

Aus dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch
und dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Labortierkunde des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Effektivität der Prodrugs Ganciclovir, Aciclovir und
Valaciclovir nach Applikation des DCES-HSV-*tk* Suizidtherapiesystems
zur Behandlung des CC531-Lebermetastasenmodells der Ratte**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Christine Kratzel

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2002

Journal Nr. 2677

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt
Erster Gutachter :	Univ.-Prof. Dr. Norbert-Christian Juhr
Zweiter Gutachter:	Dr. habil. Iduna Fichtner
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt
Tag der Promotion:	06.12.2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
2	Grundlagen und Literaturübersicht 3
2.1	Kolorektales Karzinom und Lebermetastasen 3
2.1.1	Statistik 3
2.1.2	Äthiologie/Genetik 3
2.1.3	Prävention 4
2.1.4	Pathologie und Pathohistologie 4
2.1.5	Tumorausbreitung und Fernmetastasen 6
2.1.6	Angiogenese und Tumervaskularisierung 6
2.1.7	Therapie des Primärtumors/Kolonkarzinom 8
<i>2.1.7.1</i>	<i>Chirurgie</i> 8
<i>2.1.7.2</i>	<i>Strahlentherapie</i> 9
<i>2.1.7.3</i>	<i>Chemotherapie/ Immunotherapie</i> 9
2.1.8	Therapie der Lebermetastasen 10
<i>2.1.8.1</i>	<i>Chirurgie</i> 10
<i>2.1.8.2</i>	<i>Strahlentherapie</i> 11
<i>2.1.8.3</i>	<i>Chemotherapie der Lebermetastasen</i> 12
<i>2.1.8.3.1</i>	<i>Systemische und lokoregionäre Chemotherapie</i> 12
<i>2.1.8.3.2</i>	<i>Lokoregionäre Embolisation und lokoregionäre Chemoembolisation</i> 13
<i>2.1.8.3.3</i>	<i>Embolisate</i> 13
2.2	Gentherapie in der Onkologie 14
2.2.1	Definition 14
2.2.2	Allgemeine Strategien 15
2.2.3	Vektoren 16
<i>2.2.3.1</i>	<i>Virale Vektoren und Sicherheit</i> 17
<i>2.2.3.2</i>	<i>Liposomen als nichtvirale Vektoren</i> 19
2.2.4	Suizidgentherapie 20
<i>2.2.4.1</i>	<i>Spezielle Suizidgentherapie: die HSV-tk-vermittelte Therapie</i> 21
<i>2.2.4.2</i>	<i>Der Bystander-Effekt</i> 24
<i>2.2.4.3</i>	<i>DCES</i> 25
2.2.5	Therapiemonitoring 25
2.2.6	Substrate für die HSV-tk 26

2.2.6.1	<i>Aciclovir (ACV)</i>	26
2.2.6.2	<i>Valaciclovir (VCV)</i>	27
2.2.6.3	<i>Ganciclovir (GCV)</i>	28
3	Eigene Untersuchungen	30
3.1	Zielstellungen	30
3.2	Materialien und Methoden	32
3.2.1	<i>In-vitro</i>-Versuche	32
3.2.1.1	<i>MTT- Testprinzip</i>	32
3.2.1.2	<i>Zellkulturen und Durchführung des MTT- Assay</i>	32
3.2.1.3	<i>Zellkultivierung und Portionierung für den in-vivo-Versuch</i>	33
3.2.1.4	<i>Präparation der PEG- Liposomen mit pUT 649 (HSV-tk) für den in-vivo-Versuch</i>	34
3.2.2	Tierversuche	35
3.2.2.1	<i>Genehmigung, Tiere und Haltung</i>	35
3.2.2.2.	<i>Darstellung der Versuchsgruppen</i>	35
3.2.2.2.1	<i>Behandlungsgruppen</i>	35
3.2.2.2.2	<i>Kontrollgruppen</i>	35
3.2.2.3	<i>Behandlungsschema (Tumorzellinokulation, Lokoregionärer operativer Gentransfer, Prodrug-Applikation, Pharmakokinetik und Organprobennahme)</i>	36
3.2.3	HPLC- Messungen	39
3.2.3.1	<i>Anlage, Bestandteile und Einstellungen</i>	39
3.2.3.2	<i>Probennahme und –aufbereitung</i>	39
3.2.3.3	<i>Stabilitätsuntersuchungen zu den Prodrugs</i>	40
3.2.3.4	<i>Einfluß von Störfaktoren im chromatographischen System</i>	40
3.2.4	PCR- Messungen	40
3.2.4.1	<i>Prinzip</i>	40
3.2.4.2	<i>Probennahme und –aufbereitung</i>	41
3.2.4.3	<i>Anlage, Bestandteile und Einstellungen</i>	42
3.2.5	Histologie	44
3.2.5.1	<i>Probennahme</i>	44
3.2.5.2	<i>Objekträgerbeschichtung</i>	44
3.2.5.3	<i>Anfertigen der Gefrierschnitte</i>	44
3.2.5.4	<i>Verwendete histologische Färbetechniken</i>	45

