

Experimental and Clinical Research Center,
Charité-Universitätsmedizin Berlin,
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

DISSERTATION

*Der Einsatz des Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE) für
eine neuartige und selektive Suizidgentherapie Claudin-3 und
-4 überexprimierender Tumoren*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von
Stoyan Petkov
aus Jambol, Bulgarien

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W. Walther
2. Prof. Dr. med. Dr. h. c. P. M. Schlag
3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Vorburger

Datum der Promotion: 07.09.2012

INHALTSVERZEICHNIS1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS5
1. EINLEITUNG8
1.1 Krebs8
1.2 Grundlagen der Gentherapie und Tumorgentherapie9
1.3 Bakterielle Toxine für die Therapie von Tumoren	12
1.4 Das Clostridium perfringens Enterotoxin	14
1.5 Claudine als spezifische Rezeptoren der CPE-Wirkung	15
1.6 Die Nutzung des CPE in der Tumorthherapie	17
2. ZIELSTELLUNG	19
3. MATERIALIEN UND METHODEN	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Chemikalien und Puffer	21
3.1.2 Materialien für die Zellkultur	22
3.1.3 Materialien für PCR und real time RT-PCR.....	22
3.1.4 Materialien für Restriktionsspaltungen und Ligation.....	23
3.1.5 Kits	23
3.1.6 Vektoren und Zelllinien.....	24
3.1.7 Antikörper	24
3.1.8 Geräte	24
3.1.9 Tiermodelle.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Zelllinien und Zellkultivierung	26
3.2.2 Vektorkonstruktion und Klonierung CPE exprimierender Konstrukte.....	26
3.2.2.1 Primer-Design und PCR.....	28
3.2.2.2 DNA-Gelelektrophorese	29
3.2.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel	29
3.2.2.4 Restriktionsverdau.....	30
3.2.2.5 Ligation.....	30
3.2.3 Transformation	31
3.2.4 Minipräparation von Plasmid-DNA (Miniprep).....	31
3.2.5 Vektorvalidierung.....	32

3.2.5.1 Kontrollverdau	32
3.2.5.2 Sequenzierung	32
3.2.6 Plasmidpräparation (Maxiprep)	32
3.2.7 Transfektion der Zellen und Transfektionseffizienzen	33
3.2.8 RNA-Isolierung	34
3.2.9 Real time qRT-PCR für Claudin- und CPE- Expressionsanalyse	35
3.2.9.1 Reverse Transkription (RT)	35
3.2.9.2 Real time qPCR.....	36
3.2.10 Proteinisolierung und- quantifizierung	37
3.2.11 Western-Blot.....	38
3.2.12 Immunfluoreszenz	40
3.2.13 Immunhistochemie	40
3.2.14 Hämatoxylin (HE) Färbung	41
3.2.15 Zytotoxizitätstests	41
3.2.15.1 Alamar Blue-Zytotoxizitätstest.....	41
3.2.15.2 MTT-Zytotoxizitätstest	42
3.2.16 CPE-spezifischer ELISA.....	42
3.2.17 Caspase-Assays (Caspase 1,3 und 7).....	43
3.2.18 Apoptose Assay	43
3.2.19 FACS	43
3.2.20 Biologischer Assay der CPE-Aktivität.....	44
3.2.21 Laktat-dehydrogenase (LDH)-Assay	44
3.2.22 <i>In vivo</i> Modell	45
3.2.22.1 Nicht viraler <i>in vivo</i> Gentransfer	45
3.2.22.2 <i>In vivo</i> CPE-Expression und Gentherapie	45
3.2.23 Statistische Verfahren	46
4. ERGEBNISSE.....	47
4.1 Charakterisierung des <i>in vitro</i> Modells	47
4.1.1 Analyse der Claudin-3 und Claudin-4-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene	47
4.1.2 Evaluation der <i>in vitro</i> Tumorzellsensitivität gegenüber rekombinatem CPE.	49
4.2 <i>In vitro</i> CPE-Gentransfer und Expression	50
4.2.1 Konstruktion der CPE-exprimierenden Plasmid-Vektoren	50

