

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Zielstellungen

Im Rahmen der Arbeit sollten drei verschiedene antiherpetische Wirkstoffe Valaciclovir, Aciclovir und Ganciclovir mit ihren unterschiedlichen Applikationsformen (oral und i.p.) hauptsächlich in ihrer Wirkung auf die selektive Giftung thymidinkinasetransfizierter Tumorzellen untersucht werden. Es sollten Erkenntnisse über die Beeinflussung des Tumorwachstums in einer HSV-*tk*-vermittelten Suizidgenstrategie am CC531-Lebertumormodell der Ratte erarbeitet werden. Dies ist ein etabliertes Modell für die Fernmetastasierung des humanen Kolonkarzinoms (Marquet, 1984 / Thomas, 1993).

Weiterhin wurden die Nebenwirkungen untersucht.

Einer oral applizierbaren und damit schonendere Medikation wäre bei Anwendung der Strategie am Tumorpatienten der Vorzug zu geben. Die Lebensqualität des Patienten könnte auf diese Weise gesteigert werden, dies durch deutliche Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes und durch Vermeiden einer Infusionstherapie. Nicht zuletzt die Kosten der Behandlung würden sich so reduzieren.

In-vitro-Versuche

Es sollte ein Zytotoxizitätsvergleich von Aciclovir und Ganciclovir in verschiedenen Konzentrationen auf nicht transfizierte und pUT 649 (HSV-*tk*) transfizierte Kolonkarzinomzellen (CC531) durchgeführt werden. Analog wurde der Versuch an einer weiteren Kontrollzelllinie (F98-Glioblastomzellen) überprüft.

In-vivo-Versuche

Im Tierversuch sollten CC531-Tumoren tragende Ratten der vorher beschriebenen Suizidgentherapie unterzogen werden. Die Tiere erhielten nach Gentransfer über zwei Wochen entweder das Prodrug Valaciclovir, Aciclovir oder Ganciclovir. Die Kontrollgruppe erhielt nach Gentransfer über zwei Wochen physiologische Kochsalzlösung. Für die Auswertung sollten folgende Parameter untersucht werden:

1. Das Tumolvolumen wurde vor und nach der Behandlung gemessen und mit den Kontrolltieren verglichen, um eine Aussage über die Effizienz der Behandlung, bzw. der Prodrugs treffen zu können. Ergänzend hierzu wurden auch die Tumorflächen vermessen.
2. Nach Beendigung der Therapie wurden die Blutplasmaspiegel der Prodrugs gemessen, dies ist besonders hinsichtlich der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit des Aciclovir bei i.p.-Gabe und oraler Gabe seines Valinsäureesters Valaciclovir wichtig.

3. Die Gewichte der Tiere als Parameter für das Allgemeinbefinden wurden im Versuchsverlauf dokumentiert.
4. Stichprobenartig wurde in den „Hochdosisgruppen“ das kleine Blutbild bewertet (Aufreten einer Leukozytopenie?).
5. Das Auftreten von Lungenmetastasen wurde makroskopisch und histologisch beurteilt.
6. Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurde eine weitere Gruppe mitgeführt und der Nachweis der mRNA des therapeutischen Gen in verschiedenen Organen über die Zeit mittels TaqMan-PCR realisiert.

3.2 Materialien und Methoden:

3.2.1 *In-vitro*-Versuche

3.2.1.1 MTT-Testprinzip

Der MTT-Test ermöglicht eine Einschätzung von Lebensfähigkeit und Wachstum einer Zellkultur. Er ist apparatetechnisch einfach, wenig zeitaufwendig und eine große Anzahl von Proben kann gemessen werden.

Mit Hilfe des Tests bestimmt man die Aktivität von Dehydrogenasen in Mitochondrien, unabhängig davon, ob diese gerade DNS synthetisieren oder nicht. Nach Zugabe von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zur Zellkultur entsteht aus dieser schwach gelben Lösung nach Aufbrechen des Tetrazoliumringes durch die mitochondrialen Dehydrogenasen das in Alkohol lösliche, dunkelblaue Formazan. Das danach zugegebene Detergenz Dimethylsulfoxid (DMSO) lysiert die Zellen und das Formazan wird freigesetzt. Die optische Dichte (OD) der alkoholischen Formazanlösung wird photometrisch bestimmt. Dabei ist die Extinktion umgekehrt proportional zur vitalen Zellzahl. Es sollten maximal 4×10^4 Zellen zur Messung gelangen, um die Empfindlichkeit des Tests (Linearität der Reaktion) zu wahren.

3.2.1.2 Zellkulturen und Durchführung des MTT-Assay

Es wurden zwei Zelllinien zur Testung der Zytotoxizität der Prodrugs verwendet: Die im Tierversuch eingesetzte Rattenkolonkarzinomzelllinie CC531 und als Kontrolle die Rattenglioblastomzelllinie F98. Beide Zelllinien wurden für einen Vergleich im Vorfeld auch mit dem therapeutischen Plasmid HSV-*tk* (pUT 649, Qiagen) stabil transfiziert. Das verwendete Plasmid trägt ein Resistenzgen gegen Zeocin.

