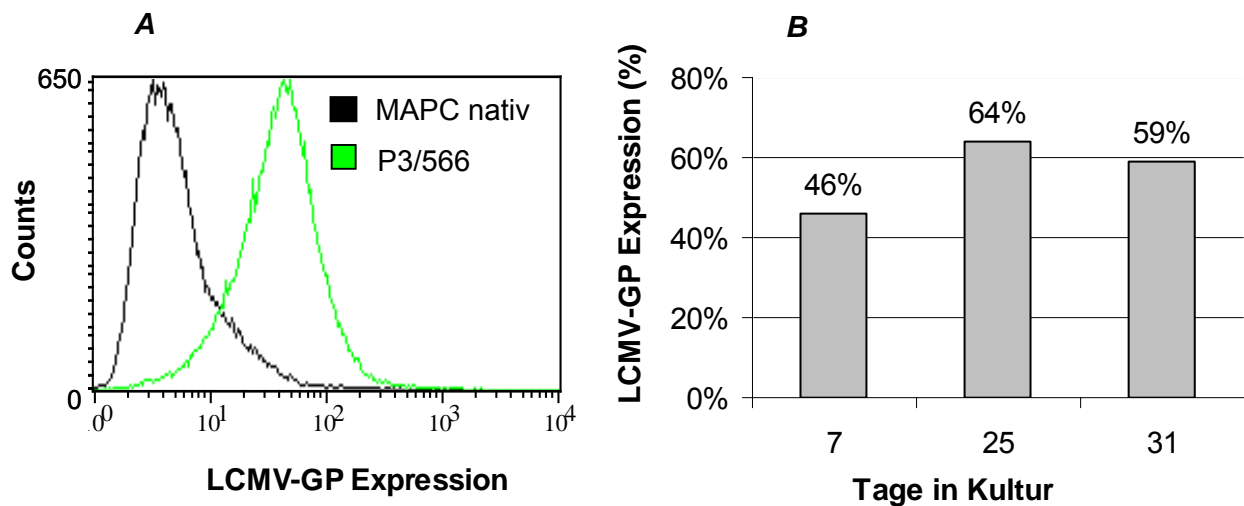


Abbildung 5.23 MAPC exprimieren nach Transduktion mit M566 stabil LCMV-GP. Der Pool P3 wurde mit M566 transduziert und mit Puromycin selektioniert. Sieben Tage (A) bzw. 7, 25 und 31 (B) Tage nach Transduktion wurden Zellen mit dem LCMV-GP-spezifischen Antikörper KL25 und PE-gekoppeltem Sekundärantikörper gefärbt. Die LCMV-GP Expression wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

5.6.3 Produktion retroviraler Pseudotypvektoren mit *gfp* Gen in MAPC

Die Produktion retroviraler Vektoren in den MAPC Verpackungszelllinien P3/566, 3.1/566, 3.2/566, 3.3/566 und 3.4/566 wurde anschließend überprüft. Die Pools wurden dazu mit dem retroviralen Vektor M56a mit *gfp* Transgen (Plasmidkarte siehe Anhang) zu >95% transduziert. Vektortiter in Zellkulturüberständen wurden durch Titration auf TE671 Zellen bestimmt. Titer variierten zwischen 3×10^2 und 4×10^3 TU/ml, wobei die höchsten Vektortiter in Zellkulturüberständen von 3.1/566 gemessen wurden (Abbildung 5.24). In diesem Pool wurden daraufhin Vektortiter über einen längeren Zeitraum hinweg wiederholt gemessen. Wie in Abbildung 5.25 dargestellt führte weder fortdauernde Kultivierung noch wiederholtes Einfrieren von 3.1/566 zu einem Titerverlust.

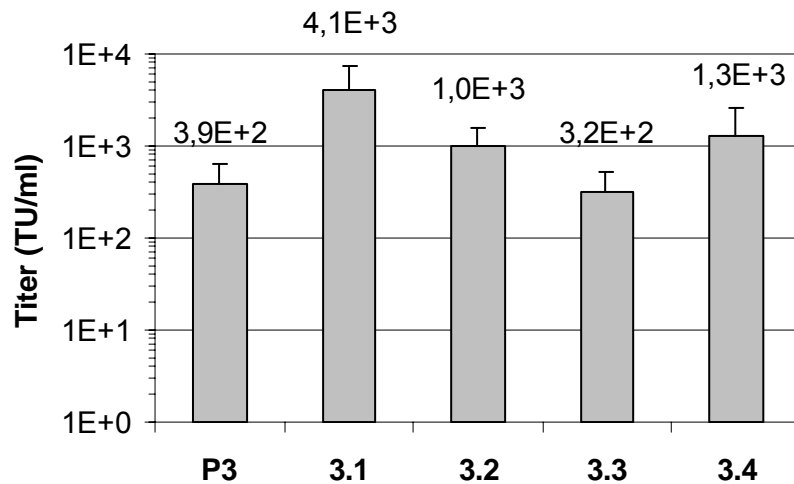


Abbildung 5.24 MAPC Verpackungszellen produzieren retrovirale Vektoren mit *gfp* Transgen. Die Verpackungszelllinien P3/566 und 3.1 bis 3.4/566 wurden mit dem retroviralen Vektor M56a transduziert. Zellkulturüberstände wurden auf TE671 Zellen titriert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Vektortiter aus zwei unabhängigen Titrationen.

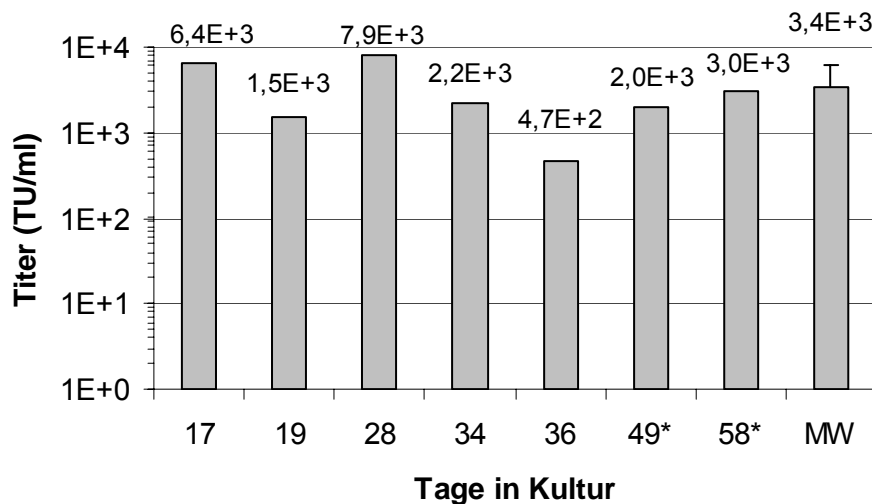


Abbildung 5.25 Vektorproduktion in 3.1/566 bleibt auch bei fortdauernder Kultivierung der Zellen und nach dem Einfrieren stabil. Die Verpackungszelllinie 3.1/566 wurde mit dem retroviralen Vektor M56a transduziert. Vektorhaltige Zellkulturüberstände wurden auf TE671 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten titriert. MW: Mittelwert aller gemessenen Titer. * Zellen wurden 3x eingefroren und wieder aufgetaut.

5.6.4 Test auf Produktion replikationskompetenter Retroviren in MAPC Verpackungszellen

Um zu überprüfen, ob MAPC Verpackungszelllinien replikationskompetente Retroviren freisetzen wurde wie schon bei C17.2 (Abschnitt 5.4.3) ein PCR-basierter RCR Test durchgeführt. TE617 Zellen wurden mit Überständen von 3.1/566/56a, welche zuvor 49 Tage lang kultiviert worden waren, transduziert. Überstände wurden einmal auf TE617 Zellen passagiert, genomische DNA aus TE617 wurde anschließend isoliert und einer PCR unterzogen. Als PCR Kontrolle diente genomische DNA aus TE671 Zellen, welche mit Überständen von C17.2 Verpackungszellen transduziert worden waren. Wie in Abbildung 5.26 gezeigt konnten in TE671 nach Transduktion mit MAPC Überständen weder *MLV gag*, noch *A-MLVenv* oder *lcmv-gp* Sequenzen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass auch nach fortdauernder Kultivierung der MAPC Verpackungszellen kein RCR freigesetzt wurde.

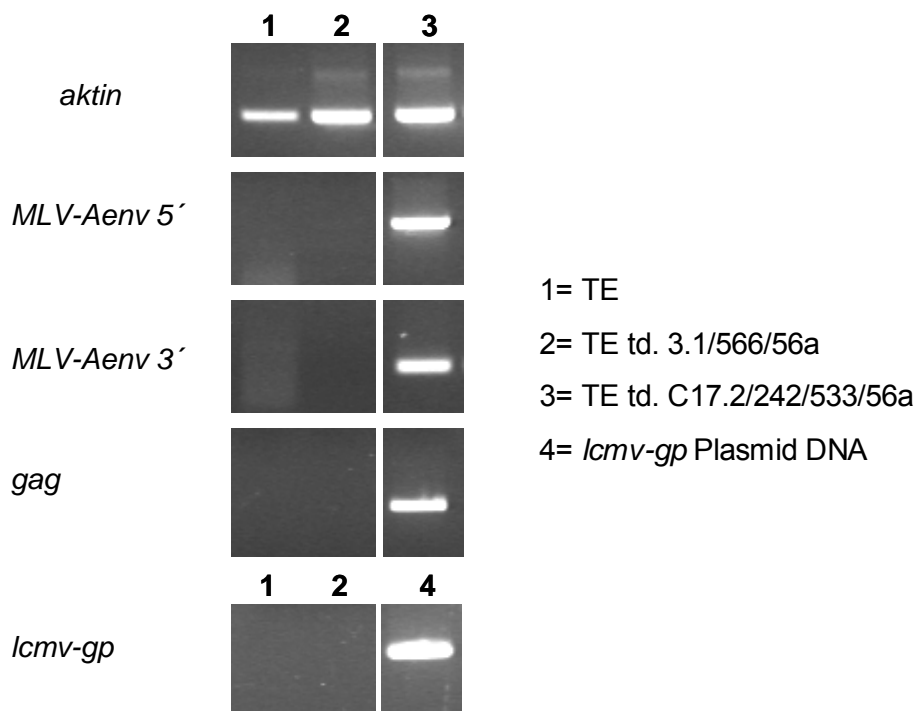


Abbildung 5.26 Die MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a produziert auch nach mehrwöchiger Kultivierung der Zellen keine replikationskompetenten Retroviren.

Überstände von 3.1/566/56a wurden nach 49 Tagen in Kultur abgenommen und auf TE671 Zellen überführt. Nach 9 Tagen wurden Überstände von transduzierten TE617 Zellen auf frische TE671 Zellen überführt. Nach weiteren 3 Tagen wurden TE671 Zellen pelletiert, genomische DNA wurde extrahiert und einer PCR mit *aktin*-, *MLV gag*-, *A-MLVenv*- oder *lcmv-gp*-spezifischen Primern unterzogen. Als PCR Kontrolle für *lcmv-gp* diente Plasmid DNA (50ng/Ansatz).

5.6.5 Produktion retroviraler Pseudotypvektoren mit *hsv-tk* Gen in MAPC

Nachdem eine Verpackungszelllinie für den Vektor M56a auf MAPC Basis etabliert worden war, sollte nun auch eine Verpackungszelllinie für den therapeutischen Vektor M508, welcher ein *hsv-tk* Gen (Plasmidkarte siehe Anhang) enthält, erzeugt werden. Transduktion der MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566 mit dem retroviralen Vektor M508 führte zu einer deutlichen Zytotoxizität. Der Prozentsatz transduzierter Zellen in der Kultur nahm außerdem rasch ab. Es wurden deshalb nach Transduktion mit M508 Klone isoliert und expandiert, um so die Stabilität der M508 Expression zu gewährleisten. Zellkulturüberstände von fünf Klonen (3.1/566/508.1 bis 508.5) wurden auf TE617 Zellen transferiert, um die Produktion von Vektoren zu überprüfen. In mehreren aufeinanderfolgenden Versuchen konnte jedoch keine Transduktion von TE617 festgestellt werden. Um sicherzustellen, dass Expression von Gag in den isolierten Klonen stattfand, wurden Färbungen mit einem MLV Gag-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Verpackungszelllinie 3.1/566/56a diente als Positivkontrolle. Da sowohl 3.1/566/56a als auch die Klone 3.1/566/508.2 bis 508.5 bezüglich Gag auf den gemeinsamen Ausgangsklon 3.1 zurückgehen, waren erwartungsgemäß keine Unterschiede in der Expression von Gag erkennbar (Abbildung 5.27)

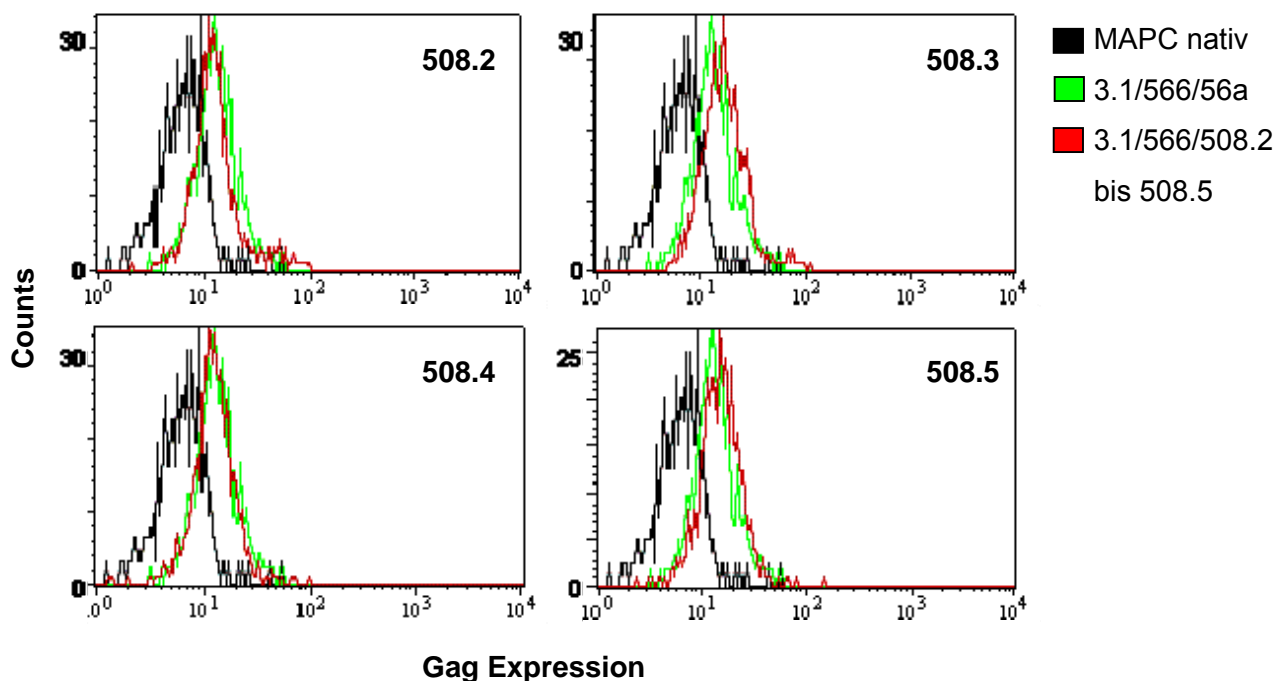


Abbildung 5.27 Die Klone 3.1/566/508.2 bis 508.5 und der Pool 3.1/566/56a exprimieren gleiche Mengen an MLV Gag. Gag Expression in 3.1/566/56a und 3.1/566/508.1 bis 508.4 wurde durch Färbung der Zellen mit einem MLV Gag-spezifischen Primärantikörper und APC-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen und durchflusszytometrisch quantifiziert.

Auch die Höhe der LCMV-GP Expression in den Klonen 3.1/566/508.1 bis 508.5 wurde ermittelt und mit der LCMV-GP Expression in 3.1/566/56a verglichen. Die Stärke der LCMV-GP Expression in den isolierten Klonen variierte, war jedoch stets niedriger als in 3.1/566/56a (Abbildung 5.28). In einigen Klonen betrug die LCMV-GP Expression, gemessen an der mittleren Fluoreszenz, nur 50% der Expression in 3.1/566/56a (Abbildung 5.29).

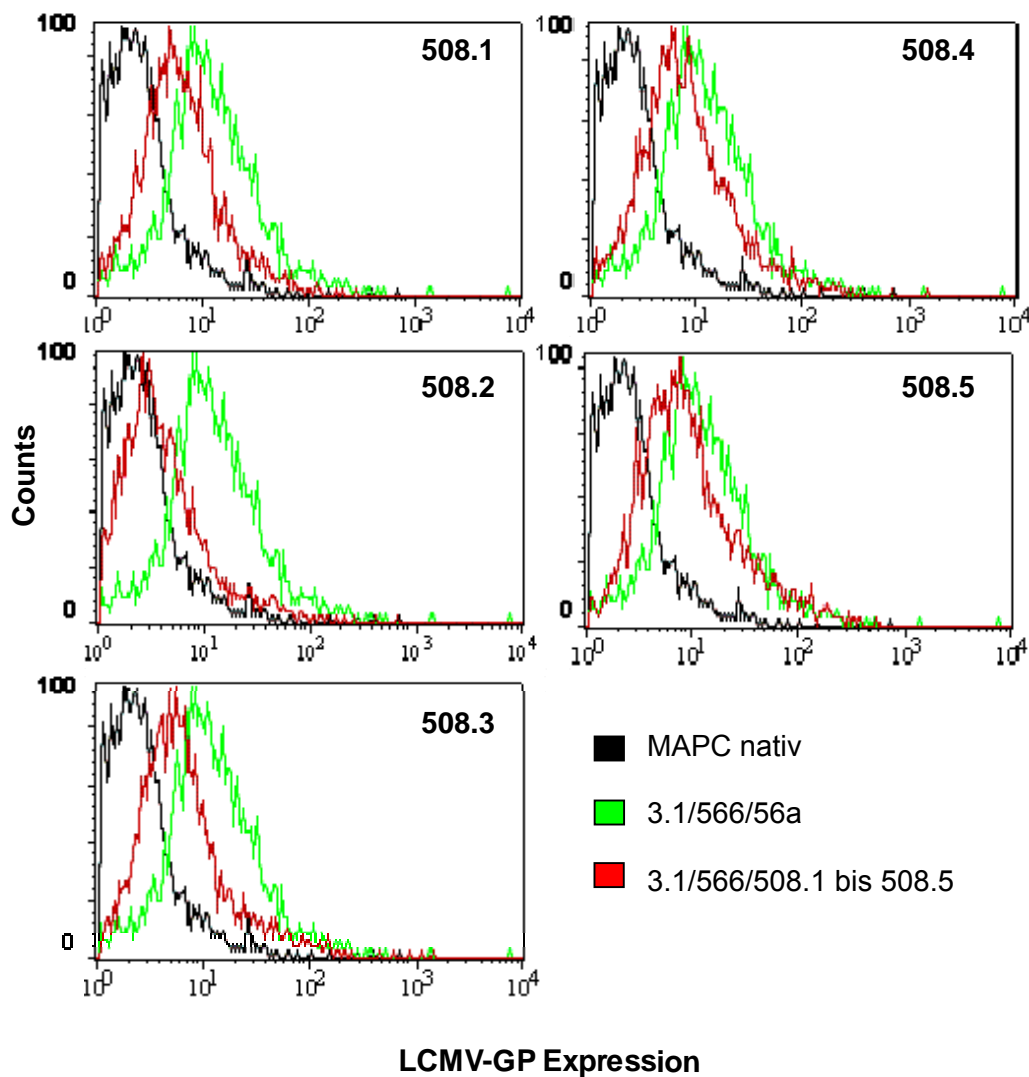


Abbildung 5.28 Die Klone 3.1/566/508.1 bis 508.5 exprimieren LCMV-GP in unterschiedlichen Mengen. LCMV-GP Expression in 3.1/566/56a und 3.1/566/508.1 bis 508.5 wurde durch Färbung der Zellen mit einem LCMV-GP-spezifischen Primärantikörper und APC-gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen und durchfluss-zytometrisch quantifiziert.