4.2.2 <i>In vitro</i> Gentransfer und Analyse der CPE-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene.....	51
4.2.3 Kinetik der <i>in vitro</i> CPE-Expression	53
4.2.4 Intrazelluläre Lokalisation des CPE in transfizierten Tumorzellen	53
4.3 CPE-vermittelte antitumorale Wirkungen in transfizierten Tumorzellen	54
4.3.1 CPE-vermittelte Zytotoxizität nach <i>in vitro</i> Gentransfer.....	54
4.3.2 Evaluation des CPE-Bystande-Effektes nach Gentransfer	56
4.4 Zellulärer Mechanismus der Toxizität nach <i>in vitro</i> CPE-Gentransfer.....	57
4.4.1 Analyse der Caspase 1,3 und 7 Aktivierung nach CPE-Gentransfer	57
4.4.2 FACScan Analyse mittels Annexin-V/Propidiumiodid (PI) nach CPE-Gentransfer.....	59
4.3.3 Analyse der Laktat-Dehydrogenase (LDH)- Freisetzung nach CPE-Gentransfer	60
4.5 <i>In vivo</i> CPE-Gentherapie.....	61
4.5.1 Intratumoraler <i>in vivo</i> Gentransfer	61
4.5.2 Analyse der <i>in vivo</i> CPE-Expression auf Protein-Ebene.....	61
4.5.3 Antitumorale Wirkung des <i>in vivo</i> CPE-Gentransfers.....	63
5. DISKUSSION	66
5.1 <i>In vitro</i> Tumormodell.....	66
5.2 <i>In vitro</i> CPE-Gentransfer und Expression	69
5.2.1 Optimierung des CPE-Gentherapiesystems	70
5.2.2 <i>In vitro</i> CPE-Expression	71
5.2.3 Intrazelluläre Lokalisation des CPE in transfizierten Tumorzellen	72
5.3 CPE-vermittelte <i>in vitro</i> Zytotoxizität nach Gentransfer.....	73
5.3.1 “Bystander-Effekt“ des CPE-Gentransfers	74
5.3.2 Zellulärer Mechanismus der zytotoxischen CPE-Wirkung nach <i>in vitro</i> Gentransfer	75
5.4 CPE-Gentherapie.....	77
6. ZUSAMMENFASSUNG	78
7. LITERATURVERZEICHNIS	80
LEBENS LAUF	89
WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT	90

ERKLÄRUNG 91
DANKSAGUNG 92

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	<i>addiere</i> (hier auffüllen auf)
ADP	Adenosindiphosphat
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
bp	Basenpaar
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- Tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CMV	Cytomegalovirus
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
Da	Dalton
dd	<i>double distilled</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DT	Diphtherietoxin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	<i>et cetera</i>
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	fötale Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
fw	<i>forward</i> (Primer)
G	Guanosin
GAPD	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDEPT	Gene-Directed Enzym/Prodrug Therapie
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSV- <i>tk</i>	Herpes Simplex Virus Thymidinkina
IgG	Immunoglobulin G
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kb	Kilobase=1000Basenpaare
LB	Luria-Bertani
LD	S Lithiumdodecylsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannte
PA	Pseudomonas Exotoxin A
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PI	Propidiumiodid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RB-1	Retinoblastom-Suppressorgen
rev	<i>reverse</i> (Primer)
RLU	Relative Light Unit
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLO	Streptolysin O
SOC	Super Optimal Broth (SOB) plus Glukose
SS	Signalsequenz
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Krebs

Krebs stellt eine Erkrankung mit hoher Inzidenz dar, von der jeder zweite bis dritte Mann und jede dritte Frau im Laufe ihres Lebens betroffen sind. Laut WHO starben allein im Jahr 2008 ca. 7,6 Millionen Menschen weltweit an Tumorerkrankungen¹. Somit ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Krankheiten in den westlichen Industrieländern². Die Krebsentstehung ist ein mehrstufiger Prozess und beruht auf genetischen und epigenetischen Veränderungen in den betroffenen Zellen, die vor allem mit Fortschreiten des Lebensalters gehäuft auftreten können³. Das bewirkt eine gestörte zelluläre Regulation, die abnorme Proliferation, Invasion und Migration der betroffenen Zellen verursacht.

Die zunehmende Inzidenz der Krebserkrankungen, sowie die eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten bestimmen die große Bedeutung einer effizienten Therapie und den Bedarf an neuen Therapieoptionen.

Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie gelten als etablierte Formen der onkologischen Therapie⁴. Bei der Chirurgie wird das betroffene Tumorgewebe reseziert und entfernt. Dadurch wird ein weiteres Wachsen des Tumors unterbunden. Das führt jedoch nicht immer zu Heilung der Erkrankung. Bei der chirurgischen Intervention können bereits existierende, distante Metastasen oftmals nicht behandelt werden. Deshalb besteht das Risiko, dass trotz Operation maligne Zellen im Körper verbleiben, die zu Rezidiven oder Metastasierung des Tumors führen können.

Die Strahlentherapie ist ein Verfahren, bei dem durch ionisierende Strahlung gezielt entartete Zellen geschädigt oder zerstört werden. Nachteile hierbei sind die eingeschränkte Anwendbarkeit bei nur bestimmten Tumorarten, sowie die Mitschädigung von gesundem Gewebe und die Resistenzbildung der Tumorzellen gegen die Strahlentherapie. Eine weitere, klinisch etablierte Therapieform zur Tumorbehandlung ist die Chemotherapie. Hierbei werden dem Patienten Arzneistoffe (Zytostatika) appliziert, die über verschiedene Mechanismen (RNA- und DNA-Synthese, Proteinsynthese, Zellteilung, etc.) in schnell proliferierenden Zellen ihre Toxizität entfalten. Die Probleme bei der Anwendung der Chemotherapie leiten sich

aus der Tatsache ab, dass auch gesundes Gewebe geschädigt werden kann und auch Resistenzmechanismen in den Tumoren aktiviert werden, die die Chemotherapie ineffektiv machen. Zur Optimierung der Behandlungsstrategien für die Tumorthherapie wurden in den letzten Jahren neben den klassischen Therapien auch verschiedene neue Therapieverfahren, wie z.B. die Gentherapie entwickelt.

1.2 Grundlagen der Gentherapie und Tumorgentherapie

Die Gentherapie nutzt den Transfer von sogenannten Fremdgenen in die Zielzellen⁵. Hierbei stellen Nukleinsäuren, wie die DNA oder RNA das aktive pharmakologische Agens dar. Für die Gentherapie sind Tumorerkrankungen von besonders großem Interesse, da sie eine hohe Inzidenz besitzen. Die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung, sowie die Identifikation von Genen, die ursächlich in das Geschehen des malignen Wachstums involviert sind, ermöglichen es auf molekularer Ebene Angriffspunkte für eine Tumorbehandlung zu definieren und zu nutzen. In diesem Zusammenhang stellt die Tumorgentherapie eine Therapieform dar, die unter Nutzung gentechnischer Methoden in derartige molekulare Mechanismen eingreift. Dabei sind die therapeutischen Strategien entweder auf das Einbringen von Genkonstrukten gerichtet, die für therapeutisch wirksame Proteine oder Enzyme kodieren oder die direkt und gezielt in die Regulation (Transkription, Translation, Signaling) jener Prozesse eingreifen, die für die Tumorentstehung, Progression und Invasion verantwortlich sind. Obwohl die Intention der Gentherapie im ursprünglichsten Sinne des Wortes die Therapie „kranker“ Gene vor allem bei genetisch bedingten Erbkrankheiten (z.B. Immundefizienzen, Mukoviszidose, Hämophilie) zum Ziel hat, ist das große Potenzial dieser Therapieform für die Behandlung von Tumorerkrankungen schnell erkannt worden⁶. Von ca. 1700 bisher publizierten gentherapeutischen klinischen Studien (Stand 2011) wurden 64,5% im Bereich der Onkologie durchgeführt (s. Abb.1).

Die Gentherapie beruht auf dem Transfer von Genen in somatische Zellen, deren Expression durch zahlreiche Mechanismen auf molekularer Ebene wie z.B. Korrektur von genetischen Defekten oder Beseitigung von Mutationen therapeutisch wirken sollte.