Für die stabile Transfektion mit pUT 649 wurden DAC30 Liposomen verwendet. Die CC531- und F98-Zellen wurden in den Zellkulturmedien RPMI1640 und DMEM (Fa. GibcoBRL) mit jeweils 10 % Kälberserum gehalten. Für den Transfektionsansatz wurden 10 µg Lipid DAC30 mit 2µg pUT 649 zu den Zellen gegeben. Dieser Ansatz erfolgte in 200 µl Ringerlösung für 15 min. bei Raumtemperatur. Nach 24-stündiger Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und in 100mm-Schalen umgesetzt. 24 h später wurde ein Antibiotikum (Zeocin[®], Invitrogen, 100mg / ml) zur Selektion hinzugefügt, transfizierte Zellen waren Zeocin[®] resistent. Alle 48 h erfolgte ein Mediumwechsel. Für die F98 wurden 60 µl Zeocin auf 10 ml Medium, für die CC531 100 µl Zeocin auf 10 ml zum Medium zugegeben.

Auf drei 96-Well-Platten wurden Zellkulturen zu je einer Hälfte mit CC531 und CC531-pUT 649 angelegt. Jede Platte wurde mit Aciclovir und Ganciclovir in folgenden Konzentrationen behandelt: 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1 und 0,1 µg / ml.

24 h, 48 h und 72 h später wurde der MTT-Test durchgeführt. Die 96-Well-Platten lagerten bis zur Messung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre. 4 h vor dem jeweiligen Messzeitpunkt wurde das Medium verworfen und 100 µl der 0,5 %-igen MTT-Lösung zugegeben. Kurz vor der Messung wurde die Lösung verworfen und 100 µl DMSO (Dimethyl Sulfoxide[®], Serva, Heidelberg) aufpipettiert. Die anschließende Messung der OD erfolgte im Plattenreader (MRX_{TC} Revelation, Fa. Dynex Technologies). Die Vitalität (%) der behandelten Zellen wurde aus den OD-Werten der unbehandelten Kontrollzellen (K) und der behandelten Zellen (E) wie folgt berechnet:

- Vitalität (%) des behandelten Well = 100 x E / K

Der MTT-Test erfolgte in Doppelbestimmung (Bildung des Mittelwertes aus zwei Well-Platten).

Analog wurde mit der Glioblastomzelllinie auf drei weiteren 96-Well-Platten verfahren.

3.2.1.3 Zellkultivierung und Portionierung für den in-vivo-Versuch

Für die *in-vivo*-Versuche wurden CC531 Zellen eingesetzt. Sie wurden im Medium RPMI 1640 unter Zusatz von mit 25mM Hepespuffer, 10 % Rinderserum (Bovine Serum, BioChrom), 1 % antibiotischer / antimykotischer Zusatz (Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B, GibcoBRL) und 1 % L-Glutamin 200mM (GibcoBRL) kultiviert.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre in 75-cm²-Zellkulturflaschen (TPP, Schweiz) kultiviert. Die Passage erfolgte nach Konfluenz der Zellen und vorherigem Waschen mit PBS, um die Zellen vom Serum zu befreien.

Die Zellen wurden dann mittels Trypsin nach fünf Minuten Einwirkung bei 37 °C und Zugabe von 10 ml Kulturmedium vorsichtig von der Flasche gelöst. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, d.h. Zentrifugieren bei 1000 rpm und 4 °C (Varifuge 3.0R, Kendra-Heraeus, Berlin), Entfernen des Überstandes, Zugabe und Resuspension von 10 ml PBS zum Zellpellet. Nach erneutem Versetzen des Zellpellet mit 10 ml Medium erfolgte die Zellzählung. 50 µl Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblau (Trypan Blue Solution[®], Sigma, Deisenhofen) versetzt. Trypanblau dringt durch die geschädigte Plasmamembran toter Zellen ein und färbt Kern und Zytoplasma blau an. Eine Neubauer-Zählkammer (Merck) wurde dann mit 10-20 µl dieser Verdünnung beschickt. Die lebenden Zellen von 4 x 16 Feldern wurden ausgezählt, ihr Mittelwert gebildet und aufgrund der Verdünnung mit zwei multipliziert. Der Umrechnungsfaktor der Zählkammer 10⁴ gibt dann die Zellzahl / ml in der Ausgangssuspension an. Entweder wurde nun zur weiteren Passage eine neue Kulturflasche

beschickt (Zellsuspension : Medium = 1 : 10) oder es gelangten 3×10^6 Zellen in 1 ml PBS in den Tierversuch und lagerten bis zur Inokulation gekühlt auf Eis. Für den Tierversuch wurden jeweils 3×10^5 Zellen entnommen und pro Tier inokuliert (entsprechend 100 μ l der Zellsuspension).

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zellen in der Kulturflasche trypsiniert, gezählt, zentrifugiert (wie oben beschrieben) und bei etwa 0 °C mit Gefriermedium versetzt. Das Gefriermedium setzte sich aus Kulturmedium und 10 % DMSO zusammen. 1 ml der Suspension sollte etwa 10^6 Zellen enthalten und wurde in Kryoröhrchen (Biofreeze, Vial® 2,0 ml, Costar, Bodenheim) überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst für 2 Stunden bei -20°C, dann mindestens 24 h bei -70 °C gefroren und schließlich in Flüssigstickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen vollzog sich im 37 °C Wasserbad. Die Suspension wurde darauf mit 40 ml Kulturmedium in 50 ml-Röhrchen überführt und bei 21 °C und 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet mittels 5 ml Kulturmedium in eine weitere Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und Weiterkultivierung in neuen Zellkulturflaschen.