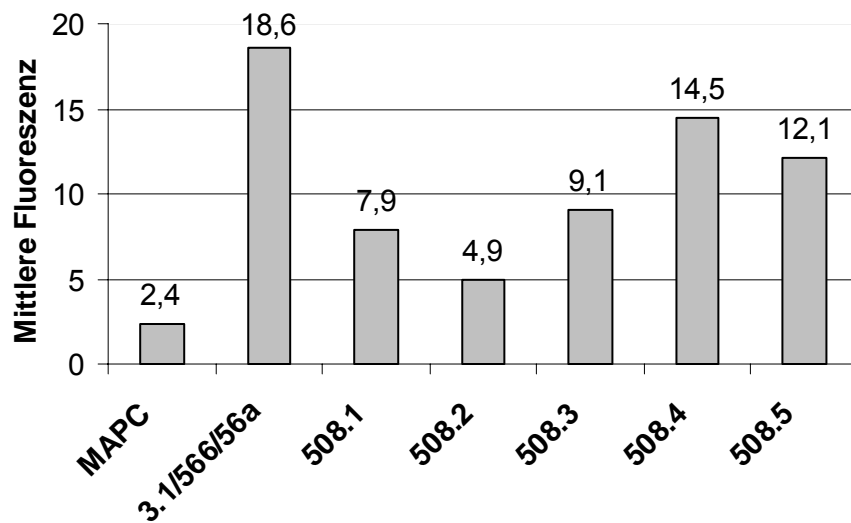


Abbildung 5.29 Die Expressionshöhe von LCMV-GP in den Klonen 3.1/566/508.1 bis 508.5 ist stets niedriger als in 3.1/566/56a. LCMV-GP Expression in 3.1/566/56a und 3.1/566/508.1 bis 508.5 wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt ist die mittlere APC-Fluoreszenz der einzelnen Klone im Vergleich mit dem Klonpool 3.1/566/56a.

Auch die Expression des Vektors M508 in den einzelnen Klonen wurde untersucht. Die Klone 3.1/566/508.1 bis 508.5 exprimierten zu über 90% GFP (Abbildung 5.30) und waren im Vergleich mit 3.1/566/56a deutlich sensitiver gegen GCV (Abbildung 5.31). Dies lässt auf korrekte Expression des Vektors M508 schließen. Die Ursache für die ineffiziente Verpackung des therapeutischen Vektors konnte daher nicht eindeutig geklärt werden.

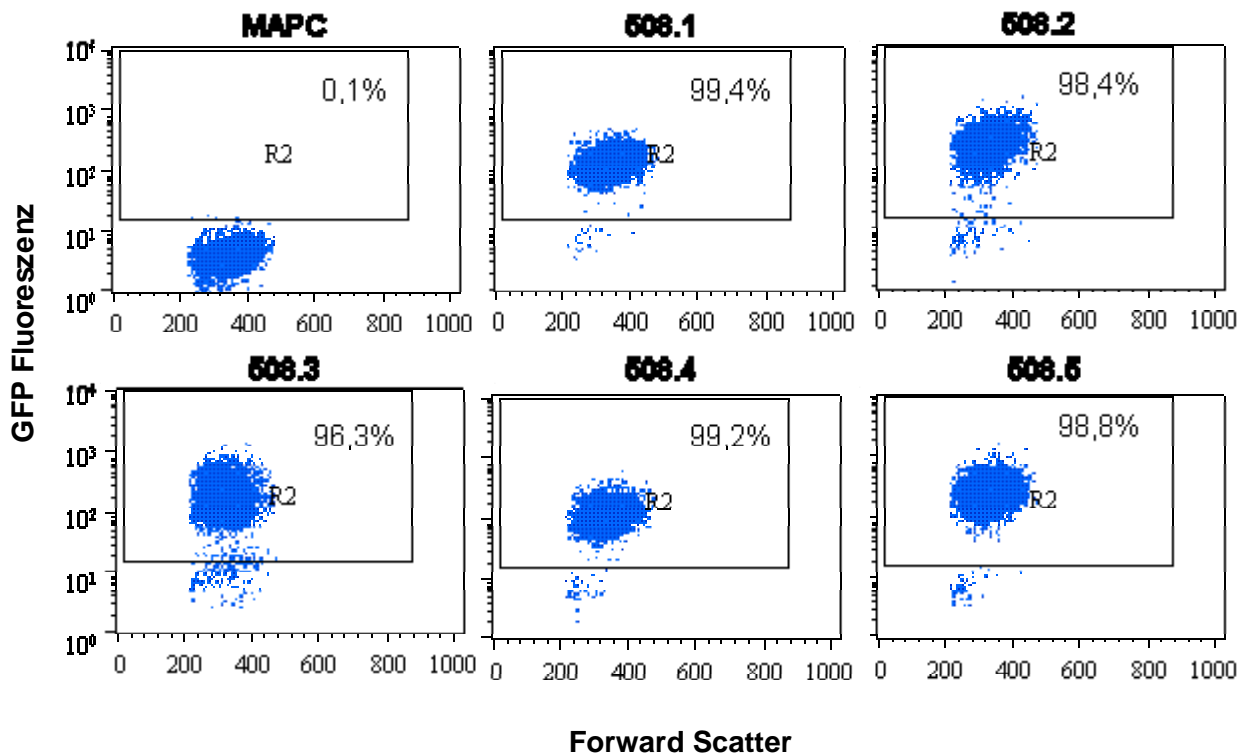


Abbildung 5.30 Die Klone 3.1/566/508.1 bis 508.5 exprimieren zu einem hohen Anteil GFP. GFP Expression in den Klonen 3.1/566/508.1 bis 508.5 wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

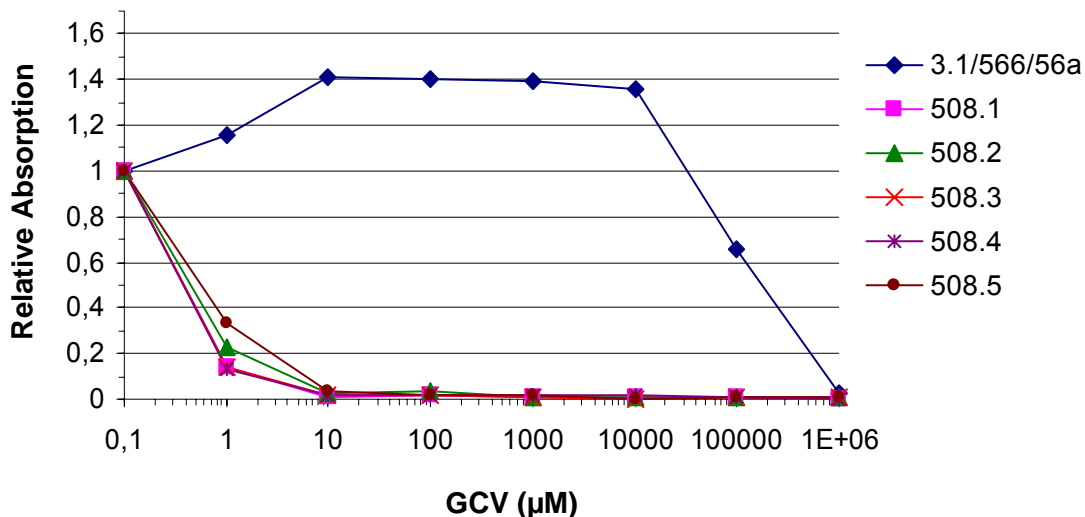


Abbildung 5.31 Die Klone 3.1/566/508.1 bis 508.5 sind im Gegensatz zu 3.1/566/56a stark sensitiv gegen GCV. Die Klone 3.1/566/508.1 bis 508.5 und der Pool 3.1/566/56a wurden mit GCV in Konzentrationen von 1nM bis 1mM inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Zellviabilität mittels eines WST-Tests bestimmt. Dargestellt sind Absorptionen relativ zu Kontrollen (ohne Zugabe von GCV).

5.6.6 Transduktion von Gliomzellen mit Vektorüberständen von stabilen MAPC Verpackungszellen

Die Verpackungszelllinie 3.1/566/56a produzierte kontinuierlich retrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren mit *gfp* Transgen *in vitro* (Abschnitt 5.6.3). Titer gemessen auf TE671 Zellen betragen durchschnittlich 3×10^3 TU/ml. Es sollte nun die Effizienz der Transduktion von Gliomzellen mit MAPC Überständen getestet werden. Diese Testung erfolgte zunächst *in vitro* auf der Rattengliomzelllinie 9L und der humanen Gliomzelllinie G62. Gliomzellen wurden mit Zellkulturüberständen der Verpackungszelllinie 3.1/566/56a inkubiert. Durchschnittliche Titer auf TE671 betragen $1,5 \times 10^3$ TU/ml (Abbildung 5.32), was in etwa den in vorausgehenden Experimenten erzielten Titer entspricht. Titer auf 9L waren vergleichbar mit Titern gemessen auf TE671. Dagegen waren Titer auf den humanen Gliomzellen G62 viermal höher als auf TE671.

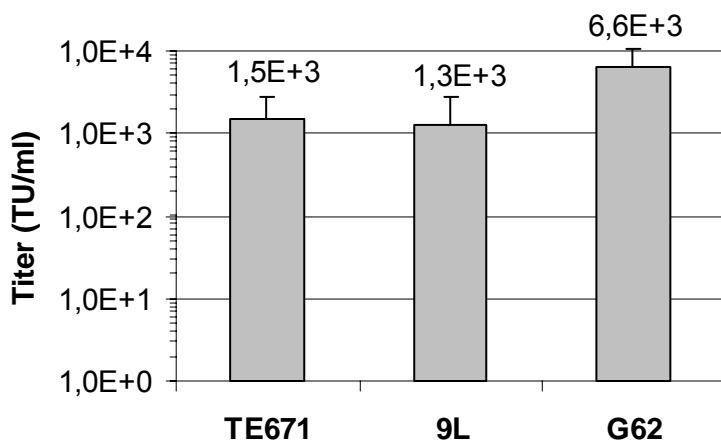


Abbildung 5.32 Vektorüberstände der MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a transduzieren Gliomzellen *in vitro*. Zellkulturüberstände der Verpackungszellen 3.1/566/56a wurden auf TE671 Zellen, der Rattengliomzelllinie 9L und der humanen Gliomzelllinie G62 titriert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Vektortiter aus drei unabhängigen Titrationen.

Die MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a wurde anschließend in etablierte 9L Gliome injiziert, um Migration und Vektorproduktion *in vivo* zu untersuchen. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Dr. H. Miletic, Universität Köln, durchgeführt. Wie in Abbildung 5.33 dargestellt zeigten MAPC Verpackungszellen eine ebenso effiziente Tumordinfiltration wie die zuvor in Migrationsstudien getesteten MAPC (Abschnitt 5.3). MAPC Verpackungszellen entfernten sich weit von der Injektionsstelle (Pfeile in Abbildung 5.33 A und B) und infiltrierten

große Teile des soliden Tumorgewebes. Die Migration der VPC endete jedoch stets an der Grenze zu normalem Hirngewebe.

Tumortransduktion war erkennbar durch Kolo­kalisierung der roten Fluoreszenz von 9L-DsRed Zellen und der grünen Fluoreszenz des transferierten GFP (Abbildung 5.34). Transduktion von 9L-DsRed Zellen erfolgte sowohl in soliden als auch in infiltrierenden Tumorbereichen (Abbildung 5.34 A, C). In einigen soliden Tumorabschnitten erfolgte Transduktion jedoch nur mit geringer Effizienz, bzw. war trotz Anwesenheit von MAPC nicht nachweisbar (Abbildung 5.34 B). Interessanterweise befanden sich MAPC Verpackungszellen auch in direkter Nähe zu einzelnen, infiltrierenden Gliomzellen (Abbildung 5.34 D) und vermittelten Transduktion dieser Zellen (siehe Pfeil in Abbildung 5.34 D).

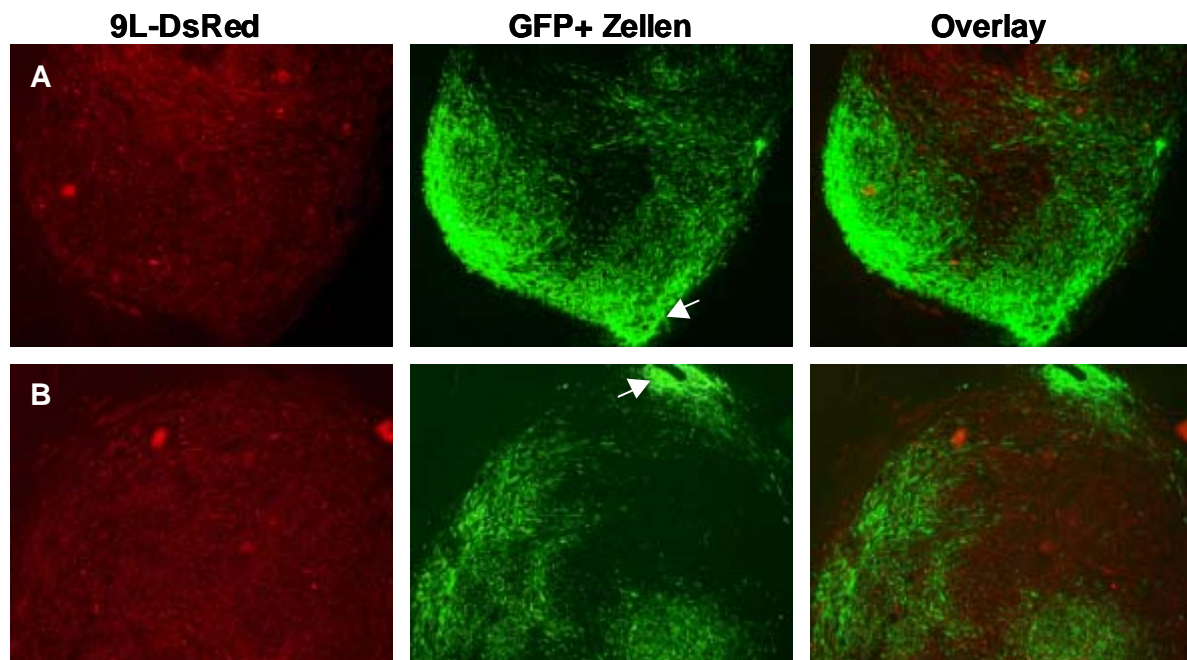


Abbildung 5.33 MAPC Verpackungszellen infiltrieren 9L-DsRed Gliome *in vivo* mit hoher Effizienz und Spezifität. Die MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a (4×10^5 Zellen) wurde intratumoral in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Ratten getötet, Gehirne entnommen und Schnitte angefertigt ($12 \mu\text{M}$). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Pfeile deuten die Injektionsstelle der MAPC Verpackungszellen an. Vergrößerung: 2,5-fach

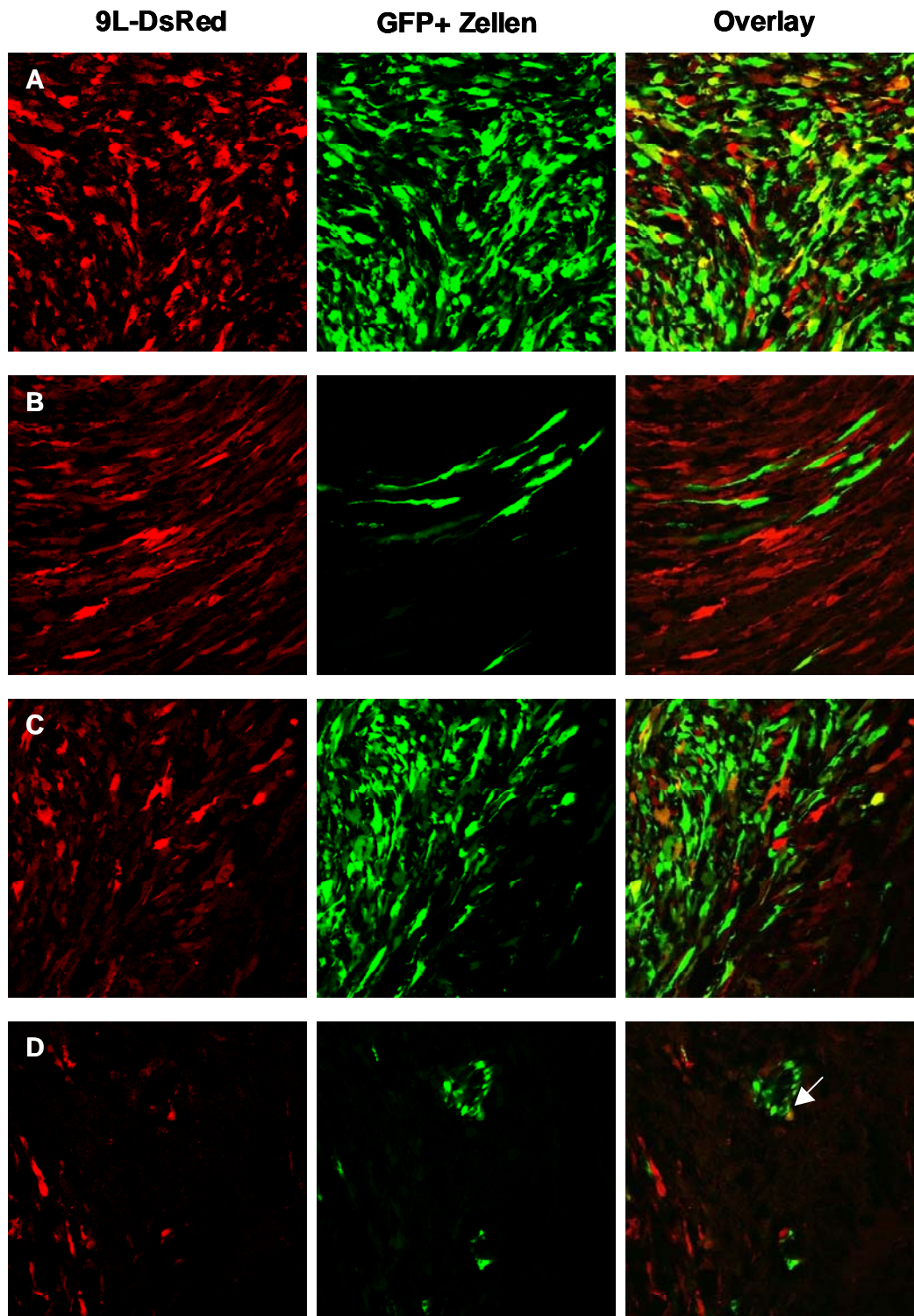


Abbildung 5.34 MAPC Verpackungszellen transduzieren 9L-DsRed Gliome *in vivo*. Die MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a (4×10^5 Zellen) wurde intratumoral in etablierte 9L-DsRed Gliome injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Ratten getötet, Gehirne entnommen und Schnitte angefertigt ($12 \mu\text{m}$). Die Auswertung erfolgte unter dem konfokalen Mikroskop. Der Pfeil markiert eine transduzierte 9L-DsRed Zelle in der Infiltrationszone des Tumors. Vergrößerung: 40-fach

6 Diskussion

Ein Hauptproblem bei der Genterapien von Tumorerkrankungen ist der effiziente Transfer des therapeutischen Vektors. In dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien zur Steigerung der Transduktionseffizienz in der Genterapie von Hirntumoren verfolgt.