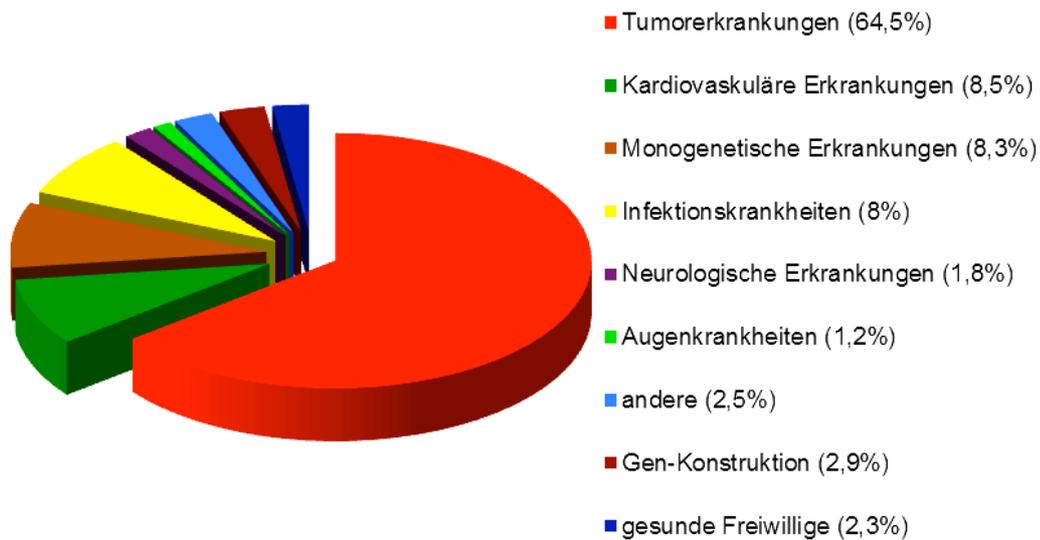


Abb.1: Prozentuale Verteilung der klinischen Gentherapiestudien sortiert nach der behandelten Krankheit (nach *Journal of Gene Medicine, Stand 2011*)⁷.

Für den Gentransfer werden in der Gentherapie virale und nicht-virale Systeme genutzt (s. Tab.1)⁸. Virale Vektoren wurden aus RNA- (retrovirale Vektoren) oder DNA-Viren (adenovirale oder HSV-Vektoren) entwickelt. Sie zeichnen sich durch hohe Aufnahmekapazitäten für Transgensequenzen sowie gute Transfereffizienzen aus. Ihr Einsatz ist jedoch noch immer mit Risiken verbunden, wie klinische Gentherapiestudien wiederholt gezeigt haben⁸. Nicht-virale Vektoren nutzen entweder nackte DNA-Vektoren, vorrangig als Plasmide oder verwenden als Transportvehikel liposomale Systeme, wie z.B. Lipoplexe oder Liposomen. Ihre Transfereffizienzen sind geringer, als die viraler Vektoren. Die klinische Anwendung nicht-viraler Systeme ist mit geringeren bis keine Risiken für den Patienten verbunden⁹. Es werden verschiedene Tumorgentherapie-Strategien verfolgt, deren Ziel zum großen Teil die Vernichtung des Tumors durch direkte Zerstörung der Tumorzellen oder die Einflussnahme auf das Tumorstadium sind (s. Tab.2)^{10,11}. Aus diesem Grunde werden auch verschiedene therapeutisch relevante Gene untersucht, die in unterschiedlichen Phasen der präklinischen und klinischen Erprobung sind. Dazu gehören z.B. Gene, die für immunstimulatorische Moleküle oder Tumorantigene kodieren, sowie Gene, die für Prodrug-aktivierende bakterielle bzw. virale Enzyme (Suizidgene), oder für bakterielle Toxingene kodieren (s. Abb.2).

Tab.1: Übersicht über in der Gentherapie angewendeten Vektoren und Gentransfertechniken

Nicht-virale Vektoren	Virale Vektoren	Transfermethoden
<u>nackte DNA</u> Plasmide, Minicircle antisense Oligonukleotide, siRNA/ shRNA, Ribozyme, Aptamere	<u>RNA-Virus basiert</u> Retroviren, Lentiviren <u>DNA-Virus basiert</u> Adenoviren, Adenoassoziierte-Viren (AAV), Vaccinia-Viren <u>Onkolytische Viren</u> ONYX-015, Reovirus, Herpes Simplex Virus I (HSV I)	<u>Physikalische</u> Nadelinjektion, Elektroporation Ultraschall, Ballistischer Transfer (Gene Gun), Jet-Injektion <u>Chemische</u> Kalzium-Phosphat-Präzipitation, Kationische Lipide (Lipoplexe, Liposomen) Kationische Polymere (PEI), Protein- und Peptid-Carrier