3.2.1.4 Präparation der PEG-Liposomen mit pUT 649 (HSV-tk) für den in-vivo-Versuch

Für die Präparation der PEG-Liposomen mit pUT 649 (HSV-tk) wurden 25 mg / ml hydriertes Ei-Phosphatidylcholin (HSPC, Nattermann Phospholipid GmbH, Köln), 12,5 mg / ml Cholesterol (CH, Merck, Darmstadt) und 2,7 mg / ml Polyethylenglykol (MPEG-DSPE, 2000; Genzyme-Sygena Facility LTD, Liestal, Schweiz) im molaren Verhältnis 1:1:0,3 in Chloroform gelöst.

Der Lipidfilm wird in einem 25 ml Glas-Rundkolben angesetzt und die organische Phase im Wasserbad bei 37 °C (BÜCHI Watherbath B-480) unter Rotation (BÜCHI Rotavapor R-124) verdampft. Zum getrockneten Lipidfilm wird 100 μ g pUT 649 in 500 μ l Aqua inj. dazu gegeben. Der Lipidfilm wird durch kurzes Erwärmen gelöst. Der Ansatz wird über Nacht geschüttelt (Thys 2, VEB MLW Labortechnik Ilmenau). Es entstehen multilamelläre Vesikel (MLV).

3.2.2 Tierversuche

3.2.2.1 Genehmigung, Tiere und Haltung

Durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und Soziales wurde dieses Versuchsvorhaben unter der Kurzbezeichnung „Lebertumore“ und der Genehmigungsnummer G 0071 / 98 autorisiert.

In den Versuch gelangten adulte männliche WAG / Rij Ratten (Züchter: Harlan, Tierzucht Schönwalde) mit einem Gewicht zwischen 260 g – 330 g.

Die Haltung der Tiere erfolgte zu zweit in einem Käfig auf spezieller Einstreu, freiem Zugang zum Futter (beides Sniff) und Wasser. Die Tiere wurden im 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten, die Luftfeuchte betrug 60 % und die Umgebungstemperatur 21 - 24°C.

3.2.2.2 Darstellung des Versuchsgruppen

3.2.2.2.1 Behandlungsgruppen:

Die Gruppen für den Versuchsaufbau gestalteten sich wie folgt (vgl. auch S. 38):

- Gruppe I: mind. 10 ACV-behandelte Tiere oral mit VCV 2 x 25 mg / kg, über 14 Tage
- Gruppe II: mind. 10 ACV-behandelte Tiere i.p. mit ACV 1 x 25 mg / kg, über 14 Tage
- Gruppe III: mind. 10 ACV-behandelte Tiere i.p. mit ACV 1 x100 mg / kg, über 14 Tage
- Gruppe IV: mind. 10 GCV-behandelte Tiere i.p. mit GCV 1 x100 mg / kg, über 14 Tage

Die Wahl der Dosierung bei Gruppe I ließ Plasmaspiegel an ACV - aus VCV – erwarten, die auch maximal beim Menschen erreichbar wären. Dies sollte später durch HPLC-Analytik überprüft werden. Im Vergleich dazu in Gruppe II ein geringer dosiertes i.p.-appliziertes ACV-Präparat. Alle intraperitonealen Applikationen wurden aus ethischen Gründen nur einmal täglich durchgeführt. Die Wahl der Dosierungen richtete sich bei zuletzt genannten hochdosierten Gruppen III und IV nach Literaturangaben. Die Dosierung von 100 mg / kg ist bei HSV-*tk*-suizidtherapeutischen Behandlungen am Rattentumormodell die am häufigsten beschriebene.

3.2.2.2.2 Kontrollgruppen

Zu diesen Gruppen gehörten jeweils Kontrolltiere (mindestens 2 - 5 Tiere pro Gruppe), als Tumorwachstumskontrolle. Den Kontrolltieren wurden die Tumorzellen zum selben Zeitpunkt inokuliert, zu welchem die jeweils behandelten Tiere die Tumorzellen erhielten. Zur statistischen Auswertung wurden diese Tiere dann in eine Gruppe zusammengefasst. Im Rahmen des Behandlungsschemas wurden den Kontrolltieren jedoch nach Applikation des DCES innerhalb der 14-tägigen Behandlung anstelle des Prodrugs 1 ml physiologische NaCl-Lösung i.p. injiziert.

Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurden fünf Tieren das Gen im DCES appliziert und die Tiere am Tag 1, 2, 5, 9 und 14 euthanasiert und Organproben für die Expressionsbestimmung mittels PCR entnommen (vgl. Kap. 4.4.2).

3.2.2.3 Behandlungsschema (Tumorzellinokulation, Lokoregionärer operativer Gentransfer, Prodrug-Applikation, Pharmakokinetik und Organprobennahme)

Das Behandlungsschema kann nach Abb. 4 zusammengefasst werden und wird im folgenden erläutert:

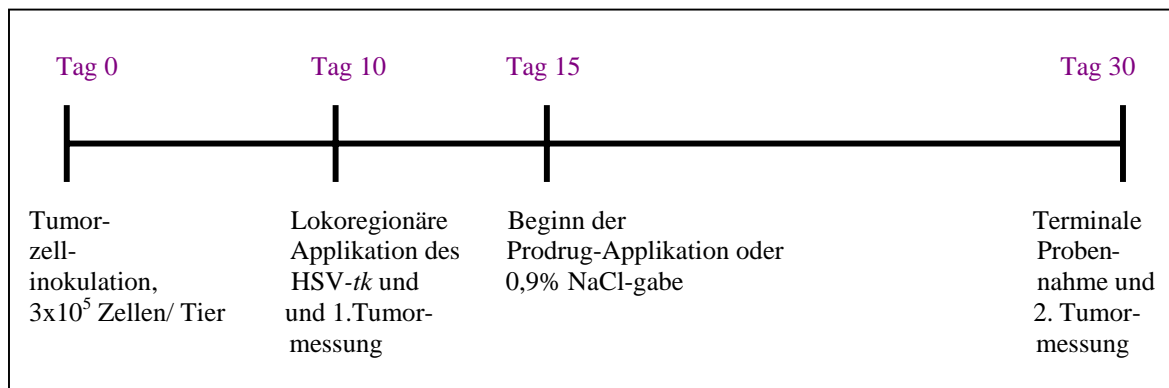


Abb. 4: Schema des *In-Vivo*-Versuchsablaufes

Am Tag 0 erfolgte die Tumorzellinokulation. Dazu wurde den Tieren, unter Ketamin / Xylazin narkotisiert (75 mg / kg Ketamin + 5 mg / kg Xylazin i.m., Ketavet[®] Fa. Pharmacia-Upjohn + Rompun[®] Fa. Bayer), nach Rasur und Desinfektion des OP-Feldes mittels eines ca. 2 cm Schnittes in der Linea Alba und kaudal des Proc. xiphoideus der Bauch eröffnet, der linke Leberlappen vorgelagert und subkapsulär, etwa 5 mm von der Einstichstelle entfernt 0,1 ml der CC531 Zellsuspension injiziert. Die Einstichstelle wurde dann mit Histoacryl[®]-Gewebekleber (B. Braun Surgical GmbH, Melsungen, Deutschland) verschlossen, Bauchdecke und Haut abschliessend jeweils mit Einzelheften vernäht (4 / 0 Vicryl, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Eine Gewichtsmessung wurde durchgeführt.

Am Tag 10 wurde nach erneuter Gewichtsbestimmung das Genkonstrukt appliziert. Dazu wurde nach Rasur und Desinfektion des Bauches entlang des rechten Rippenbogenrandes ein Schnitt begonnen, welcher bis über die Linea alba verlängert wurde. Der Lebertumor wurde nun in zwei Dimensionen vermessen, in seiner Länge (a) und Breite (b). Das Tumolvolumen wurde später mit Hilfe der in der Onkologie häufig verwendeten Sphäroidformel ($V = a \times b^2 / 2$) berechnet. Mittels Wundgaze wurden Darmkonvolut und Leber leicht kaudal bzw. kranial verlagert und die A. gastroduodenalis und A. hepatica communis freipräpariert. Die A. gastroduodenalis wurde proximal ihrer Aufzweigung (zum Magen / Pankreas) ligiert

und die A. hepatica communis angezügelt, um den Blutfluß zu regulieren. Die A. gastroduodenalis wurde eröffnet und ein Polyethylen-Katheter mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm eingebracht. Der Katheter wurde mit einer weiteren Ligatur gesichert. Für alle Ligaturen und den Zügel wurde 5 / 0 Seide verwendet (Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

In Vorversuchen mit Reportergenen erwies sich die Zusammensetzung 0,1 ml Spherex[®] (Pharmacia, Erlangen), 0,05 ml PEG-liposomal verkapseltes Gen und 0,25 ml Ringerlösung am effektivsten bezüglich der Transfektionseffizienz und kam deshalb auch in diesem Versuch zur Anwendung. Die Lösung wurde in der Mischspritze aufgezogen und diese dann dem Katheter aufgesetzt.

Nun wurden 50 µl Genkonstrukt in die A. hepatica propria im Wechsel mit 20 Sekunden Blutdurchfluss aus der angezügelten A. hepatica communis appliziert, bis die Gesamtmenge von 400 µl erreicht wurde (zur Gefäßdarstellung vgl. Abb. 5). Der Katheter wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, anschließend entfernt und das Gefäß oberhalb der Arteriotomie ligiert. Die Bauchmuskulatur wurde fortlaufend und die Haut in Einzelheften verschlossen, dazu wurde wieder 4 / 0 Vicryl genutzt.