6.1 Lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren vermitteln effizienten und spezifischen Gentransfer in Gliomzellen

Gammaretrovirale LCMV-GP Pseudotypvektoren zeichnen sich durch einen starken Tropismus für humane Gliomzellen *in vitro* aus [82]. Der Tropismus lentiviraler LCMV-GP-pseudotypisierter Vektoren für Gliomzellen *in vitro* und *in vivo* wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht. Diese Studien basierten auf der Überlegung, dass lentivirale Vektoren eine effizientere Transduktion von Gliomzellen *in vivo* ermöglichen, da sie auch Gentransfer in mitotisch inaktive Zellen vermitteln können [2].

6.1.1 Selektiver Tropismus lentiviraler LCMV-GP Pseudotypen für Gliomzellen *in vitro* und *in vivo*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass lentivirale LCMV-GP Pseudotypen einen effizienteren Gentransfer in die humane Gliomzelllinie G62 vermitteln als VSV-G Pseudotypen. In einer vergleichbaren Studie transduzierten lentivirale LCMV-GP Pseudotypen humane Gliomzelllinien ebenfalls mit gleicher oder höherer Effizienz als VSV-G Pseudotypen [105]. Anders als LCMV-GP Pseudotypen zeigten VSV-G Pseudotypen einen starken Tropismus für kultivierte Neurone und Astrozyten *in vitro*. Der ausgeprägte Neurotropismus lentiviraler VSV-G Pseudotypen ist bereits aus früheren Studien bekannt [35, 106]. Transduktion normaler Hirnzellen, vor allem von nur beschränkt regenerationsfähigen Neuronen, muss jedoch in der Suizidgentherapie von Gliomen weitgehend vermieden werden. Im Gegensatz zu VSV-G Pseudotypen transduzierten lentivirale LCMV-GP Pseudotypen Neurone *in vitro* mit sehr geringer Effizienz.

Der unterschiedliche Tropismus beider Pseudotypen für normale Hirnzellen wurde durch unsere Gruppe und von anderen Gruppen *in vivo* bestätigt: VSV-G Pseudotypen bewirkten insgesamt einen stärkeren Gentransfer in normale Hirnzellen als LCMV-GP Pseudotypen und vermitteln eine effiziente Transduktion von Neuronen. LCMV-GP Pseudotypen transduzieren nach Injektion in gesundes Hirngewebe dagegen fast ausschließlich Gliazellen [106-109]. Auch nach Injektion beider Pseudotypen in Rattengliome *in vivo* wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: während LCMV-GP Pseudotypen Gliomzellen mit hoher Spezifität und Effizienz transduzierten, vermittelten VSV-G Pseudotypen einen starken Gentransfer in normales Hirngewebe in der Tumorperipherie.

In dieser Arbeit wurde damit erstmals gezeigt, dass LCMV-GP pseudotypisierte lentivirale Vektoren ein optimales Vektorsystem zur effizienten Transduktion von Gliomzellen *in vivo* darstellen. Die Gefahr der Zerstörung von gesundem Hirngewebe wird durch Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren mit LCMV-GP verringert. Es muss allerdings noch gezeigt werden, ob der Tropismus lentiviraler LCMV-GP Pseudotypen für normale Hirnzellen des Menschen mit dem Tropismus für Hirnzellen der Ratte oder Maus identisch ist. Hinweise darauf könnten Studien mit kultivierten menschlichen Hirnzellen liefern.

Die Ursache der selektiven Transduktion von Gliomzellen durch lentivirale LCMV-GP Pseudotypen ist derzeit nicht bekannt. Der zelluläre Rezeptor für LCMV ist das periphere Membranprotein α -Dystroglycan (α -DG) [49]. α -DG bindet an das Transmembranprotein β -DG, welches wiederum mit zytoplasmatischen Bindungspartnern interagiert. α - und β -DG stellen so ein Bindeglied zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett dar. α -DG wird in dem meisten ZNS Regionen, wie z.B. im Hippocampus, im Kleinhirn, im Hirnstamm und in der Großhirnrinde exprimiert. [110, 111]. In dieser Arbeit durchgeführte quantitative PCR ergab ähnliche Mengen an α -DG Transkripten in kultivierten Neuronen und Astrozyten des Hippocampus und 9L Zellen. Damit korrelierte die α -DG Expression nicht mit deren Infizierbarkeit durch lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass durch ko- oder posttranslationale Mechanismen unterschiedliche Mengen an α -DG Protein exprimiert werden. Dies könnten z.B. unterschiedlich schnelle Degradation oder Abspaltung von α -DG von der Zellmembran („Shedding“) beinhalten [112, 113]. Die tatsächlich an der Zelloberfläche vorhandene α -DG Menge sollte daher durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Unterschiede im Glykosylierungsmuster von α -DG die Bindung von LCMV-GP beeinflusst haben [49, 114].

Neben α -DG existiert vermutlich noch ein weiterer bislang unbekannter Rezeptor für LCMV-GP [115]. Unterschiedlichen Expressionsstärke dieses Rezeptors auf Gliomzellen und normalen Hirnzellen könnte ebenfalls den Tropismus von LCMV-GP Pseudotypen beeinflusst haben.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass LCMV außer Gliazellen vor allem auch neurale Vorläuferzellen mit glialem Phänotyp infiziert [107, 116]. Gliomzellen weisen bezeichnende Ähnlichkeit mit neuronalen Stammzellen auf [13-15] und es wird spekuliert, dass Gliome aus transformierten NSC hervorgehen [117]. In diesem Fall ist es nicht unerwartet, dass Gliomzellen wie NSC von LCMV-GP Pseudotypen effizient transduziert werden.

6.1.2 Suizidtherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen *in vitro*

Lentiviraler Transfer von *hsv-tk* Gens sensibilisierte die humane Gliomzelllinie G62 und die Rattengliomzelllinie 9L gegen GCV *in vitro*. Diese Sensibilisierung war in G62 Zellen allerdings weniger stark ausgeprägt als in 9L. Die Effektivität der HSV-TK/GCV Therapie ist abhängig vom GCV Einbau in neu synthetisierte DNA und korreliert daher mit der Zellteilungsrate [118]. G62 Zellen weisen einen langsameren Zellzyklus auf als 9L Zellen und verfügen so vermutlich über eine höhere intrinsische Resistenz gegen eine HSV-TK/GCV Therapie. Auch andere Resistenzmechanismen könnten in G62 Zellen zum Tragen kommen. So verleiht Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 Zellen Resistenz gegen einen HSV-TK/GCV-induzierten Zelltod [119]. Antiapoptotische Proteine werden in humanen Hirntumoren häufig überexprimiert [120].

HSV-TK-exprimierende 9L Zellen übten einen starken Bystander Effekt auf untransduzierte Zellen aus, so dass auch nach Transduktion von nur 10% der Zellen die gesamte Kultur durch GCV Gabe abgetötet werden konnte. Die Bystander Effekt-vermittelte Zytotoxizität war bei G62 Zellen dagegen weniger stark ausgeprägt und bewirkte in Kulturen mit 10% transduzierten Zellen nur ein Absterben von maximal 70% der Zellen. Der HSV-TK Bystander Effekt wird hauptsächlich über Transfer von GCV-P über Gap Junctions im umliegende Zellen vermittelt [60, 101, 121-126]. Das häufigste in Gliazellen [102] und glialen Tumorzellen [127] vorkommende Gap Junction Protein ist Connexin 43 (Cx43). Auch 9L Zellen exprimieren Connexin 43 [128] und bilden funktionelle Gap Junctions untereinander [129] und mit murinen Fibroblasten aus [122]. Bekanntermaßen neigen humane Tumorzelllinien und Tumore *in situ* jedoch zu einer Reduktion der Connexin Expression und der Gap Junction Kommunikation [130, 131]. In dieser Arbeit durchgeführte Immunfluoreszenzexperimente bestätigten die Cx43 Expression in 9L und zeigten, dass auch G62 Zellen Cx43 exprimierten. Allerdings war Cx43 in beiden Zelllinien vorwiegend im

Zytoplasma lokalisiert, eine eindeutige Ansammlung von Cx43 an Zellkontaktstellen konnte nicht nachgewiesen werden. Um einen direkten Hinweis auf die Funktionalität von Gap Junctions in 9L und G62, sowie auf deren Mitwirkung am HSV-TK Bystander Effekt zu erhalten, könnten Transferversuche mit radioaktiv markiertem GCV [101], kombiniert mit Gap Junction Inhibitoren [118] durchgeführt werden.

6.1.3 Suizidgentherapie von Gliomen mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen *in vivo*

Die Effektivität einer Suizidgentherapie mit lentiviralen LCMV-GP Pseudotypvektoren wurde *in vivo* im 9L Gliommodell bestätigt. Nach Vektorinjektion und GCV Gabe überlebten 90% der behandelten Ratten, während unbehandelte Ratten zu 90% innerhalb kurzer Zeit starben. Histologische Untersuchung der Tumore nach Vektorinjektion deutete auf Transduktion eines Großteils des Tumorgewebes hin. Diese Ergebnisse verdeutlichen die hohe Wirksamkeit einer lentiviralen Suizidgentherapie mit LCMV-GP Pseudotypvektoren *in vivo*.

Es ist dennoch fraglich, ob durch bloße Vektorinjektion ein guter Therapieeffekt im Patienten erzielt werden kann. Humane Gliome erreichen anders als Gliome in der Ratte einen Durchmesser von mehreren Zentimetern, die Transduktion von Tumorgewebe beschränkt sich jedoch auf die unmittelbare Umgebung der Vektorinjektionsstelle [22, 28, 76]. Entsprechend konnte in humanen Tumoren nach Injektion hochtitriger adenoviraler Vektoren, die wie lentivirale Vektoren ruhende Zellen infizieren, nur eine Transduktion von maximal 11% des Tumorgewebes erzielt werden [76]. Ein signifikanter therapeutischer Effekt war durch intratumorale Injektion adenoviraler Vektoren ebenfalls nicht zu erreichen [132]. Ein weiteres Ziel der Gliomgentherapie ist die Zerstörung invasiver Tumorzellen, welche in gesundes Hirngewebe vordringenden und dadurch nicht für eine operativen Entfernung zugänglich sind. Diese Zellen werden durch bloße Vektorinjektion ebenfalls nicht effizient zerstört [30]. Diese Einschränkungen des Gentransfers durch Vektorinjektion könnten jedoch durch Applikation migratorischer vektorproduzierender Zellen aufgehoben werden [1, 133].

6.2 Tumorinfiltration durch neurale und multipotente adulte Stammzellen

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollten stabile Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypvektoren auf Basis migratorischer Zellen etabliert werden. In Vorversuchen wurden zunächst Zelltypen identifiziert, welche tumorspezifische Migrationseigenschaften *in vivo* zeigten. Hierzu wurden verschiedene humane Zelllinien, murine NIH 3T3 Fibroblasten, die neurale Stammzelllinie C17.2 aus der Maus und multipotente adulte Stammzellen (MAPC) der Ratte auf tumorspezifische Migrationsfähigkeit untersucht. Die Auswahl der Zelltypen erfolgte aufgrund ihrer bekannten Fähigkeit zur Vektorproduktion (TE671, 293T, NIH 3T3) einerseits, oder ihrer potentiellen Fähigkeit zur Migration und Infiltration von Geweben (hematopoietische Zellen, Stammzellen). In den durchgeführten Experimenten zeigten nur die Stammzellen C17.2 und MAPC tumorspezifische Migration im Rattengliommodell. Besonders auffällig war hier die Migration von Einzelzellen, die sich vom Zellverband lösten und große Teile des soliden Tumors infiltrierten. Keine der übrigen gestesteten Zelllinien zeigte ein ähnliches Migrationsverhalten. Statt dessen waren diese Zellen meist als zusammenhängende Zellmasse in der Tumorperipherie lokalisiert. Neben Rattengliomen infiltrierten MAPC auch humane Gliome in immundefizienten Mäusen. Dies zeigt, dass (i) die Tumorinfiltration durch Stammzellen nicht auf das 9L Gliommodell beschränkt ist, und dass (ii) zur Stammzellmigration essentielle Faktoren auch über Speziesgrenzen hinweg aktiv sind. Die Fähigkeit zur Infiltration von Gliomen durch neurale und mesenchymale Stammzellen ist bereits aus früheren Studien bekannt [3, 5]. Erstmals wurde nun in dieser Arbeit gezeigt, dass auch multipotente adulte Stammzellen die Fähigkeit zur tumorspezifischen Infiltration besitzen.

Der Mechanismus dieser gerichteten Migration ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die Tatsache, dass sowohl gewebeigene Stammzellen (i.e. neurale Stammzellen), als auch Stammzellen aus fremden Geweben (i.e. mesenchymale Stammzellen, MAPC) die Fähigkeit zur Infiltration von Gliomen besitzen deutet darauf hin, dass in diesen gewebspezifischen Stammzellen ein ähnliches Programm zur Reaktion auf chemotaktische Stimuli existiert. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. CCL2 [134] „Stem cell factor“ (SCF) [135] und Vascular endothelial growth factor (VEGF) [136] können zielgerichteten Migration neuraler Stammzellen induzieren. Besonders interessant erscheint jedoch die Interaktion des Chemokins „Stromal cell-derived factor 1“ (SDF-1) mit dem Rezeptor CXCR4 im Zusammenhang mit gliomspezifischer Migration von Stammzellen. Der Chemokinrezeptor CXCR4 reguliert im Zusammenspiel mit SDF-1 „Homing“ von hematopoietischen Stammzellen in das Knochenmark, sowie deren Mobilisierung entlang eines SDF-1 Gradienten [137, 138]. Neben hematopoietischen Stammzellen exprimieren jedoch auch

neurale und mesenchymale Stammzellen CXCR4 [139, 140] und werden durch SDF-1 zur Migration angeregt [139-142]. Expression von SDF-1 konnte in Gliomzellen nachgewiesen werden und korrelierte mit der Malignität der Tumore [143, 144]. Es ist daher denkbar, dass Gliomzellen durch Sekretion von SDF-1 Stammzellmigration induzieren. Tatsächlich ist die gliomspezifische Migration von neuronalen, mesenchymalen und hematopoietischen Stammzellen reduziert, wenn Interaktion von CXCR4 mit SDF-1 blockiert ist [5, 145].

Bevor Stammzellmigration stattfinden kann, müssen jedoch noch weitere intrazelluläre Signalwege in Reaktion auf Chemokinstimulation aktiviert werden [141]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit getesteten etablierten Zelllinien im Gegensatz zu den Stammzellkulturen die komplexen Anforderungen zur gliomspezifischen Migration nicht erfüllten.

6.3 Therapie von Gliomen durch HSV-TK-exprimierende MAPC

In nachfolgenden Experimenten wurde getestet, ob MAPC ähnlich wie NSC [88] durch den HSV-TK Bystander Effekt Gliomzellen abtöten können. Kokultivierung von MAPC-TK mit 9L Gliomzellen führte tatsächlich zu einem starken Bystander Effekt *in vitro*. Tumorstadium *in vivo* konnte durch Injektion von MAPC-TK jedoch nur vorübergehend gehemmt, nicht aber dauerhaft inhibiert werden. Der *in vitro* Bystander Effekt auf G62 Zellen war im Vergleich zu 9L relativ schwach ausgeprägt. Wie bereits in vorangehenden Versuchen festgestellt wurde, sind G62 Zellen resistenter gegen eine HSV-TK/GCV Therapie als 9L Zellen (Abschnitt 6.1.2). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass zwischen MAPC und G62 Zellen keine funktionellen Gap Junctions gebildet wurden und dadurch kein effizienter Bystander Effekt ausgeübt werden konnte. Obwohl die Ausbildung von Gap Junctions zwischen Zellen verschiedener Spezies prinzipiell möglich ist [122], kann dennoch die Expression nicht kompatibler Connexine eine effiziente Gap Junction Ausbildung verhindern [146]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch den Bystander Effekt von MAPC-TK zwar ein gewisser Antitumoreffekt erzielt werden kann, dieser aber für eine effiziente Gliomtherapie möglicherweise nicht ausreichend ist.