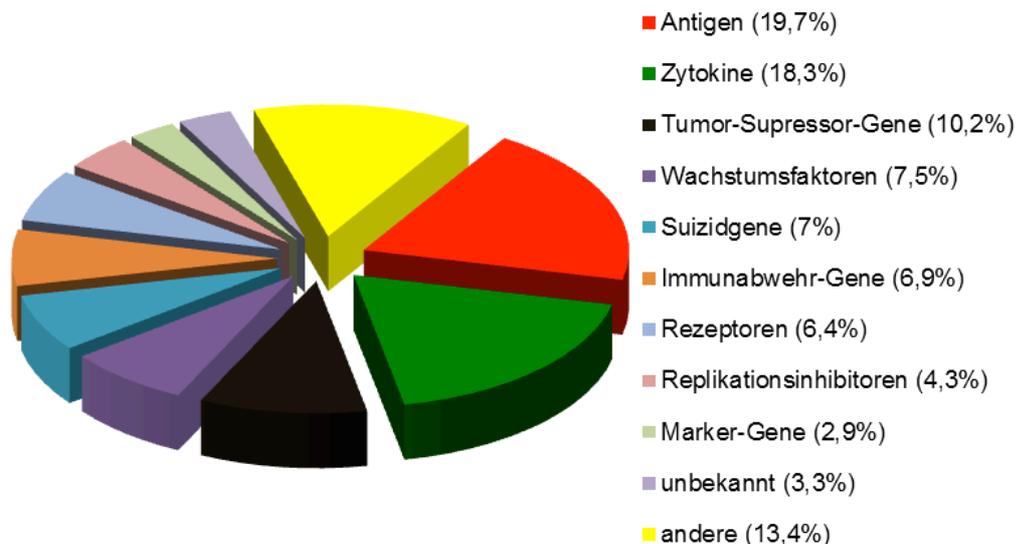


Abb.2: Verteilung der durchgeführten klinischen Gentherapiestudien auf dem Gebiet der Onkologie bezüglich des untersuchten Gens (nach *Journal of Gene Medicine*, Stand 2011)⁷.

Eine wichtige Voraussetzung zu Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen der Gentherapie, ähnlich wie bei den klassischen onkologischen Verfahren, ist die Selektivität der Tumorzelltoxizität bzw. der Wachstumshemmung. Im Rahmen der Tumorgentherapie werden am häufigsten Suizidgene eingesetzt, die in den überwiegenden Fällen für virale oder bakterielle Enzyme kodieren. Diese, wie z.B.

die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-tk), die bakterielle Cytosindeaminase (CD), das Cytochrom P-450 2B1 etc. werden in der Regel von den humanen Zellen nicht exprimiert^{12,13}. Die Funktion der Enzyme besteht in der Aktivierung von nicht-toxischen Prodrugs, die dann in toxische Metaboliten umgewandelt werden und dadurch zytotoxisch wirken. Derartige Suizidgene werden bereits seit längerer Zeit klinisch angewendet, wo sie auch antitumorale Wirkungen zeigen konnten.

Tab.2: Strategien in der Tumorgentherapie.

Gensubstitution	Gensuppression	Additive Geninsertion
-Ersatz mutierter Tumorsuppressor-gene: z.B. p53, RB-1	- Antisense Technologie z.B. Oligonukleotide BCL-2, B-Raf -RNAi-Technologie z.B. siRNA, shRNA -Ribozyme z.B. gegen <i>mdr1</i> , <i>mrp-1</i>	-Immunogentherapie: z.B. Zytokine (IL-2, IL-12, IFNs, GM-CSF, G-CSF, TNF- α), MHC-I-Gene, Gene kostimulatorischer Moleküle z.B. B7-1, B7-2 Gene immunogener Antigene, z.B. CEA, PSA, gp100 -Suizidgentherapie: Toxingene Suizidgene für Gene-Directed -Enzyme/ Prodrug Therapy (HSV-tk, CD) -Proapoptische Gentherapie -Antiangiogene Gentherapie (z.B. VEGF)

1.3 Bakterielle Toxine für die Therapie von Tumoren

Eine attraktive Alternative zu den Enzym-basierten Suizidgenen stellen Gene dar, die für bakterielle Toxine kodieren¹⁴. Die Verwendung bakterieller Toxine, wie z.B. Diphtherietoxin A (DT), *Pseudomonas* Exotoxin (PE) oder Streptolysin O (SLO) für die Tumorgentherapie hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Sie vermitteln hohe therapeutische Effizienz und können vor allem auch bei sonst Therapie-resistenten Tumoren eingesetzt werden.