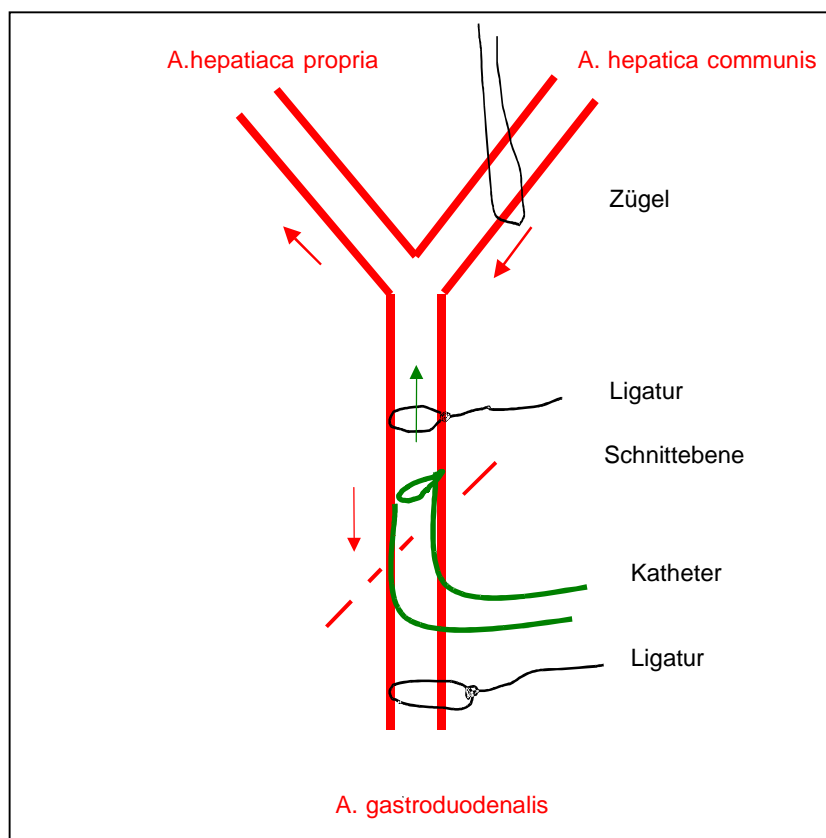


Abb. 5: Schematische Darstellung der Gefäße und der lokoregionären Therapie

Bei Bedarf konnte bei auftretendem postoperativem Wundschmerz Flunixinmeglumin (Finadyne Canis[®], Berna Veterinärprodukte AG) in der Dosierung 2 mg / kg bis zu 2x täglich s.c. injiziert werden.

Nach weiteren 5 Tagen erfolgte die Applikation des jeweiligen Prodrugs **über 14 Tage** bei den Behandlungsgruppen (vgl. auch S. 35):

- Gruppe I: 2x täglich 25 mg / kg Valacyclovir (Valtrex[®], GlaxoWellcome) aus dem Tablettenhomogenisat, in Suspension per Magenschlundsonde (Knopfkanüle)
- Gruppe II: 25 mg / kg Aciclovir (Zovirax[®], GlaxoWellcome, Injektionslösung nach Vorschrift und mit 5 % Glucose auf 1 ml verdünnt) i.p.
- Gruppe III: 100 mg / kg 100 mg / kg Aciclovir (wie oben, jedoch Injektionsvolumen 1,5 ml) i.p.
- Gruppe IV: 100 mg / kg Ganciclovir (Cymevene[®], Syntex , Injektionslösung nach Vorschrift und mit 5 % Glucose auf 1ml verdünnt) i.p.

Die Kontrollgruppe erhielt das entsprechende Volumen 0,9 %-ige NaCl-Injektionslösung.

Für diese Applikationen und auch vor jeder Narkose wurden die Tiere über Aetherinhalation leicht sediert, um ihnen unnötigen Stress beim Injizieren / Sondieren zu ersparen.

Für die intraperitonealen Injektionen wurde die Haut (noch geschoren von der lokoregionären OP) desinfiziert, die 27G x ¾ Kanüle im unteren Bauchdrittel intraperitoneal platziert und nach Aspiration für eine eventuell erforderliche Korrektur das Prodrug oder physiologische NaCl-Lösung appliziert.

Am Tag 30 wurden nach letztmaliger Applikation die Tiere wieder anästhesiert, ein letztes Mal gewogen und Blut zu den Zeitpunkten 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h und 4 h entnommen, um die maximalen Plasmakonzentrationen (c_{max}), wie im Kapitel 4.3.2 beschrieben, zu bestimmen. In den Hochdosisgruppen des Aciclovir und des Ganciclovir erfolgten noch Vollblutentnahmen in EDTA-Röhrchen, diese gelangten umgehend zur Bestimmung des kleinen Blutbildes (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, und PLT) an den Coulter Counter T 840.

Nach Euthanasie der narkotisierten Tiere durch Aetherinhalation wurden die verschiedenen Organe (Leber mit Tumor , Lunge, Niere) für die späteren Färbungen entnommen und wie beschrieben sofort schockgefroren.

Die zugehörigen Kontrolltiere aus derselben Inokulation durchliefen dieselben Schritte bis auf die 14-tägige Prodrug-Applikation. Ihnen wurde an dieser Stelle physiologische NaCl-Lösung injiziert.

Die Kontrolltiere für den Transfektionserfolg wurden gleichermaßen inokuliert, operiert, jedoch wie im Kap 4.4.2 beschrieben nach verschiedenen Tagen euthanasiert und Organproben entnommen.

3.2.3. HPLC-Messungen

3.2.3.1 HPLC-Anlage, Bestandteile und Einstellungen:

Anlage:	Shimadzu LC 10, Communications-Bus Module CBM 10-A, Säulenofen CTO-10 A, 2 Pumpen LC-10 AD, Autoinjektor SIL-10, Detektor SPD-M10 A, Detektor SPD-10AV,
Steuerung:	CLASS LC 10 Workstation mit Class LC 10 Software
Vorsäule:	LiChroCART 4 – 4, LiChrosphere 60 RP-select B (5µm)
Trennsäule:	LiChroCART 125 – 4, LiChrosphere 60 - select B (5µm)
Mobile Phase:	0,02 M KH ₂ PO ₄ -Puffer pH-4,0, 4VT Methanol
Flußrate:	0,6 ml / min.
Ofentemperatur:	25 °C
Detektion:	UV bei 254 nm
Injektionsvol.:	10 µl

3.2.3.2 Probennahme und -aufbereitung

Am Tag 30 wurden die Tiere letztmalig behandelt, sofort in Narkose gelegt und Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 0,5 h; 1 h; 2 h; 3 h und 4 h nach der Prodrugapplikation durchgeführt. Diese Blutentnahmen erfolgten im retrobulbären Venenplexus und terminal durch Herzpunktion. Anschließend erfolgte die Euthanasie der narkotisierten Tiere durch Aetherinhalation. Das gewonnene Blut wurde sofort in heparinisierte Eppendorf-Tubes aufgenommen und daraus Plasma durch Zentrifugation bei 3000 rpm über 4 min. gewonnen. Das Plasma wurde wie beschrieben bei – 70 °C gelagert, bis es zur Extraktion und damit zur chromatographischen Untersuchung gelangte.