6.4 Entwicklung migratorischer Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypvektoren

Wie in vorangehenden Abschnitten diskutiert führte sowohl Injektion von LCMV-GP-pseudotypisierten Vektoren *mit hsv-tk* Transgenen als auch Applikation von HSV-TK-exprimierenden Stammzellen bereits zu einem Antitumoreffekt im Tiermodell. Zur Entwicklung einer effizienten Therapie für humane Gliome sollten nun beide Strategien kombiniert werden. Das heißt, eine stabile Verpackungszelllinie für LCMV-GP Pseudotypvektoren auf Basis tumorinfiltrierender Stammzellen sollte generiert werden. Langfristig ist zwar eine Etablierung lentiviraler Verpackungszellen anzustreben, dies ist aber wegen Toxizität der lentiviralen Protease nur mit induzierbaren Expressionssystemen möglich [147]. Es sollten daher zunächst gammaretrovirale Verpackungszelllinien auf Stammzellbasis angelegt werden.

6.4.1 Verpackungszellen auf Basis neuraler Stammzellen

Die tumorinfiltrierende neurale Stammzelle C17.2 [3] produzierte nach stabiler Transfektion mit Gag-Pol und LCMV-GP Expressionsplasmiden retrovirale Vektoren mit Titern von mehr als 1×10^4 TU/ml. PCR-basierte Testung der Überstände von C17.2 Verpackungszellen deuteten jedoch auf Anwesenheit von amphotropem replikationskompetentem MLV hin. Versuche zur Rezeptorinterferenz bestätigten die Expression von amphotropem MLV Hüllprotein in TE617 nach Infektion mit C17.2 Überständen. Interessantweise waren auch nach Infektion mit C17.2/242 Überständen geringe Mengen an *gag*, nicht aber *A-MLVenv* Sequenzen in TE617 nachweisbar. Mit Überständen von nativen C17.2 konnten dagegen kein RCR übertragen werden.

Diese RCR Testungen deuteten darauf hin, dass *A-MLVenv* Sequenzen in nativen C17.2 Zellen vorhanden waren. Tatsächlich war PCR aus genomischer DNA von nativen C17.2 Zellen positiv für *A-MLVenv* und *gag* Sequenzen. Aus C17.2 cDNA konnten jedoch nur mit *A-MLVenv* 3' Primern, nicht aber mit *A-MLVenv* 5' Primern Amplifikate erhalten werden. Die Primer *A-MLVenv* 5' und *A-MLVenv* 3' hybridisieren mit Sequenzbereichen des *gp70* bzw. des *p15E*-codierenden Abschnitts der *A-MLVenv* cDNA. Während die Sequenz von *gp70* zwischen verschiedenen MLV Stämmen starke Variabilität aufweist ist die *p15E* Sequenz hoch konserviert [148]. Aus diesem Grund können mit Hilfe der *A-MLVenv* 3' Primer auch Sequenzen mit reduzierter Homologie zu *4070A MLVenv*, wie z.B. *ecotrope* und *endogene*

MLVenv Sequenzen, amplifiziert werden. Es existieren daher vermutlich neben amphotropen *MLVenv* Sequenzen noch weitere nicht-amphotrope *MLVenv* Sequenzen in C17.2.

Endogene retrovirale Sequenzen kommen im Genom muriner Zellen sehr häufig vor [149]. Zudem wurden C17.2 Zellen nach deren Isolierung durch retrovirale Transduktion mit v-myc immortalisiert und mit einem retroviralen Vektor zur Expression von Betagalactosidase transduziert [95, 150]. Beide Vektoren wurden in frühen murinen Verpackungszelllinien produziert, mit deren Überständen die Übertragung endogener retroviraler Sequenzen häufig beobachtet wurde [36, 151]. Rekombination von Verpackungsplasmiden mit endogenen retroviralen Sequenzen hat bereits in früheren stabilen Verpackungszelllinien zu RCR Entstehung geführt [152] und könnte auch die RCR Produktion in C17.2 Verpackungszellen erklären. Zeitpunkt und Art der erfolgten Rekombinationen könnten durch gezielte PCR Experimente mit DNA von C17.2/242 und C17.2/242/533 Zellen näher definiert werden. Da die Freisetzung von RCR aus Verpackungszelllinien zu Mobilisierung des therapeutischen Gens und zu Insertionsmutagenese führen kann, wurden C17.2 Zellen zur Etablierung retroviraler Verpackungszelllinien nicht mehr in Betracht gezogen.

6.4.2 Verpackungszellen auf Basis multipotenter adulter Stammzellen

Multipotente adulte Stammzellen aus der Ratte zeigten wie neurale Stammzellen gliomspezifisches Migrationsverhalten (Abschnitt 6.2). MAPC besitzen zudem gegenüber NSC einige wichtige Vorzüge:

1. Humane MAPC können über mehr als 60 Passagen [153], MAPC aus der Ratte sogar über mehr als 100 Passagen [6] in Kultur gehalten werden ohne dass eine Immortalisierung der Zellen durch virale Gene oder zelluläre Onkogene nötig ist. Dies ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt für die Anwendung von MAPC im Patienten.
2. Humane MAPC haben eine Verdopplungszeit von nur ca. 48 Stunden [153], MAPC der Ratte von nur 24 Stunden. Die Verdopplungszeit humaner neuraler Stammzellen beträgt ohne exogene Immortalisierung der Zellen dagegen 5-7 Tage [154-156]. Schnelle und fortdauernde Expansion ist eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung stabiler Verpackungszellen auch auf klonaler Ebene.
3. MAPC sind leicht aus dem humanen Knochenmark isolierbar, während die Isolierung von NSC praktisch nur aus embryonalem/fötalem bzw. postmortem ZNS möglich ist.

MAPC sind daher eine vielversprechende Alternative zu NSC in Hinblick auf die Etablierung stabiler retroviraler Verpackungszellen.

Zur Expression von Gag-Pol und LCMV-GP in MAPC wurde zunächst die selbe Strategie verwendet, wie zur Etablierung stabiler Verpackungszellen aus C17.2. Während nach Transfektion mit Gag-Pol zahlreiche Klone expandiert werden konnten, stellten MAPC nach Transfektion mit LCMV-GP ihr klonales Wachstum nach kurzer Zeit ein. Zudem war eine Veränderung der Morphologie von zumeist trigonalen, fibroblastenartigen Zellen zu kleinen spindelförmigen Zellen oder stark vergrößerten und abgeflachten Zellen zu beobachten. Diese veränderte Morphologie ähnelte dem Aussehen von MAPC nach induzierter Differenzierung [6].

Die alternative Strategie zur stabilen Expression von LCMV-GP war die Transduktion von MAPC mit dem lentiviralen selbstinaktivierenden Vektor M566. Lentivirale Vektoren werden aufgrund von Inkompatibilität der Verpackungssignale nicht in MLV Partikel verpackt. Zudem enthält der hier verwendete Vektor eine Deletion in der U3 Region der 3'LTR, so dass im Falle einer Mobilisierung des Vektors keine reverse Transkription stattfinden kann [157]. Nach Transduktion mit M566 exprimierten MAPC stabil LCMV-GP und wurden ohne Heranziehen von Einzelklonen expandiert.

Die erfolgreiche Expression von LCMV-GP in MAPC nach lentiviraler Transduktion, nicht aber nach stabiler Transfektion könnte verschiedene Ursachen haben. α -Dystroglycan (α -DG), der zelluläre Bindungspartner von LCMV-GP, wird sehr wahrscheinlich auch auf der Oberfläche von MAPC exprimiert. In seiner Funktion als Bindeglied zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett moduliert DG möglicherweise auch zelluläre Signaltransduktionswege. Der Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) auf Zellmorphologie, Wachstum und Genexpression ist seit langem bekannt [158, 159]. Ähnlich wie Proteine der Integin-Familie [160] agiert daher womöglich auch α -DG als Rezeptor für Wachstums- und Differenzierungssignale der ECM. Signale der ECM könnten dann durch Interaktion des Adaptorproteins grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) mit dem zytoplasmatischen Bereich von β -DG weitergeleitet werden [161]. Ein wichtiger Bindungspartner von α -DG ist das ECM Protein Laminin [162]. Kultivierung epithelialer Zellen auf Laminin kann Wachstumsstop, Änderung der Zellmorphologie und gewebsspezifische Genexpression induzieren [163, 164]. Diese Veränderungen werden zumindest teilweise durch Interaktion von α -DG mit Laminin ausgelöst [113]. Auch Kultivierung von MAPC auf Laminin führt zu Wachstumsstop [153]. Bindung von LCMV-GP an α -DG in stabil transfizierten MAPC könnte daher zur Aktivierung zellulärer Signalwege führen, wie sie sonst durch Bindung von α -DG an Proteine der extrazellulären Matrix aktiviert werden, und somit Wachstumsstop und Änderung der Zellmorphologie einleiten. Da Wachstumsstop nach lentiviralem Gentransfer nicht beobachtet wurde, ist dieses Phänomen eventuell auch abhängig von der Zelldichte, die beim Isolieren von Klonen vorübergehend

sehr hoch ist, nach lentiviraler Transduktion aber konsequent niedrig gehalten wurde. Auch Unterschiede in der Expressionshöhe von LCMV-GP, vermittelt durch einen CMV Promotor im Falle des Expressionsplasmids M533 bzw. einem SFFV Promotor im Falle des lentiviralen Vektors M566, könnten in diesem Zusammenhang eine Rolle gespielt haben.

Andererseits könnte aber auch unspezifische Zytotoxizität von LCMV-GP bei starker Expression das Wachstum von MAPC inhibieren. Relative Expressionshöhen von LCMV-GP bei CMV-Promotor bzw. SFFV-Promotor-getriebener Expression müssten noch bestimmt werden. Zytotoxizität wurde auch bei Überexpression des Hüllproteins des vesiculären Stomatitisvirus (VSV-G) beobachtet und war begleitet von Zellfusionen [46]. Expression von LCMV-GP löste jedoch weder in Kulturen von C17.2 noch von MAPC Zellfusionen aus.

Die Effizienz der Verpackung des retroviralen GFP Vektors M56a variierte in MAPC Verpackungszellen. Die höchsten Vektortiter produzierte mit durchschnittlich $3,6 \times 10^3$ TU/ml der Klon 3.1, in welchem auch die höchste Gag Expression gemessen wurde. Vektorproduktion blieb bei Kultivierung der Zellen in Selektionsmedium auch nach mehreren Wochen in Kultur und mehrmaligem Einfrieren der Zellen weitgehend konstant. Anders als in C17.2 entstanden in MAPC auch nach mehrwöchiger Kultivierung der Zellen keine replikationskompetenten Retroviren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass MAPC ein geeigneten Zelltyp zur Etablierung stabiler, RCR-freier Verpackungszellen für retrovirale LCMV-GP Pseudotypen sind.

Um Verpackungszelllinien für das therapeutische Gen *hsv-tk* zu generieren wurden MAPC Verpackungszellen mit dem retroviralen Vektor M508 transduziert. Dieser Vektor ist, mit Ausnahme der *hsv-tk/IRES/gfp* Kasette anstelle des *gfp* Gens, identisch mit dem Vektor M56a. Transduktion mit M508 führte in MAPC Verpackungszellen zu einer unerwarteten Zytotoxizität. Transduktion mit M56a wurde dagegen von MAPC stets gut toleriert, so dass diese Toxizität nur durch Expression von HSV-TK erklärt werden kann. Eine Toxizität von HSV-TK wurde bisher in der Literatur nicht näher beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass ein Ungleichgewicht des zellulären Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Pools zu DNA Mutationen, Störungen der DNA Replikation und zu Zelltod führen kann [165-168]. Nach Transduktion von MAPC mit hochtitrigen M508 Vektorüberständen lagen vermutlich mehrere Vektorkopien in MAPC vor, wodurch wahrscheinlich eine starke HSV-TK Expression vermittelt wurde. Dies könnte zu einem Desoxythymidintriphosphat Überschuss in MAPC, und damit zu einem dNTP Ungleichgewicht mit zytotoxischer Wirkung geführt haben.

Da in Folge der Zytotoxizität von M508 der Prozentsatz transduzierter MAPC in der Kultur schnell abnahm, wurden nach Transduktion mit M508 Einzelklone isoliert und auf Vektorproduktion getestet. In den fünf isolierten Klonen konnte jedoch keine Vektorproduktion nachgewiesen werden.

Es wurde deshalb die Expression von Gag, LCMV-GP und des Vektors M508 überprüft. Die Gag Expression in den einzelnen Klonen war ähnlich hoch wie in 3.1/566/56a, während LCMV-GP in allen Klonen weniger stark exprimiert wurde als in 3.1/566/56a. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass hohe LCMV-GP Expression sich ungünstig auf die Fähigkeit von MAPC zu klonalem Wachstum auswirkt. Da GFP Expression und HSV-TK Funktionalität nachgewiesen werden konnten, war vermutlich der Vektor M508 in intaktem Zustand vorhanden. Wegen der beobachteten Toxizität von HSV-TK in MAPC ist aber anzunehmen, dass vorzugsweise Klone mit nur schwacher Expression des Vektors herangewachsen waren. Die Menge an verfügbarer Vektor-RNA hat aber einen starken Einfluss auf den Vektortiter in stabilen Verpackungszelllinien [169]. Auch bewirkt die Einführung eines zweiten Gens in einen retroviralen Vektor und damit die Vergrößerung des Vektors oftmals eine Titerreduktion [70]. Möglicherweise hat das Zusammenspiel dieser negativen Faktoren eine messbare Vektorproduktion in den getesteten Klonen verhindert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Inaktivierung *cis*-aktiver Sequenzen des retroviralen Vektors oder Mutationen der Gag-Pol bzw. LCMV-GP Gene in einigen Klonen stattgefunden hat.

Überstände der MAPC Verpackungszelllinie 3.1/566/56a transduzierten Gliomzellen *in vitro*. Titer der MAPC Überstände auf der humanen Gliomzelllinie G62 betragen durchschnittlich $6,6 \times 10^3$ TU/ml und waren damit wie Titer der lentiviralen LCMV-GP Pseudotypen ca. 4-fach höher als auf TE671 und 9L Zellen.

MAPC Verpackungszellen zeigten nach Injektion in Gliome *in vivo* eine ebenso effiziente Tumordinfiltration, wie zuvor getestete MAPC (Abschnitt 6.2). Damit behielten MAPC ihre Fähigkeit zur tumorspezifischen Migration auch nach genetischer Manipulation, fortdauernder *in vitro* Kultivierung und starker Expansion bei. Darüber hinaus produzierten MAPC Verpackungszellen *in vivo* retrovirale Vektoren und bewirkten die Transduktion von 9L Gliomen. Dabei vermittelten MAPC sowohl Transduktion von soliden Tumorbereichen als auch von infiltrierenden, ins Hirngewebe einwandernden Gliomzellen. Der Prozentsatz transduzierter Gliomzellen wurde in dieser Arbeit nicht quantifiziert. Es war jedoch deutlich, dass in einigen Tumorbereichen trotz Anwesenheit von MAPC Verpackungszellen keine Transduktion stattgefunden hat. Dies war vor allem in Bereichen mit hoher Gliomzelldichte und daher vermutlich geringer Zellteilungsaktivität der Fall. Die Transduktion durch gammaretrovirale Vektoren ist jedoch auf Zellproliferation angewiesen [2] und könnte daher in diesen Gliombereichen erschwert worden sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben erstmals die Etablierung stabiler Verpackungszellen für LCMV-GP Pseudotypvektoren basierend auf tumorinfiltrierenden Stammzellen. Diese migratorischen VPC sollten in zukünftigen Studien eine effizientere Vektordistribution vermitteln, als zuvor mit Applikation nichtmigratorischer VPC erzielt wurde. Zudem sollte die Anwendung von MAPC Verpackungszellen die gezielte Transduktion invasiver Gliomzellen in der Infiltrationszone des Tumors ermöglichen [22]. In nachfolgenden Studien ist nun die Etablierung einer Verpackungszelllinie für lentivirale LCMV-GP Pseudotypvektoren anzustreben. Durch Kombination der tumorspezifischen MAPC Migration und des starken Tropismus lentiviraler LCMV-GP Pseudotypen für Gliomzellen würde so ein hochspezifisches und effizientes Gentransfersystem zur Gentherapie von Gliomen geschaffen.

Zur Intensivierung eines therapeutischen Effekts sollte zudem nicht nur ein therapeutisches Gen, sondern eine Kombination aus synergistisch wirkenden Genen transferiert werden. Cytokine wie IL2 und IL4 [66, 67, 170] und Chemokine (H. Neumann, H. Miletic; persönliche Kommunikation) wurden bereits erfolgreich in der experimentellen Gliomtherapie eingesetzt und induzierten die Einwanderung zytotoxischer T-Zellen in Gliome *in vivo*. Auch Suizidgentherapie mit HSV-TK kann eine Immunreaktion gegen Tumore auslösen [61, 171]. In Synergie mit der HSV-TK Therapie könnte Cytokin- oder Chemokinexpression so eine wirksame Therapie gegen humane Gliome darstellen.

7 Literatur

1. Rainov, N.G. and H. Ren, *Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy--what have we learned?* J Neurooncol, 2003. **65**(3): p. 227-36.
2. Lewis, P.F. and M. Emerman, *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus.* J Virol, 1994. **68**(1): p. 510-6.
3. Aboody, K.S., et al., *Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12846-51.
4. Benedetti, S., et al., *Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells.* Nat Med, 2000. **6**(4): p. 447-50.
5. Nakamizo, A., et al., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas.* Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3307-18.
6. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
7. Cole, G.C., P.R. Wilkins, and R.R. West, *An epidemiological survey of primary tumours of the brain and spinal cord in South East Wales.* Br J Neurosurg, 1989. **3**(4): p. 487-93.
8. DeAngelis, L.M., *Brain tumors.* N Engl J Med, 2001. **344**(2): p. 114-23.
9. Dunn, I.F., O. Heese, and P.M. Black, *Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs.* J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 121-37.
10. Sidransky, D., et al., *Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression.* Nature, 1992. **355**(6363): p. 846-7.
11. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
12. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.* Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
13. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
14. Galli, R., et al., *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7011-21.
15. Yuan, X., et al., *Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme.* Oncogene, 2004. **23**(58): p. 9392-400.
16. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.

17. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. *Glia*, 2002. **39**(3): p. 193-206.
18. Kleihues, P., et al., *The WHO classification of tumors of the nervous system*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002. **61**(3): p. 215-25; discussion 226-9.
19. Oertel, J., et al., *Prognosis of gliomas in the 1970s and today*. *Neurosurg Focus*, 2005. **18**(4): p. e12.
20. Barba, D., et al., *Thymidine kinase-mediated killing of rat brain tumors*. *J Neurosurg*, 1993. **79**(5): p. 729-35.
21. Lyons, R.M., et al., *An improved retroviral vector encoding the herpes simplex virus thymidine kinase gene increases antitumor efficacy in vivo*. *Cancer Gene Ther*, 1995. **2**(4): p. 273-80.
22. Rainov, N.G., et al., *Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm*. *Cancer Gene Ther*, 1996. **3**(2): p. 99-106.
23. Sandmair, A.M., et al., *Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy in experimental rat BT4C glioma model: effect of the percentage of thymidine kinase-positive glioma cells on treatment effect, survival time, and tissue reactions*. *Cancer Gene Ther*, 2000. **7**(3): p. 413-21.
24. Culver, K.W., et al., *In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors*. *Science*, 1992. **256**(5063): p. 1550-2.
25. Ram, Z., et al., *In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats*. *Cancer Res*, 1993. **53**(1): p. 83-8.
26. Short, M.P., et al., *Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line*. *J Neurosci Res*, 1990. **27**(3): p. 427-39.
27. Rainov, N.G., *A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme*. *Hum Gene Ther*, 2000. **11**(17): p. 2389-401.
28. Ram, Z., et al., *Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells*. *Nat Med*, 1997. **3**(12): p. 1354-61.
29. Shand, N., et al., *A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir*. *GLI328 European-Canadian Study Group*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(14): p. 2325-35.
30. Sandmair, A.M., et al., *Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses*. *Hum Gene Ther*, 2000. **11**(16): p. 2197-205.
31. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(8): p. 4239-42.

32. Shapiro, W.R. and J.R. Shapiro, *Biology and treatment of malignant glioma*. Oncology (Williston Park), 1998. **12**(2): p. 233-40; discussion 240, 246.
33. Coffin, J.M., *Retroviridae: the viruses and their replication*, in *Field's Virology*, B.N.K. Fields, D.M.; Howley, P.M., Editor. 1996, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 763-844.
34. Miller, A.D., D.R. Trauber, and C. Buttimore, *Factors involved in production of helper virus-free retrovirus vectors*. Somat Cell Mol Genet, 1986. **12**(2): p. 175-83.
35. Naldini, L., et al., *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11382-8.
36. Danos, O. and R.C. Mulligan, *Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6460-4.
37. Miller, A.D., *Retrovirus packaging cells*. Hum Gene Ther, 1990. **1**(1): p. 5-14.
38. Merten, O.W., *State-of-the-art of the production of retroviral vectors*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S105-24.
39. Mann, R., R.C. Mulligan, and D. Baltimore, *Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus*. Cell, 1983. **33**(1): p. 153-9.
40. Cone, R.D. and R.C. Mulligan, *High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(20): p. 6349-53.
41. Miller, A.D. and C. Buttimore, *Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(8): p. 2895-902.
42. Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank, *Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line*. Virology, 1988. **167**(2): p. 400-6.
43. Cosset, F.L., et al., *High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7430-6.
44. Davis, J.L., et al., *Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(12): p. 1459-67.
45. Gallaher, W.R., et al., *A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(2): p. 191-202.
46. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
47. Miletic, H., et al., *Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 6114-6.

48. Beyer, W.R., et al., *Recombinant expression of lymphocytic choriomeningitis virus strain WE glycoproteins: a single amino acid makes the difference*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 1061-4.
49. Cao, W., et al., *Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2079-81.
50. Coil, D.A. and A.D. Miller, *Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10920-6.
51. Schlegel, R., et al., *Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site?* Cell, 1983. **32**(2): p. 639-46.
52. Saleh, M., S.A. Stacker, and A.F. Wilks, *Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence*. Cancer Res, 1996. **56**(2): p. 393-401.
53. Gomez-Manzano, C., et al., *Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis*. Cancer Res, 1996. **56**(4): p. 694-9.
54. Moolten, F.L., *Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy*. Cancer Res, 1986. **46**(10): p. 5276-81.
55. Moolten, F.L. and J.M. Wells, *Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(4): p. 297-300.
56. Keller, P.M., et al., *Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities*. Biochem Pharmacol, 1981. **30**(22): p. 3071-7.
57. Glaser, T., et al., *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 Ther, 2001. **8**(6): p. 469-76.
58. Fischer, U., et al., *Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells*. Oncogene, 2005. **24**(7): p. 1231-43.
59. Kumar, N.M. and N.B. Gilula, *The gap junction communication channel*. Cell, 1996. **84**(3): p. 381-8.
60. Elshami, A.A., et al., *Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro*. Gene Ther, 1996. **3**(1): p. 85-92.
61. Barba, D., et al., *Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4348-52.
62. Hurwitz, R.L., et al., *Retinoblastoma: from bench to bedside*. Expert Rev Mol Med, 2003. **2003**: p. 1-22.
63. Miller, D.W., *Immunobiology of the blood-brain barrier*. J Neurovirol, 1999. **5**(6): p. 570-8.

64. Weller, M. and A. Fontana, *The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain.* Brain Res Brain Res Rev, 1995. **21**(2): p. 128-51.
65. Palu, G., et al., *Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans.* Gene Ther, 1999. **6**(3): p. 330-7.
66. Benedetti, S., et al., *Eradication of rat malignant gliomas by retroviral-mediated, in vivo delivery of the interleukin 4 gene.* Cancer Res, 1999. **59**(3): p. 645-52.
67. Saleh, M., et al., *Effect of in situ retroviral interleukin-4 transfer on established intracranial tumors.* J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(5): p. 438-45.
68. Ehtesham, M., et al., *The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma.* Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5657-63.
69. Benedetti, S., et al., *IL-4 gene transfer for the treatment of experimental gliomas.* Adv Exp Med Biol, 1998. **451**: p. 315-21.
70. Pizzato, M., et al., *Production and characterization of a bicistronic Moloney-based retroviral vector expressing human interleukin 2 and herpes simplex virus thymidine kinase for gene therapy of cancer.* Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 1003-7.
71. Ram, Z., et al., *Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors.* J Neurosurg, 1993. **79**(3): p. 400-7.
72. Harsh, G.R., et al., *Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study.* J Neurosurg, 2000. **92**(5): p. 804-11.
73. Long, Z., et al., *Molecular evaluation of biopsy and autopsy specimens from patients receiving in vivo retroviral gene therapy.* Hum Gene Ther, 1999. **10**(5): p. 733-40.
74. Kim, B., T.L. Chenevert, and B.D. Ross, *Growth kinetics and treatment response of the intracerebral rat 9L brain tumor model: a quantitative in vivo study using magnetic resonance imaging.* Clin Cancer Res, 1995. **1**(6): p. 643-50.
75. McComb, R.D. and D.D. Bigner, *The biology of malignant gliomas--a comprehensive survey.* Clin Neuropathol, 1984. **3**(3): p. 93-106.
76. Puumalainen, A.M., et al., *Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses.* Hum Gene Ther, 1998. **9**(12): p. 1769-74.
77. Izquierdo, M., et al., *Gene therapy in brain tumours: implications of the size of glioblastoma on its curability.* Acta Neurochir Suppl, 1997. **68**: p. 111-7.
78. Lampson, L.A., et al., *Disseminating tumor cells and their interactions with leukocytes visualized in the brain.* Cancer Res, 1992. **52**(4): p. 1018-25.
79. Lampson, L.A., M.A. Lampson, and A.D. Dunne, *Exploiting the lacZ reporter gene for quantitative analysis of disseminated tumor growth within the brain: use of the lacZ gene product as a tumor antigen, for evaluation of antigenic modulation, and to facilitate image analysis of tumor growth in situ.* Cancer Res, 1993. **53**(1): p. 176-82.

80. Klatzmann, D., et al., *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 Glioblastoma.* Hum Gene Ther, 1998. **9**(17): p. 2595-604.
81. Lee, H., et al., *Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor.* Gene Ther, 2001. **8**(4): p. 268-73.
82. Beyer, W.R., et al., *Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range.* J Virol, 2002. **76**(3): p. 1488-95.
83. Yang, Y., et al., *Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein.* Hum Gene Ther, 1995. **6**(9): p. 1203-13.
84. Nakamura, K., et al., *Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model.* Gene Ther, 2004. **11**(14): p. 1155-64.
85. Moore, X.L., et al., *Endothelial progenitor cells' "homing" specificity to brain tumors.* Gene Ther, 2004. **11**(10): p. 811-8.
86. Tabatabai, G., et al., *Lessons from the bone marrow: how malignant glioma cells attract adult haematopoietic progenitor cells.* Brain, 2005.
87. Barresi, V., et al., *Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy.* Cancer Gene Ther, 2003. **10**(5): p. 396-402.
88. Uhl, M., et al., *Migratory neural stem cells for improved thymidine kinase-based gene therapy of malignant gliomas.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 125-9.
89. Ehtesham, M., et al., *Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell-mediated delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.* Cancer Res, 2002. **62**(24): p. 7170-4.
90. Yee, J.K., et al., *A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9564-8.
91. Schambach, A., et al., *Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors.* Mol Ther, 2000. **2**(5): p. 435-45.
92. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science, 1996. **272**: p. 263-267.
93. Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura, *Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses.* Gene Ther, 2000. **7**(12): p. 1063-6.
94. Demaison, C., et al., *High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter.* Hum Gene Ther, 2002. **13**(7): p. 803-13.
95. Snyder, E.Y., et al., *Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum.* Cell, 1992. **68**(1): p. 33-51.

96. Westphal, M., et al., *Karyotype analyses of 20 human glioma cell lines*. Acta Neurochir (Wien), 1994. **126**(1): p. 17-26.
97. Bruns, M., et al., *Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization*. Virology, 1983. **130**(1): p. 247-51.
98. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
99. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
100. Muller, P.Y., et al., *Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR*. Biotechniques, 2002. **32**(6): p. 1372-4, 1376, 1378-9.
101. Bi, W.L., et al., *In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy*. Hum Gene Ther, 1993. **4**(6): p. 725-31.
102. Nagy, J.I., F.E. Dudek, and J.E. Rash, *Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system*. Brain Res Brain Res Rev, 2004. **47**(1-3): p. 191-215.
103. Rigg, R.J., et al., *A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety*. Virology, 1996. **218**(1): p. 290-5.
104. Weiss, R., *Experimental biology and assay of retroviruses*, in *RNA tumor viruses: molecular biology of tumor viruses*, R. Weiss, et al., Editors. 1984, Cold Spring Harbour Laboratory: Cold Spring Harbor, New York. p. 232-246.
105. Steffens, S., et al., *Transduction of human glial and neuronal tumor cells with different lentivirus vector pseudotypes*. J Neurooncol, 2004. **70**(3): p. 281-8.
106. Wong, L.F., et al., *Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system*. Mol Ther, 2004. **9**(1): p. 101-11.
107. Stein, C.S., I. Martins, and B.L. Davidson, *The lymphocytic choriomeningitis virus envelope glycoprotein targets lentiviral gene transfer vector to neural progenitors in the murine brain*. Mol Ther, 2005. **11**(3): p. 382-9.
108. Watson, D.J., et al., *Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins*. Mol Ther, 2002. **5**(5 Pt 1): p. 528-37.
109. Miletic, H., et al., *Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1091-100.
110. Gorecki, D.C., J.M. Derry, and E.A. Barnard, *Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(9): p. 1589-97.
111. Zaccaria, M.L., et al., *Dystroglycan distribution in adult mouse brain: a light and electron microscopy study*. Neuroscience, 2001. **104**(2): p. 311-24.

112. Yamada, H., et al., *Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(15): p. 1563-9.
113. Muschler, J., et al., *A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 7102-9.
114. Weir, M.L. and J. Muschler, *Dystroglycan: emerging roles in mammary gland function*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(4): p. 409-19.
115. Kunz, S., et al., *Use of alternative receptors different than alpha-dystroglycan by selected isolates of lymphocytic choriomeningitis virus*. Virology, 2004. **325**(2): p. 432-45.
116. Bonthius, D.J., et al., *Critical role for glial cells in the propagation and spread of lymphocytic choriomeningitis virus in the developing rat brain*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6618-35.
117. Recht, L., et al., *Neural stem cells and neuro-oncology: quo vadis?* J Cell Biochem, 2003. **88**(1): p. 11-9.
118. Robe, P.A., et al., *Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(2): p. 241-9.
119. Beltinger, C., et al., *Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3212-7.
120. Prayson, R.A., *Bcl-2 and Bcl-X expression in gangliogliomas*. Hum Pathol, 1999. **30**(6): p. 701-5.
121. Dilber, M.S., et al., *Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo*. Cancer Res, 1997. **57**(8): p. 1523-8.
122. Fick, J., et al., *The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 11071-5.
123. McMasters, R.A., et al., *Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(15): p. 2253-61.
124. Mesnil, M., et al., *Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1831-5.
125. Sanson, M., et al., *Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models*. Cancer Gene Ther, 2002. **9**(2): p. 149-55.
126. Vrionis, F.D., et al., *The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions*. Gene Ther, 1997. **4**(6): p. 577-85.

127. Shinoura, N., et al., *Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: implications in brain tumor gene therapy*. J Neurosurg, 1996. **84**(5): p. 839-45; discussion 846.
128. Robe, P.A., et al., *Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication*. Int J Oncol, 2004. **25**(1): p. 187-92.
129. Princen, F., et al., *A cell type-specific and gap junction-independent mechanism for the herpes simplex virus-1 thymidine kinase gene/ganciclovir-mediated bystander effect*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(11): p. 3639-44.
130. Krutovskikh, V., et al., *Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32*. Int J Cancer, 1994. **56**(1): p. 87-94.
131. Mesnil, M. and H. Yamasaki, *Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 3989-99.
132. Trask, T.W., et al., *Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors*. Mol Ther, 2000. **1**(2): p. 195-203.
133. Herrlinger, U., et al., *Neural precursor cells for delivery of replication-conditional HSV-1 vectors to intracerebral gliomas*. Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 347-57.
134. Widera, D., et al., *MCP-1 induces migration of adult neural stem cells*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(8): p. 381-7.
135. Sun, L., J. Lee, and H.A. Fine, *Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1364-74.
136. Schmidt, N.O., et al., *Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 623-9.
137. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, *In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment*. Blood, 1998. **91**(1): p. 100-10.
138. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
139. Ji, J.F., et al., *Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 415-27.
140. Ji, J.F., et al., *Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain*. Neurosci Lett, 2004. **355**(3): p. 236-40.

141. Imitola, J., et al., *Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18117-22.
142. Reiss, K., et al., *Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer*. Neuroscience, 2002. **115**(1): p. 295-305.
143. Rempel, S.A., et al., *Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 102-11.
144. Lazarini, F., et al., *Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system*. Glia, 2003. **42**(2): p. 139-48.
145. Ehtesham, M., et al., *Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4*. Neoplasia, 2004. **6**(3): p. 287-93.
146. White, T.W., et al., *Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 879-92.
147. Ni, Y., et al., *Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector*. J Gene Med, 2005. **7**(6): p. 818-34.
148. Ott, D., R. Friedrich, and A. Rein, *Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia viruses: close relationship to mink cell focus-inducing viruses*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 757-66.
149. Allan, D.S., et al., *Endogenous murine leukemia virus DNA sequences in murine cell lines: implications for gene therapy safety testing by PCR*. Leuk Lymphoma, 1996. **23**(3-4): p. 375-81.
150. Ryder, E.F., E.Y. Snyder, and C.L. Cepko, *Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer*. J Neurobiol, 1990. **21**(2): p. 356-75.
151. Hatzoglou, M., et al., *Efficient packaging of a specific VL30 retroelement by psi 2 cells which produce MoMLV recombinant retroviruses*. Hum Gene Ther, 1990. **1**(4): p. 385-97.
152. Chong, H., W. Starkey, and R.G. Vile, *A replication-competent retrovirus arising from a split-function packaging cell line was generated by recombination events between the vector, one of the packaging constructs, and endogenous retroviral sequences*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2663-70.
153. Reyes, M., et al., *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2615-25.
154. Vescovi, A.L., et al., *Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation*. Exp Neurol, 1999. **156**(1): p. 71-83.
155. Carpenter, M.K., et al., *In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells*. Exp Neurol, 1999. **158**(2): p. 265-78.