3.2.5.5	<i>EDV- gestützte Auswertung der Tumorvolumina und -flächen</i>	46
4	Ergebnisse	47
4.1	<i>In vitro</i>-Versuche	47
4.1.1	<i>Einfluss von Aciclovir und Ganciclovir auf die Vitalität der Ratten-Kolonkarzinom- Zelllinie CC531 (MTT-Assay)</i>	47
4.1.2	<i>Einfluss von Aciclovir und Ganciclovir auf die Vitalität der Ratten-Glioblastom- Zelllinie F98 (MTT-Assay)</i>	49
4.2	Blutplasmawerte der Prodrugs	51
4.2.1	<i>Aciclovir aus Valaciclovir und bei verschiedenen Dosierungen/ Medikationen</i>	51
4.2.2	<i>Ganciclovir</i>	54
4.2.3	<i>Einfluss von Störfaktoren im chromatographischen System</i>	54
4.3	Nachweis der Anreicherung der HSV-tk mittels PCR	55
4.4	Tumorwachstum in den verschiedene Tiergruppen	57
4.5	Auftreten von Lungenmetastasen	62
4.6	Allgemeinbefinden und Auftreten von Nebenwirkungen in den Behandlungsgruppen	64
5	Diskussion	67
6	Zusammenfassung	78
7	Summary	80
8	Literaturverzeichnis	82
9	Anhang	97
9.1	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	97
	DANKSAGUNG	99
	LEBENS LAUF	100

DANKSAGUNG

Zunächst möchte unserer Arbeitsgruppenleiterin Frau Dr. Regina Reszka danken für die Überlassung des Themas, für ihre eingebrachten Ideen, ihre Unterstützung bei der Organisation der Experimente, sowie ihr Engagement bei der Finanzierung.

Für die schnelle und unkomplizierte Übernahme der Betreuung möchte ich Frau Dr. Fichtner, und Herrn Prof. Juhr danken.

Die Firma epo - experimental pharmacology & oncology Berlin-Buch GmbH ermöglichte mir freundlicherweise die Messung der Blutproben.

Basis für das Gelingen der Arbeit war fachliche Hilfe von Frau Bärbel Pohl (Zellzucht), Frau Jana Richter (Liposomenpräparation), Frau Ingrid Berger (HPLC) und Frau Claudia Stoefer (PCR): Danke!

Herrn Dr. Peter Karszewski vielen Dank für die Gespräche und Teilnahme an der biometrischen Auswertung der Ergebnisse sowie dem unermüdlichen Korrekturlesen. Auch allen anderen Korrekturlesern sei hiermit herzlich gedankt.

Frau Schmitz aus dem Institut für Biometrie unseres Fachbereiches gab mir wertvolle Hinweise für die statistische Aufbereitung der Daten.

Dem Tiermediziner Dr. Jörg Lode gilt mein herzlicher Dank für die Einführung in die Technik der intrarteriellen Applikation. Er und die Kollegin Antje Berndt gaben mir zudem viele praktische Tips.

Dr. Klaus Buchweitz sei gedankt für seine stetige Hilfe in Sachen Computerfragen.

Es war insgesamt eine schöne Zeit bei sehr angenehmen Arbeitsklima in der AG Drug Targeting am MDC Berlin.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Christine Kratzel
Geboren am: 02. Februar 1971 in Berlin
Anschrift: Landrestr.14, 12621 Berlin
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

September 1977 - Juli 1987 Polytechnische Oberschule in Berlin-Kaulsdorf
September 1987 - Juli 1989 Erweiterte Oberschule in Berlin-Friedrichshain
Juli 1989 Abschluss mit Reifeprüfung

Berufsausbildung, Studium, wissenschaftliche Ausbildung

September 1989 - September 1991 Lehramts-Studium für Informatik und Arbeitslehre / Technik an der Humboldt-Universität zu Berlin, Abbruch auf eigenen Wunsch aufgrund starker inhaltlicher Veränderungen des Studienganges
Oktober 1991 - Oktober 1993 Ausbildung zur MtA für Radiologie an der Landeslehranstalt für technische Assistenten in der Medizin in Berlin-Steglitz
Oktober 1993 - Dezember 1998 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Januar 1999 Aushändigung der Approbation, dann Hospitanz in Kleintierpraxis
Mai 1999 - Mai 2000 Einjahres-Anstellungsvertrag als tierärztlicher Assistent in einer Gemischtpraxis in Helmstedt
Mai 2000 - November 2000 Weiterbildung / Hospitanz und Nebenbeschäftigung in einer Kleintierklinik und bei einem Pferdepraktiker
Seit November 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG „Drug Targeting“ Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen angefertigt habe.

Berlin, Dezember 2002