Die Extraktion wurde wie folgt durchgeführt:

50 µl Plasma oder Serum wurden in ein Eppendorfröhrchen überführt, 50 µl 0,8 M Perchlorsäure dazugegeben und 5 min. geschüttelt (Schüttler/ Eppendorf). Die Proben wurden bei 4 °C in ein Iso-Therm-System (Eppendorf) gestellt und nach 10 min. bei 4 °C und 1200 rpm für 10 min. zentrifugiert (Kühlzentrifuge/ Eppendorf). Die Eiweiße konnten derart abgetrennt werden.

66 µl Zentrifugatüberstand wurden in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und 20 µl 3 M K₂HPO₄-Puffer bei pH 8,0 dazugegeben. Erneut wurde geschüttelt, das Iso-Therm-System

und die Kühlzentrifuge verwendet. Der Überstand wurde in ein Vial überführt und direkt der HPLC-Analytik zugeführt.

3.2.3.3 Stabilitätsuntersuchungen zu den Prodrugs

Da nicht alle Plasmaproben sofort zur Konzentrationsbestimmung an das HPLC-Gerät gelangten, sind Voruntersuchungen zur Stabilität der verwendeten Prodrugs bei längerer Lagerung nötig. Deshalb wurden Messungen von Proben mit bekannten Ausgangswerten zu verschiedenen späteren Zeitpunkten wiederholt: nach 13 Tagen, nach 19 Tagen und 30 Tagen, um eventuelle Abweichungen zu bestimmen.

Die Lagerung der Proben in heparinisierten (Fa. G.Richter , 10µl / Tube) Eppendorf-Tubes erfolgte im Gefrierschrank bei – 70 °C (Fa. Forma Scientific, -86 °C Freezer).

Die Stabilität des Ganciclovir im Plasma bei Lagerung des Plasma bei –70 °C ist aus Voruntersuchungen bekannt.

3.2.3.4 Einfluss von Störfaktoren im chromatographischen System

Die Blutentnahmen erfolgten unter Narkose der Tiere. Um Störfaktoren im chromatographischen System auszuschließen, wurden vorher die verwendeten Pharmazeutika (Rompun[®], Ketavet[®]) in HPLC-Wasser gelöst und auf störende Peaks überprüft. Ebenso wurde das Heparin (Fa. G. Richter) untersucht, welches den Blutentnahme-Tubes zugesetzt wurde.

Das Homogenisat der Valacyclovir-enthaltenden Tabletten (Valtrex[®], Fa. GlaxoWelcome) wurde auf seine Zusammensetzung und eventuelle Störfaktoren überprüft.

3.2.4 PCR-Messungen

3.2.4.1 Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein sensibles, schnelles, empfindliches und relativ einfaches Verfahren zum Nachweis von DNA im Genom. Die nachzuweisende DNA muss dazu, zumindest teilweise, bekannt sein. Als erster Schritt wird durch Hitzezufuhr die DNA-Doppelhelix denaturiert und damit entspiralisiert und in ihre Einzelstränge aufgespalten. Durch Zugabe von Primermolekülen (Anfangs- und Endsequenzen des nachzuweisenden DNA-Abschnittes, sog. „Startermoleküle“) synthetisiert zugesetzte DNA-Polymerase in Gegenwart von ATP, Magnesium und Nukleotiden komplementäre Stränge des betreffenden Abschnittes. Durch Temperaturabfall schließen sich die nicht replizierten Einzelstränge wieder. Bis zu 30 Mal wird dieser Reaktionszyklus wiederholt. Eine große Menge des spezifischen DNA-Abschnittes entsteht innerhalb von wenigen Stunden.

Wird RNA mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben, so kann auch diese mit dem PCR-Verfahren vermehrt werden.

3.2.4.2 Probennahme und -aufbereitung

Zur Expressionsbestimmung wurden nach dem in Abb. 6 aufgeführten Zeitschema die Tiere behandelt und nach Euthanasie Organproben entnommen. Proben folgender Organe wurden entnommen: Lebertumor, Leber, Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Magen, Dünndarm, Hoden, Lymphknoten, Niere und Knochenmark. Die Proben wurden sofort in sterile Plastikröhrchen überführt und in Flüssigstickstoff gefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur weiteren Bearbeitung gelagert.