156. Svendsen, C.N., et al., *A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells*. J Neurosci Methods, 1998. **85**(2): p. 141-52.
157. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
158. Petersen, O.W., et al., *Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9064-8.
159. Roskelley, C.D., P.Y. Desprez, and M.J. Bissell, *Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12378-82.
160. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
161. Yang, B., et al., *SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11711-4.
162. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin*. J Cell Biol, 1993. **122**(4): p. 809-23.
163. Streuli, C.H., et al., *Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia*. J Cell Biol, 1995. **129**(3): p. 591-603.
164. Muschler, J., et al., *Division of labor among the alpha6beta4 integrin, beta1 integrins, and an E3 laminin receptor to signal morphogenesis and beta-casein expression in mammary epithelial cells*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(9): p. 2817-28.
165. Yoshioka, A., et al., *Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death*. J Biol Chem, 1987. **262**(17): p. 8235-41.
166. Kunz, B.A. and S.E. Kohalimi, *Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels*. Annu Rev Genet, 1991. **25**: p. 339-59.
167. Meuth, M., *The molecular basis of mutations induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in mammalian cells*. Exp Cell Res, 1989. **181**(2): p. 305-16.
168. Kunz, B.A., et al., *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability*. Mutat Res, 1994. **318**(1): p. 1-64.
169. Naviaux, R.K., et al., *The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5701-5.
170. Iwadate, Y., et al., *Induction of immunity in peripheral tissues combined with intracerebral transplantation of interleukin-2-producing cells eliminates established brain tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8769-74.
171. Rainov, N.G., et al., *Immune response induced by retrovirus-mediated HSV-tk/GCV pharmacogene therapy in patients with glioblastoma multiforme*. Gene Ther, 2000. **7**(21): p. 1853-8.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
A-MLV	Amphotropes murines Leukämievirus
ATCC	<i>American type culture collection</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegalovirus
Cx	Connexin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1- α	Elongationsfaktor 1 α
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Env	Hüllprotein (<i>Envelope</i>)
ES	Embryonale Stammzelle
FACS	Fluoreszenaktivierte Zellsortierung (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GCV	Ganciclovir
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GJ	<i>Gap Junction</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HS	Pferdeserum (<i>Horse serum</i>)
HSV-TK	Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selenit
kb	Kilobase
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LCMV-GP	Glykoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MAPC	Multipotente adulte Stammzelle (<i>Multipotent adult progenitor cell</i>)
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Min	Minuten
MLV	Murines Leukämievirus

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NSC	Neurale Stammzelle
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDFG	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
Pol	Polymerase
qPCR	Quantitative PCR
RCR	Replikationskompetentes Retrovirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SIN	Selbstinaktivierend
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TU	Transfereinheit (<i>Transfer unit</i>)
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VPC	Verpackungszelllinie (<i>vector packaging cell</i>)
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-G	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem
α -DG	α -Dystroglykan
SFFV	Spleen Focus Forming Virus

8.2 Klonierte Plasmide

Name	Beschreibung	Klonierungsstrategie
M488	Lentiviraler SIN Vektor mit CMV Promotor und <i>hsv-tk/gfp</i> Fusionsgen	Siehe Abbildung 8.1
M508	Gammaretroviraler Vektor mit MP91-Leader und <i>gfp/IRES/hsv-tk</i> Kasette	Siehe Abbildung 8.2
M525	Gammaretroviraler Vektor mit MP91-Leader und <i>IRES/PuroR</i> Kasette	Siehe Abbildung 8.3
M533	Expressionsplasmid mit CMV Promotor und β -Globin Intron und <i>lcmv-gp/IRES/PuroR</i> Kasette	Die <i>lcmv-gp/IRES/PuroR</i> Kasette wurde aus M369 mit XhoI und SmaI geschnitten und in M289 geschnitten mit XhoI und EcoRV ligiert.
M566	Lentiviraler SIN Vektor mit SFFV Promotor und <i>lcmv-gp/IRES/PuroR</i> Kasette	Siehe Abbildung 8.4
M567	Gammaretroviraler Vektor mit MP91-Leader und <i>hsv-tk/IRES/PuroR</i> Kasette	Das <i>hsv-tk</i> Gen aus M508 wurde über EcoRI Schnittstellen in M525 kloniert

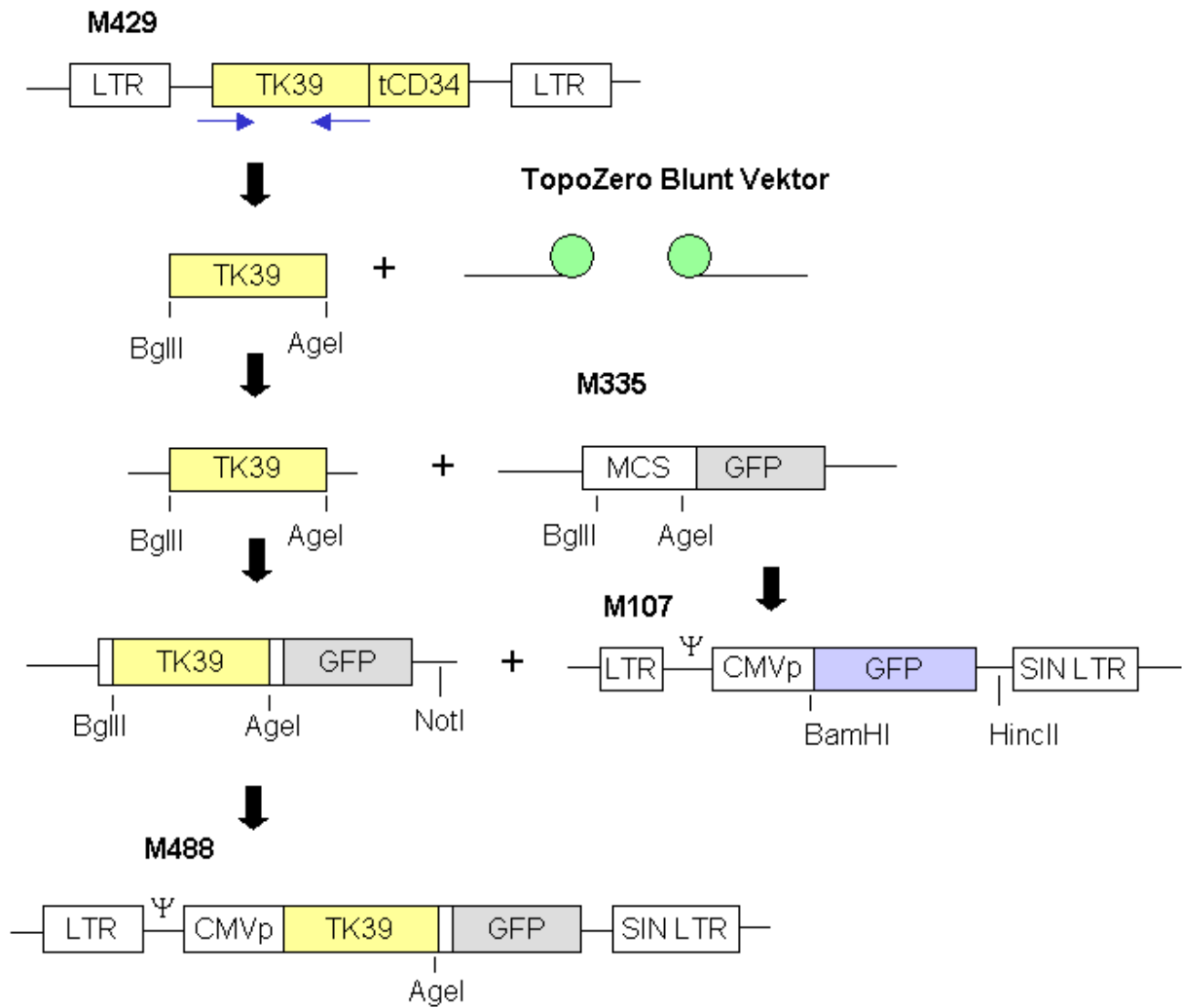


Abbildung 8.1 Klonierung von M488. Das *hsv-tk* Gen wurde aus M429 mittels PCR mit BglIII_TK_F und AgeI_TK_R Primern amplifiziert und in den Topo ZeroBlunt Vektor ligiert. Das *hsv-tk* Gen wurde dann aus dem Topo Vektor geschnitten und über BglIII, AgeI Schnittstellen in M335 ligiert. Das resultierende *hsv-tk/gfp* Fusionsgen wurde über BamHI, HincII Schnittstellen in M107 ligiert.

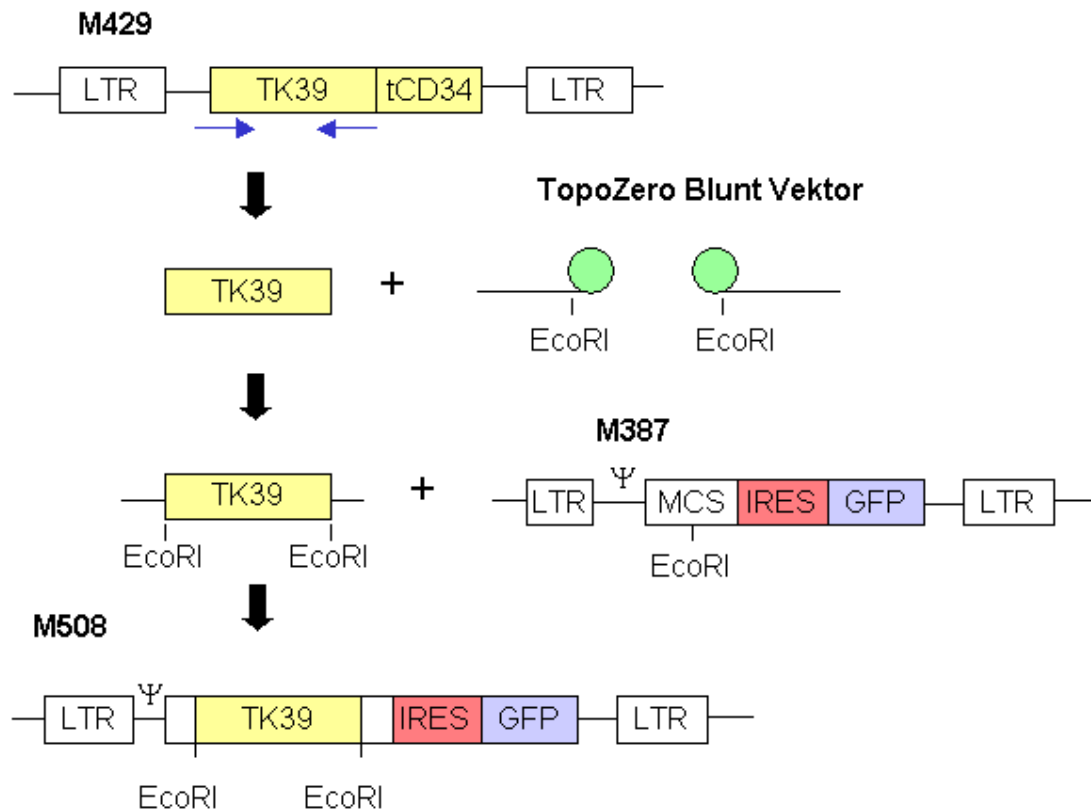


Abbildung 8.2 Klonierung von M508. Das *hsv-tk* Gen wurde aus M429 mittels PCR mit BgIII_TK_F und TK_R+Stop Primern amplifiziert und in den Topo ZeroBlunt Vektor ligiert. Das *hsv-tk* Gen wurde dann aus dem Topo Vektor geschnitten und über die EcoRI Schnittstelle in M387 ligiert.

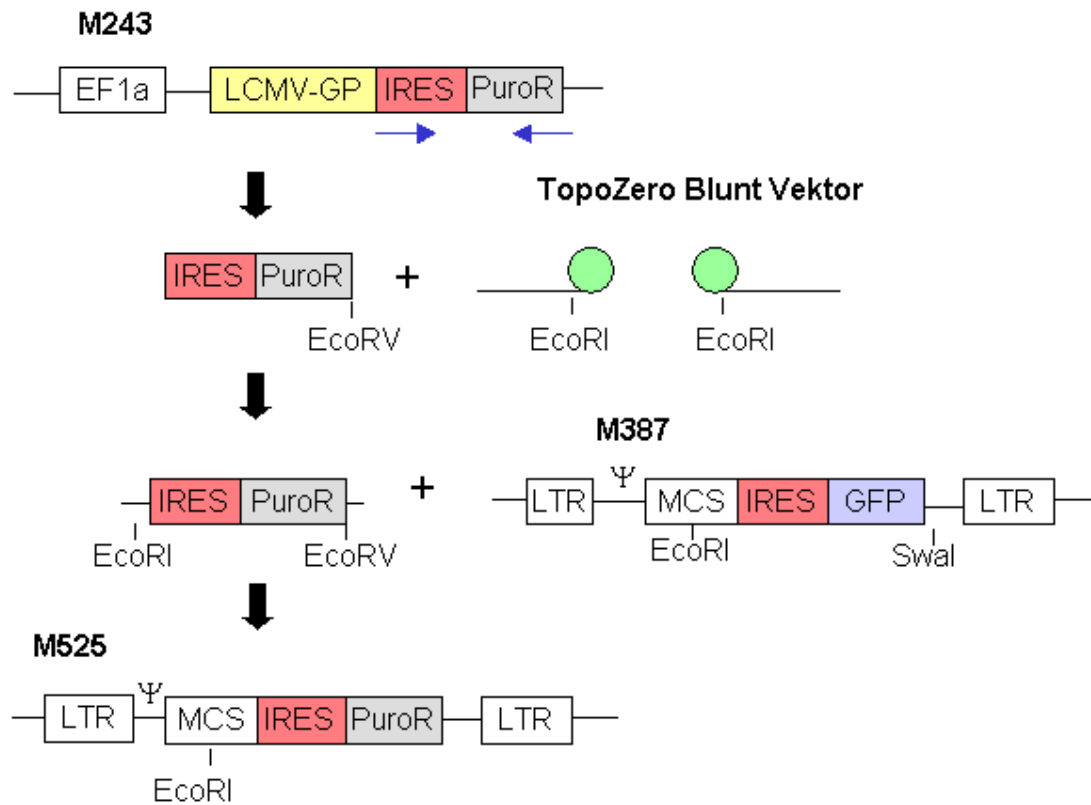


Abbildung 8.3 Klonierung von M525. Die *IRES/PuroR* Kasette wurde mittels PCR mit IRES_F und Puro_R_EcoRV Primern amplifiziert und in den Topo ZeroBlunt Vektor ligiert. Die *IRES/PuroR* Kasette wurde dann aus dem Topo Vektor geschnitten und über EcoRI und Swal Schnittstellen in M387 ligiert.

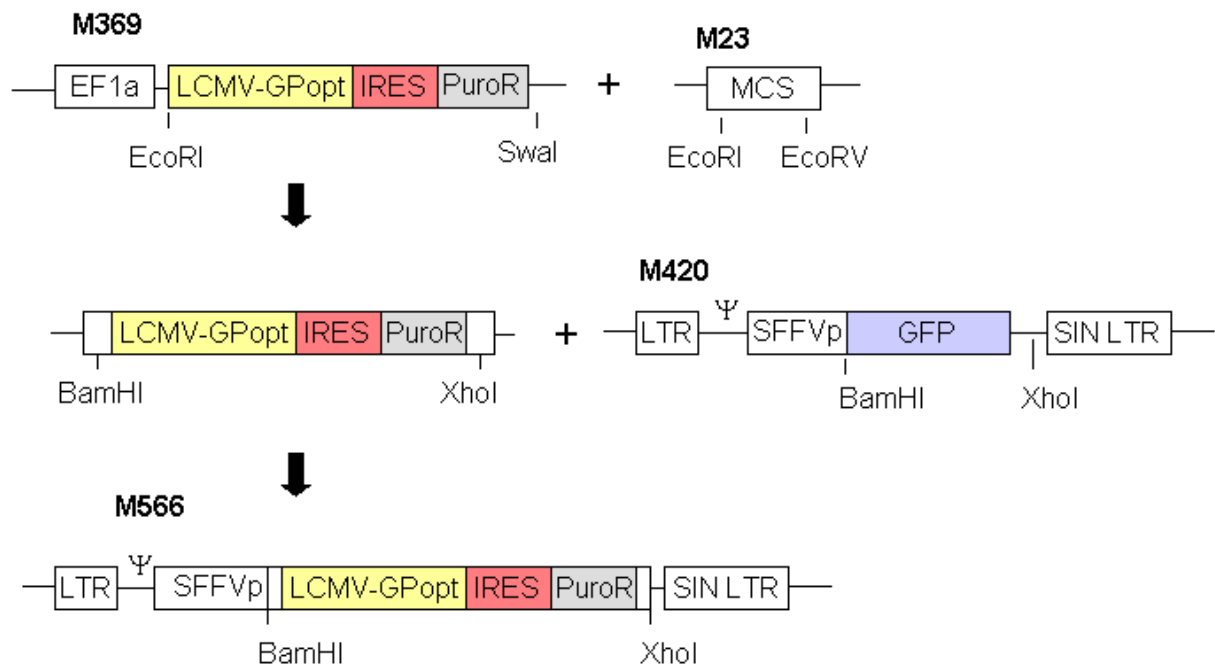
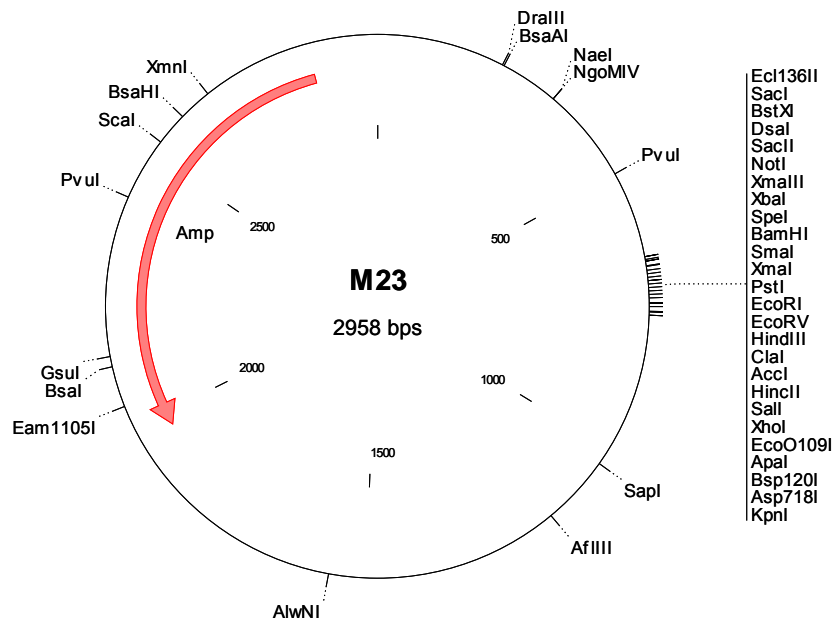
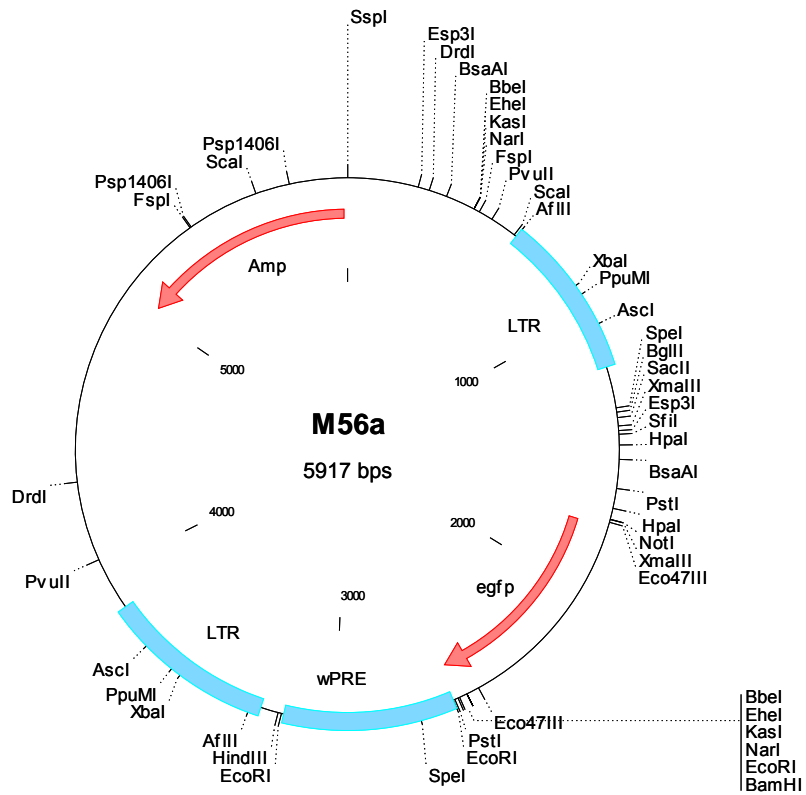


Abbildung 8.4 Klonierung von M566. Das codonoptimierte *lcmv-gp* Gen wurde aus M369 zusammen mit der *IRES/PuroR* Kassette ausgeschnitten und über die EcoRI, EcoRV Schnittstellen in M23 ligiert. *Lcmv-gp/IRES/PuroR* wurde dann über BamHI und XhoI Schnittstellen in M420 eingefügt.

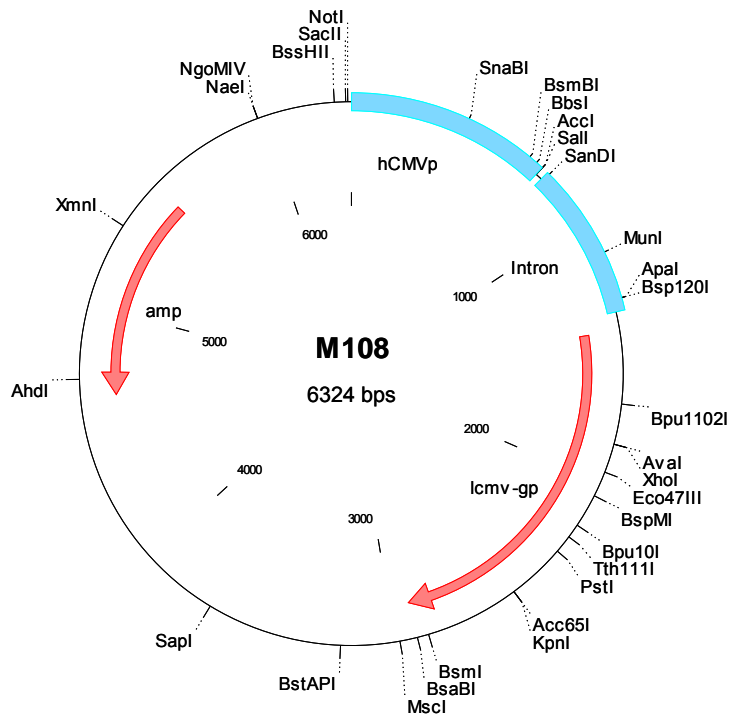
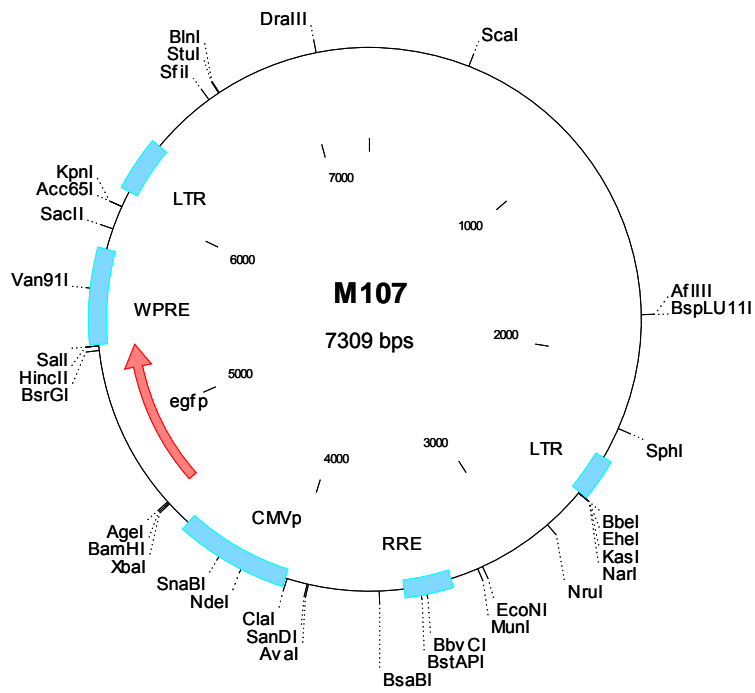
8.3 Plasmidkarten

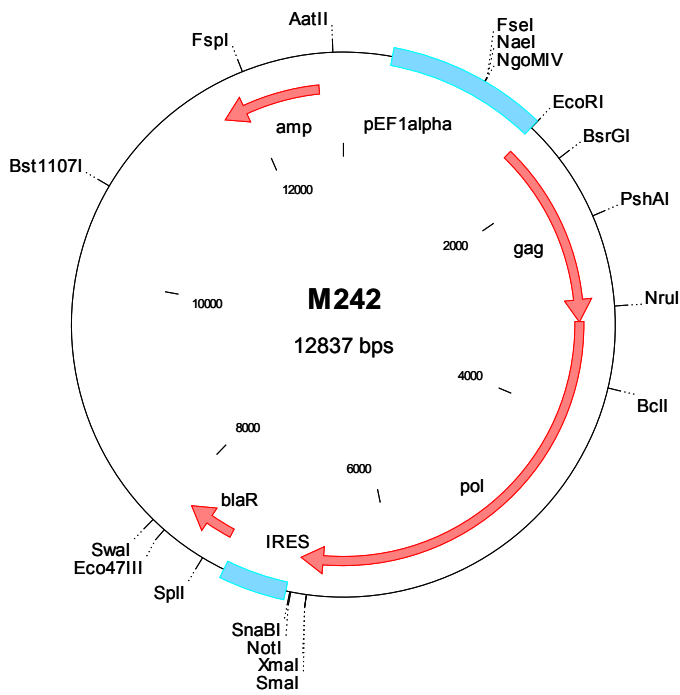
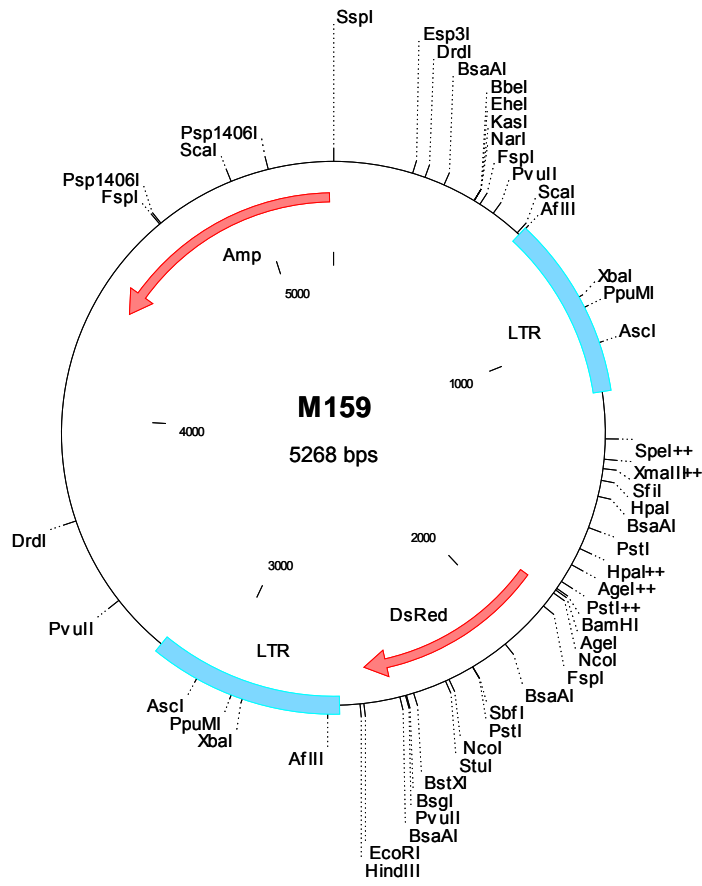


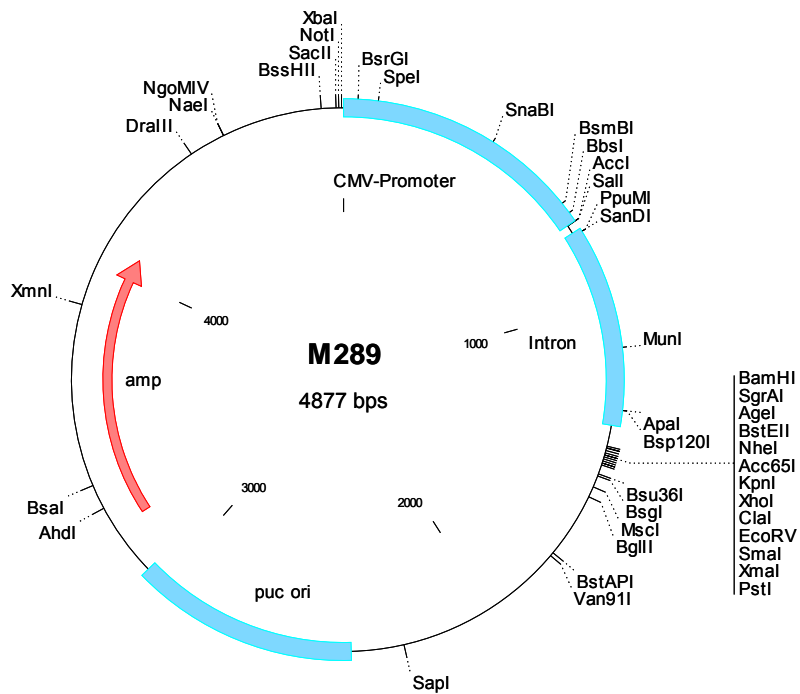
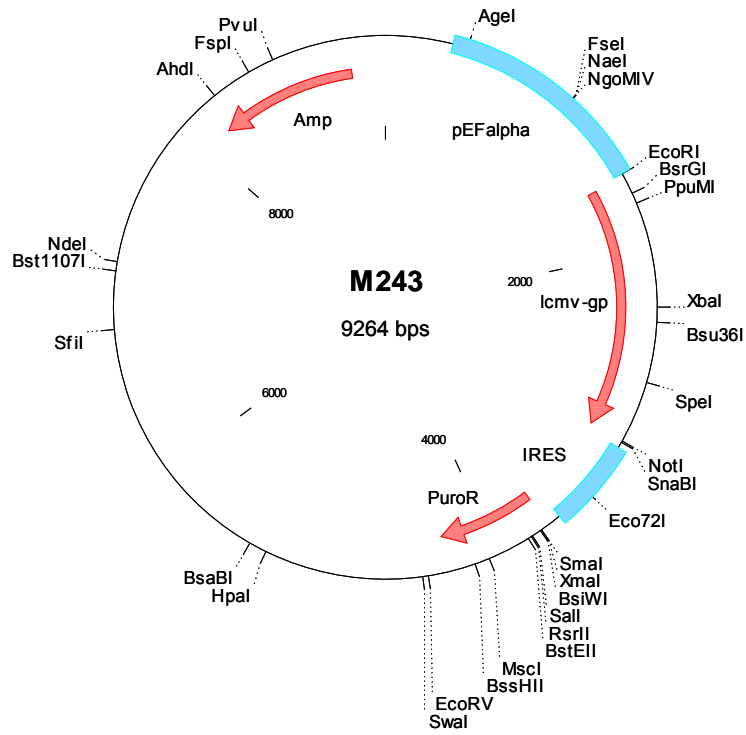
- Ecl136II
- SacI
- BstXI
- DsaI
- SacII
- NotI
- XmaIII
- XbaI
- SpeI
- BamHI
- SmaI
- XmaI
- PstI
- EcoRI
- EcoRV
- HindIII
- Clal
- AccI
- HincII
- SalI
- XhoI
- EcoO109I
- ApaI
- Bsp120I
- Asp718I
- KpnI

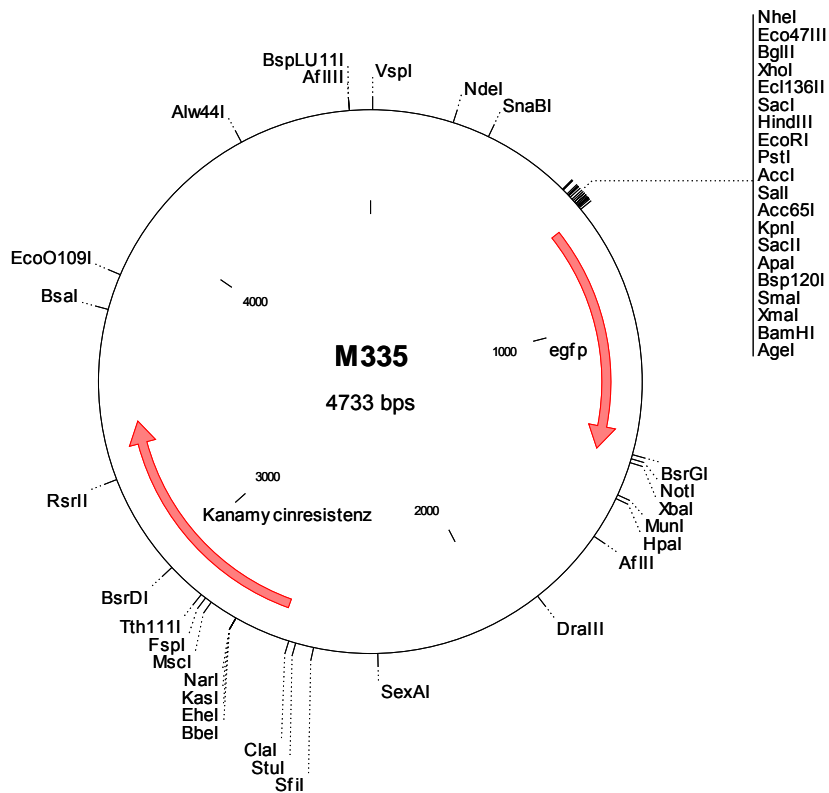
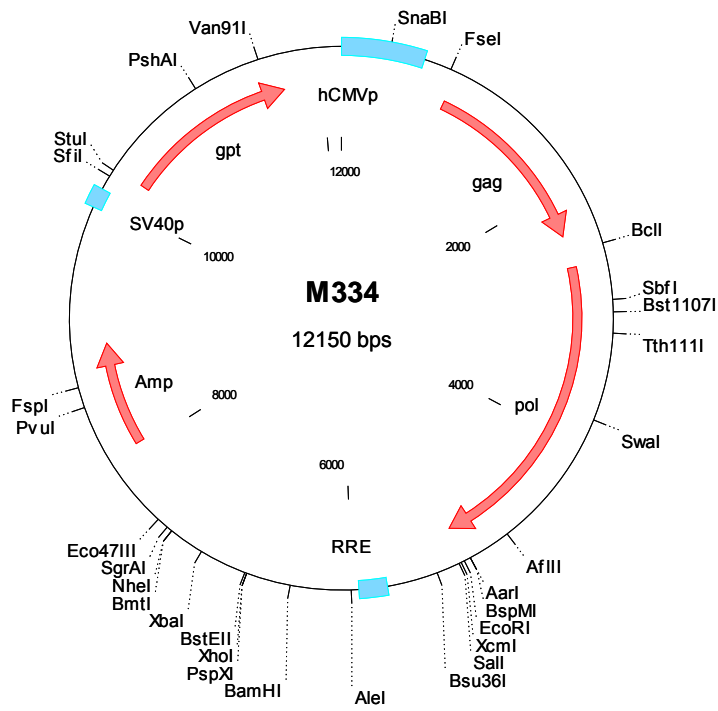


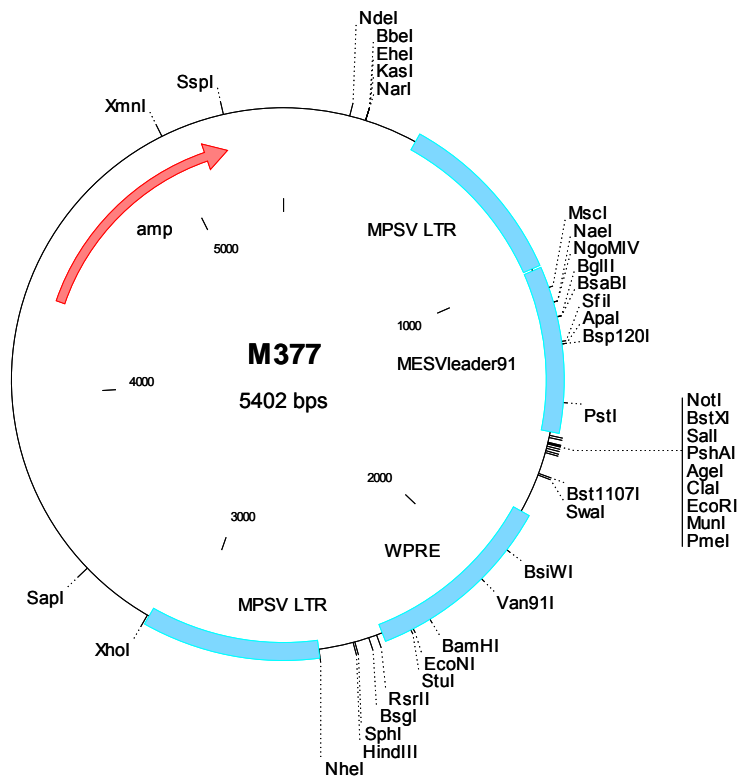
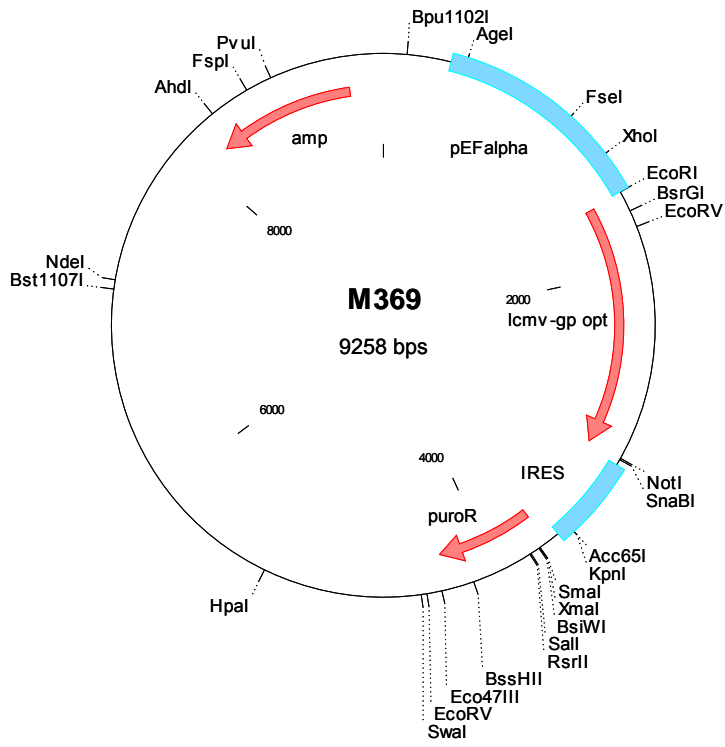
- Bbel
- Ehel
- KasI
- NarI
- EcoRI
- BamHI