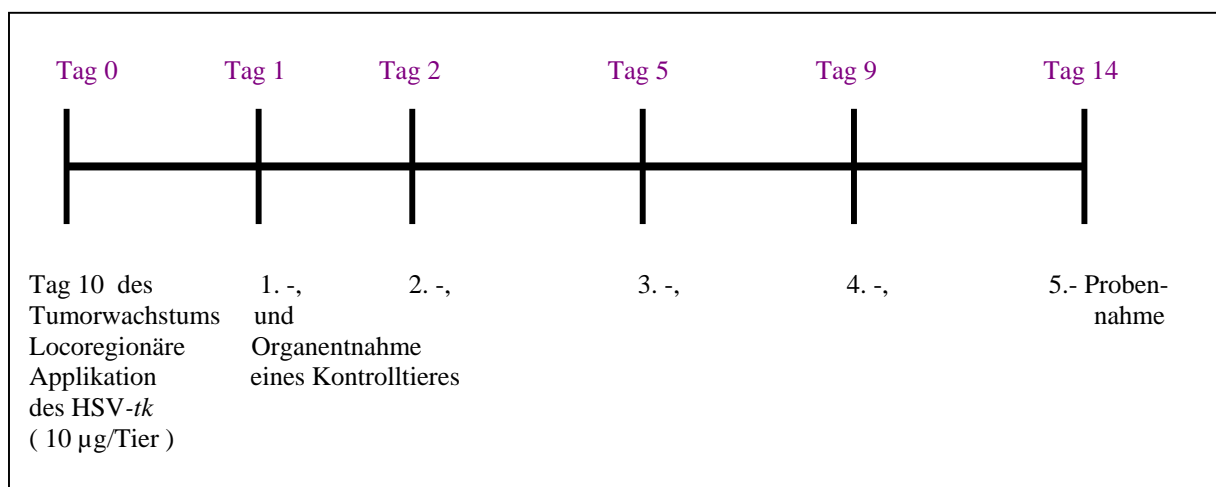


Abb. 6: Zeitschema zur Behandlung und Probennahme für den Gennachweis per PCR

Unter Kühlung durch Flüssigstickstoff und mittels Mörser und Pistill wurden die gefrorenen Gewebestückchen homogenisiert, in sterile 15 ml Röhrchen verbracht, mit Trizol (ca. 1 ml / 100 mg Gewebe, Fa. GIBCO) vermischt und bis zur weiteren Bearbeitung wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

In Anlehnung an ein Protokoll der Firma GIBCO BRL wurde dann DNA und RNA aus diesem Gewebe-Homogenisat isoliert. Zur Phasenseparation wurden zunächst die Proben für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden pro 1 ml Probe 0,2 ml Chloroform (Fa. Roth) und 0,75 ml Trizol zugegeben, 15 sek. heftig geschüttelt und die Probe 2 - 15 min. erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 15 min. bei 4°C . Damit trennten sich deutlich die Phasen voneinander ab: die untere, rote, phenol- und chloroformhaltige DNA-enthaltende Phase, die weiße Interphase mit DNA und Proteinen und die obere, farblose, wässrige, RNA-enthaltende Phase.

Für die Isolierung der RNA wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol über 10 min. bei Raumtemperatur ausgefällt und 10 min. bei

4 °C und 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 % Alkohol (mit DEPC-Wasser verdünnt) gewaschen und erneut zentrifugiert, 10 min. bei 4 °C und 7500 rpm. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet kurz getrocknet zur Entfernung des Ethanols. Das Pellet wurde in RNase freiem Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert.

Es folgte eine Kontrolle der Menge und Qualität der RNA über eine optische Dichtemessung am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf). Dazu wurde 1 µl RNA in 99 µl Wasser gelöst und die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260nm}) auf 0,1 - 0,5 eingestellt. Eine OD von 1,0 entspricht einer Menge von 40 µg RNA / ml. Der Quotient zwischen OD_{260nm} / OD_{280nm} sollte bei 1,8 liegen, um eine gute Qualität der RNA zu garantieren. 200 ng RNA pro Probe gelangten zur PCR.

3.2.4.3 Anlage, Bestandteile und Einstellungen

Am TaqMan-Gerät (ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System, Fa. Applied Biosystems) kann bestimmt werden: Vorhandensein (DNA) und Expression (RNA) der applizierten HSV-*tk*.

Eine Untersuchung auf DNA-Gehalt der Proben ist zwar möglich, fand aber nicht statt, da für das Funktionieren der Suizidgenstrategie entscheidender ist, ob aus dem eingeschleusten HSV-*tk*-Gen RNA synthetisiert und damit das eingebrachte Enzym produziert wird oder nicht.

Art und Menge der für die PCR notwendigen Reagenzien und Probenmengen sind auf folgender Seite in Tabelle 5 aufgelistet. Als Primer wurden folgende Sequenzen verwendet:

- Forward Primer: 5' - GCT ATG CTG GCT GCG ATT C-3 (Position 1439 - 1457 im HSV-*tk*-Gen)
- Reverse Primer: 5 - GCA CTG CAG ATA CCG CAC C-3 (Position 1486 – 1505)
- Sonde (liegt zwischen den Primern): 5' – CCG CGT TTA CGG GCT ACT TGC CA-3
(Position 1459 – 1481)

SinglePLEX

Transfection

Cell type
number of 110
samples
TARGET HSV-*tk*

sample vol (µl)= 20

MASTER MIX

<i>Stock solns.</i>		<i>µl per rxn</i>	<i>X number rxn</i>	<i>total vol</i>	<i>Final conc.</i>
	TAQMAN "pre-Master" Mix	27,50	110	3.025,0	22,00 µl / rxn
40U / µl	RNAse Inhibitor	-	110	-	10,00 U / rxn
5U / µl	Taq-Polymerase	0,25	110	27,5	1,25 U / rxn
100µM	Forward Primer	0,30	110	33,0	600,00 nM
100µM	Reverse Primer	0,30	110	33,0	600,00 nM
100µM	actin U primer	-	110	-	40,00 nM
100µM	actin L primer	-	110	-	40,00 nM
100µM	Sonde	0,10	110	11,0	100,00 nM
100µM	actin FI-VIC probe	-	110	-	100,00 nM
	water	11,50	110	1.268,5	
200U/µl	Revers.Tr.	0,05	40	2,0	10,00 U / rxn
total volume		40µl		4400	

Add 40µl of above Master Mix to 10µl of total RNA / rxn

TAQMAN PROGRAM

48°C 30 min.