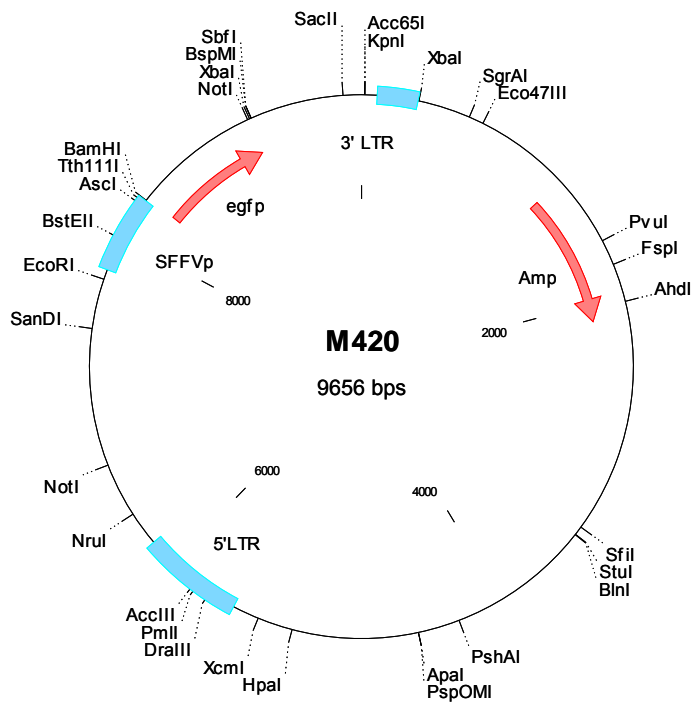
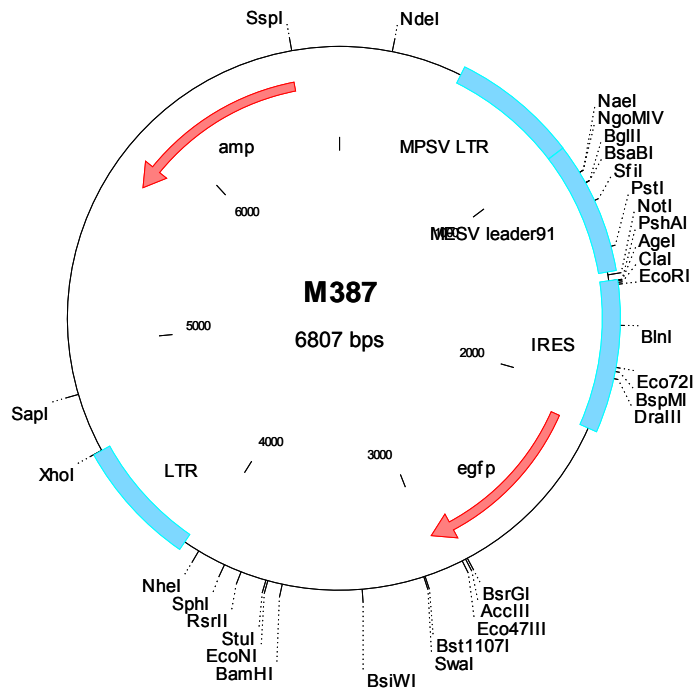


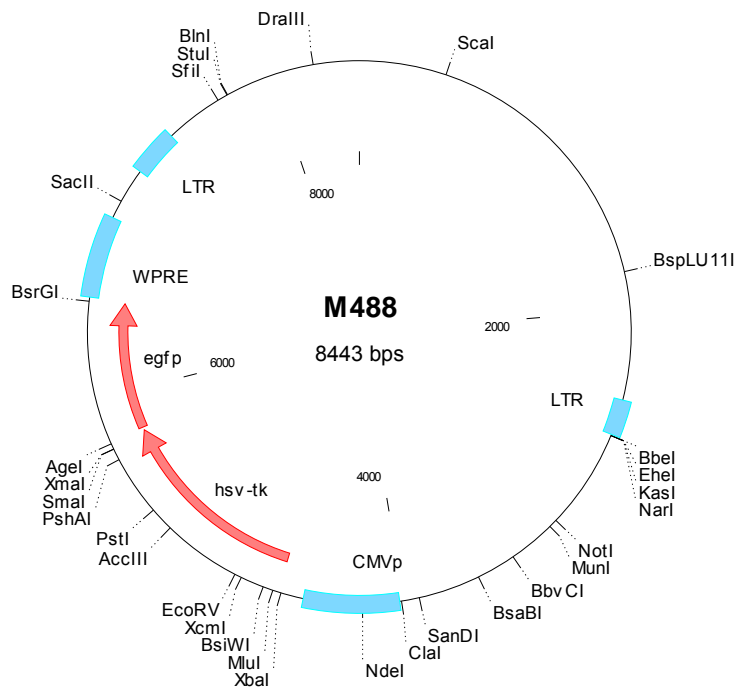
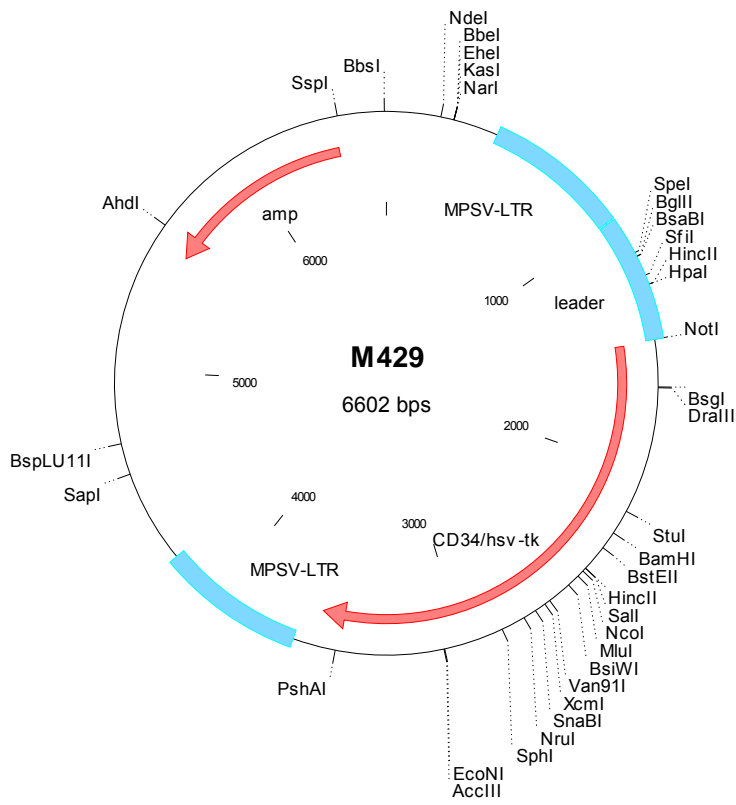


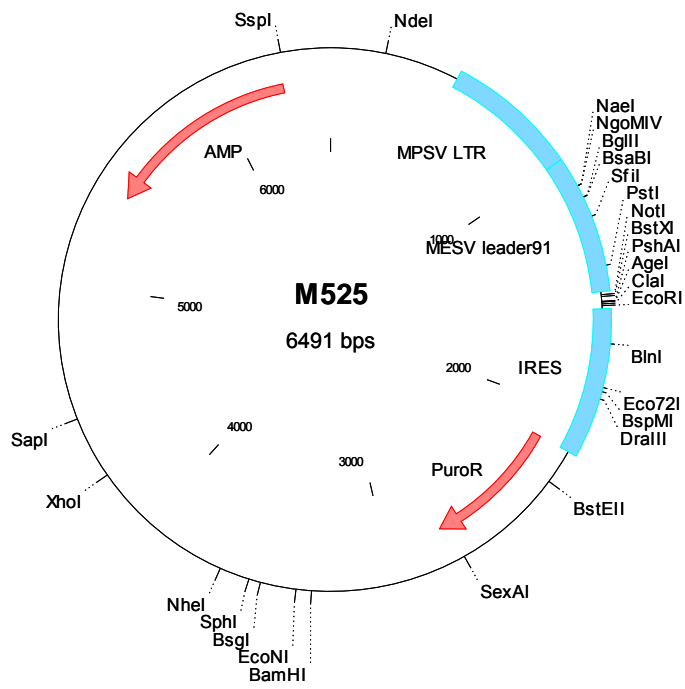
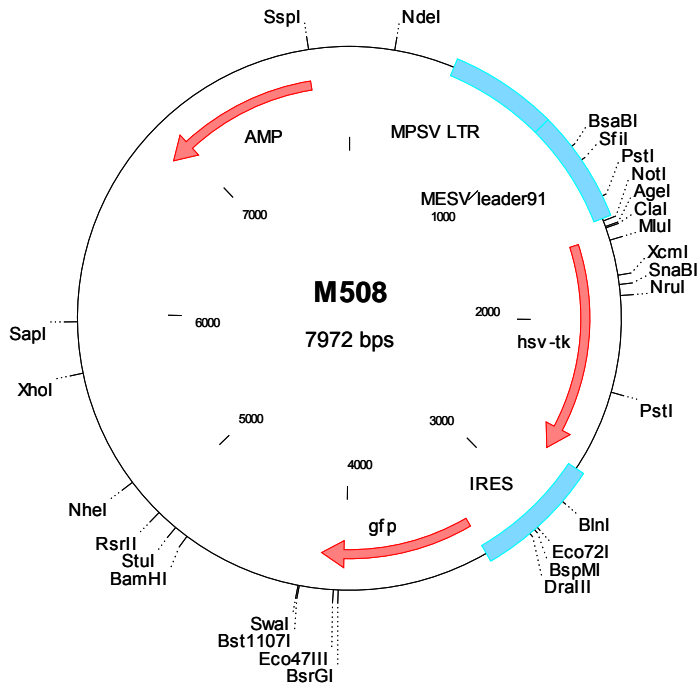


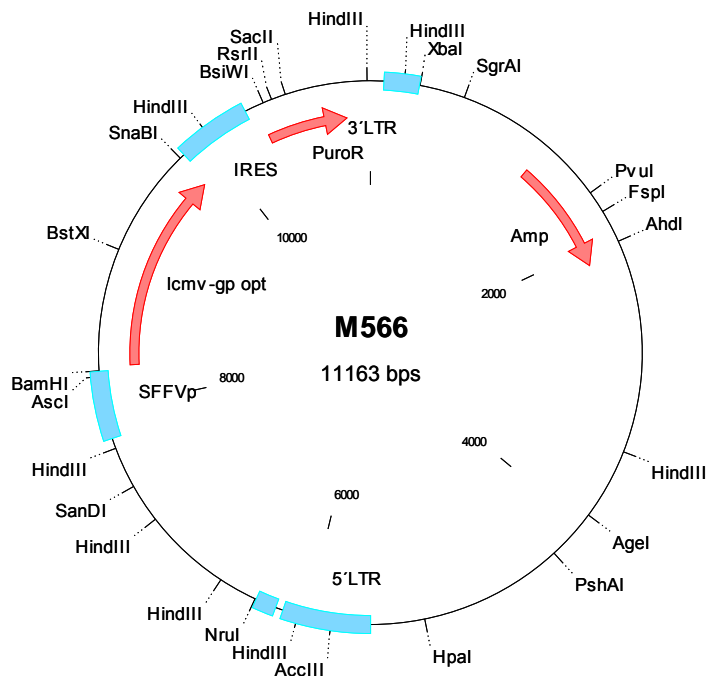
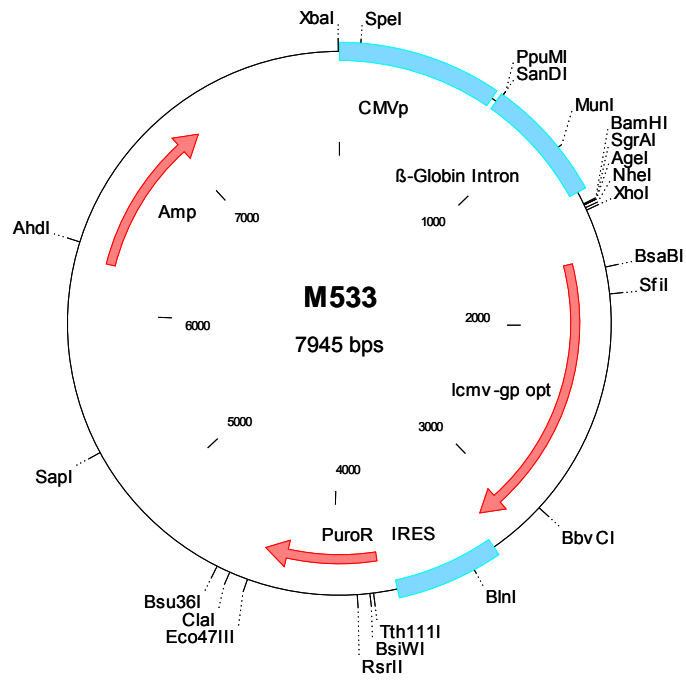


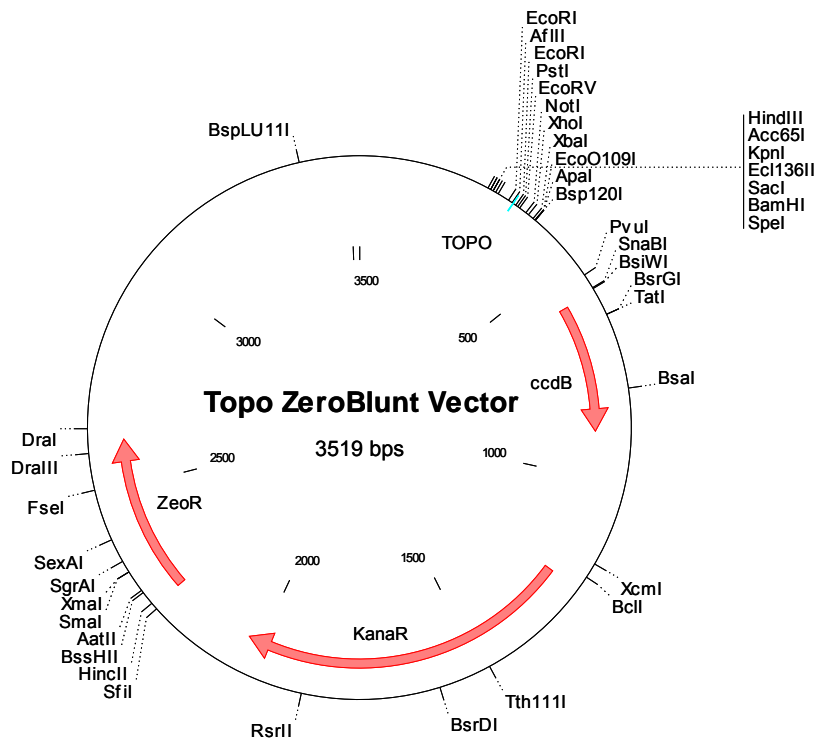
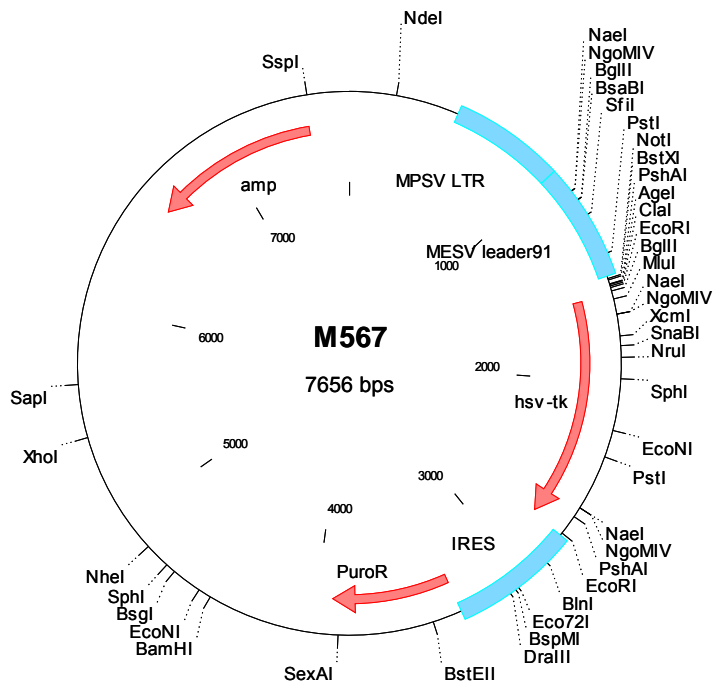












Lebenslauf

Yvonne Fischer

Adresse: Töplitzstrasse 10
60596 Frankfurt

geboren: 17. September 1976 in Nürnberg

Schulbildung

- | | |
|-------------|--|
| 1983 - 1987 | Besuch der Grundschule in Hersbruck, Bayern |
| 1987 - 1996 | Besuch des Paul-Pfinzing-Gymnasiums in Hersbruck, Bayern
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife |

Studium

- | | |
|-----------|--|
| 1996-2000 | Biologiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg |
| 1996-1998 | Grundstudium mit Diplomvorprüfung |
| 1998-2000 | Hauptstudium mit Schwerpunkten Genetik, Biochemie und Virologie |
| 2000-2001 | Biologiestudium an der University of Auckland, Neuseeland
Abschlussarbeit zum Thema: Charakterisierung des Wirkmechanismus neuartiger Chemotherapeutika
Abschluss mit dem Master of Science (Biological Science) |
| 2001-2005 | Promotionsstudiengang an der Universität Frankfurt |

Beschäftigung

- | | |
|---------------------|---|
| 03/2000–
05/2000 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Genetik,
Universität Erlangen-Nürnberg |
| 11/2001-
06/2005 | Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Georg-Speyer-
Haus in der Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. D. von Laer |

Frankfurt, 02.08.2005

Publikationen und Posterpräsentationen

Posterpräsentationen

Beyer W., Abel B., Fehse B., Stripecke R., Sirma H., Fischer Y., Westphal M., Schiedlmeier B., Ostertag W., von Laer D. (2002) Pseudotyped oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors for efficient transduction of primary human cells. Annual meeting of the German society for Virology, Erlangen, Germany

Fischer Y., Beyer W., Miletic H., Westphal M., von Laer D. (2002) Retroviral vectors pseudotyped with LCMV-GP for gene therapy of human gliomas. Conference of the European Society for Gene Therapy, Antibes, France

Miletic H., Fischer Y., Neumann H., Hans V., Giroglou T., Deckert M. and von Laer D. (2004) Specific and efficient transduction of gliomas by lentiviral vectors pseudotyped with LCMV glycoproteins. Conference of the European Society for Gene Therapy, Tampere, Finland

Publikationen

Miletic H.*, Fischer Y.*, Neumann H., Hans V., Stenzel W., Giroglou T., Hermann M., Deckert M., von Laer D. (2004) Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. Human Gene Therapy 15: 1091-1100

* beide Autoren haben in gleichen Teilen zu der Publikation beigetragen.