95 °C 10 min.
95 °C 15 sec

60°C 1 min.

RT step

**Activates TaqGold
Denatures template**

x 45
cycles
x 45
cycles

annealing / extension

Tab. 5: Reagenzien-, Probenmenge und PCR-Programm für das Gerät ABI Prism® 7700 Sequence Detection System, Fa. Applied Biosystems

3.2.5 Histologie:

3.2.5.1 Probennahme:

Entnommen wurden den Tieren der Behandlungsgruppen und zugehörigen Kontrollen Leber mit Tumor, Lunge, beide Nieren und z.T. Lymphknoten (Lnn. axillares).

Diese Organe wurden unmittelbar nach Entnahme in trockeneisgekühltem 2-Methylbutan (Roth, Karlsruhe) mit etwa $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.5.2 Objektträgerbeschichtung:

Zur besseren Anheftung der Schnitte wurden die Objektträger wie nachfolgend beschrieben beschichtet:

- Ethanolbad 70 % 10 min. , anschließende Trocknung
- 2x 1 min. 3-Aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, Steinheim) 2 %-ig in Aceton
- 2x 1 min. Acetonbad
- 2x 1 min. in Aqua dest.
- Trocknung min. d. 6 h bei 60°C

Wie die Organe wurden diese Objektträger 30 min. vor dem Anfertigen der Gefrierschnitte zum Temperatenausgleich auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kryostaten gekühlt.

3.2.5.3 Anfertigen der Gefrierschnitte:

Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Organproben den Kryostaten (Leica CM3050, Leica Instruments, Nussloch) verbracht und 30 min. bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert. Die Organproben wurden dann mit Tissue Tek[®] (Sakura finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) auf den Probenhalter verbracht. Die Temperatur des Objektträgers betrug -22°C . Mithilfe eines Schnittführers (Glas, 60 mm, Leica) wurden $10\text{ }\mu\text{m}$ starke Schnitte auf die beschichteten Objektträger (76x26x1 mm, Marienfeld, neoLab, Heidelberg) übertragen. Wenn es die (Tumor-) Größe zuließ, wurden mehrere Sektionen auf einen Objektträger verbracht.

Der Lebertumor wurde zentral und im Randbereich mit Lebergewebe geschnitten, er hob sich deutlich schon ohne Färbung ab.

Für die EDV-gestützte Größenauswertung wurden zentrale Schnitte des Tumors mit Lebergewebe Kresylviolett und für die zell- / gewebemorphologischen Auswertung mit Hämatoxylin / Eosin gefärbt.

3.2.5.4 Verwendete histologische Färbetechniken

Kresylviolett-Färbung:

Die verwendete Färbelösung wurde zur Herstellung einer 0,5 %-igen Lösung wie folgt angesetzt:

- Kresylviolett-Acetat [®] , Merck	5 g
- A. bidest	600 ml
- 1 M Natriumacetat ,Merck	60 ml
- 1 M Essigsäure ,Roth	340 ml ca.
(1 Woche rühren und vor Anwendung filtrieren)	

Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet und nach folgendem Schema gefärbt:

- Kresylviolett- Lösung 0,5 %	6 min.
- 70 % Ethanol	2 min.
- 80 % Ethanol	2 min.
- 90 % Ethanol	2 min.
- 96 % Ethanol	10 min.
- 100 % Ethanol	2 min.
- Xylolbad (Merck)	kurz
- Eindeckeln mit Eukitt [®] (O.Kindler, Freiburg) und Deckgläschen (24 x 50 mm, Marienfeld)	

Hämatoxylin –Eosin-Färbung :

Die verwendeten Färbelösungen wurden wie folgt angesetzt:

Hämatoxylin-Lösung : Mayers Häkalaun Lösung [®] (Merck) 1:1 in Aqua dest.
Eosin-Lösung: Eosin Yellowish [®] (Fluka) 0,5 % in Aqua dest. mit 2 - 3 Tropfen HCl , 20 %

Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet und nach folgendem Schema HE gefärbt:

- Abspülen in Aqua dest.	kurz
- Hämaun- Färbung	20 sek.
- Abspülen in Aqua dest.	kurz
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser	10 min.
- Abspülen in Aqua dest.	kurz
- Eosin- Färbung	2 min.
- 70 % Ethanol	1 min.
- 80 % Ethanol	2 min.
- 90 % Ethanol	2 min.
- 96 % Ethanol	2 min.
- 100 % Ethanol	2 min.
- Xylolbad	kurz
- Eindeckeln mit Eukitt (s.o.)	

3.2.5.5 EDV- gestützte Auswertung der Tumorflächen

Die mit Kresylviolett gefärbten Lebertumorschnitte wurden mittels Durchlichtscanner (JX-610, Sharp, Japan) eingescannt und das Bild zur stärkeren Kontrastierung im Programm Adobe Photoshop 5.5 bearbeitet. Im Programm NIH 1.59 konnten nun max. Länge (a), die Breite (b) und Fläche des Tumors bestimmt werden. Hierfür wurden Tumorschnitte durch das Zentrum der Neoplasie verwendet.

Versuchsbedingt konnten auf diese Weise nur die terminalen Proben des Tag 30 ausgewertet werden.