In einer Vielzahl experimenteller und klinischer Studien wurden vor allem das Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, Pseudomonas-Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa* und das Streptolysin O Toxin aus *Streptococcus pyogenes* verwendet^{15,16}. Die ersten zwei Toxine entfalten eine sehr effektive Toxizität über die Inhibition der Proteinbiosynthese durch die Blockierung des Elongationsfaktors-2 mittels enzymatischer ADP-Ribosylierung. Das ist bereits für die Tumorthherapie in verschiedenen Modellen (Prostata-, Pankreas-, Ovarial-, Bronchialkarzinom, Melanom, Glioblastom etc.) genutzt worden. Für ein effizientes Tumortargeting wurden diese Toxine an Liganden in Form von Fusionsproteinen gebunden, deren Rezeptoren vor allem auf Tumorzellen überexprimiert sind¹⁴. Darüber hinaus sind retrovirale Vektoren zur Expression des DT bereits erfolgreich eingesetzt worden¹⁷. Hierbei wurden für die tumorselektive Expression tumorspezifische Promotoren verwendet¹⁸. Eine weitere Option der Nutzung besteht darin, Toxine einzusetzen, deren eigene Zielstruktur Rezeptoren sind, die auf Tumorzellen exponiert werden und dort signifikant überexprimiert sind. Diese Ausgangssituation schafft so von vornherein eine Tumorspezifität und macht die Internalisierung des Toxins für eine Entfaltung der toxischen Wirkung überflüssig.

Zu dieser Toxin-Gruppe gehört das Streptolysin O. Das SLO bindet spezifisch an Cholesterol-Moleküle auf der Außenseite der Zellmembran. Dadurch entstehen bis zu 30 nm große Membranporen, die eine Durchlässigkeit der Zellmembran bewirken. *In vitro* Experimente zeigten, dass die SLO-Expression nach Gentransfer mit Adenoviren zum Absterben der Tumorzellen und zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt. Diese lokale antitumorale Wirkung des Toxins konnte nach Injektion der SLO-exprimierenden Adenoviren direkt in den Tumor bestätigt werden. Nachteil dieses viel versprechenden Ansatzes ist allerdings die mangelnde Spezifität und dementsprechend die Notwendigkeit zur Entwicklung eines sicheren Zielmechanismus.

Ein weiteres Beispiel für ein alternatives Suizidgen stellt das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) dar. Vorteil dieses Gentherapiesystems im Vergleich zum SLO-System ist die Eigenschaft des CPE selektiv an die CPE-Rezeptoren Claudin-3 und -4 zu binden, die in einigen epithelialen Tumoren überexprimiert sind. Dadurch kann eine höhere Therapiespezifität erreicht werden.

Tab.3: Wirkung und therapeutischer Ansatz bakterieller Toxine.

Toxin	Wirkung	Therapeutische Anwendung
Diphtherietoxin A	Inhibition der Proteinbiosynthese durch die Blockierung des Elongationsfaktors-2 mittels enzymatischer ADP-Ribosylierung	Prostatakarzinom
<i>Pseudomonas</i> -Exotoxin	Inhibition der Proteinbiosynthese durch die Blockierung des Elongationsfaktors-2 mittels enzymatischer ADP-Ribosylierung	B-Zell-Neoplasien
Streptolysin O	Erhöhung der Membrandurchlässigkeit durch Entstehung von Poren in der Zellwand über Cholesterol-Bindung	Mammakarzinom, Prostatakarzinom
<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin	Zellschädigung nach Entstehung von Membran-Poren-Komplexen in Folge spezifischer Bindung des CPE an Claudin-4 und -3.	Ovarialkarzinom, Mammakarzinom

1.4 Das *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) ist ein grampositives, anaerobes, unbegeißeltes Endosporen-bildendes Stäbchen. Es ist ubiquitär verbreitet und kommt v.a. im Boden, Wasser, Staub, Lebensmitteln sowie im Darm von Säugetieren vor. Von fünf *C. perfringens* Stämmen sind nur Typ A und Typ C humanpathogen. *C. perfringens* vom Typ A produziert das *C. perfringens* Enterotoxin, welches bei der Ausbildung von Sporen, vornehmlich distal im Dünndarm sezerniert wird. *C. perfringens* ist durch das CPE einer der Auslöser für Lebensmittelvergiftungen und besitzt neben diesem Enterotoxin noch weitere 13 Toxine, die unter anderem für die Symptome bei Wundinfektionen wie Gasbrand verantwortlich sind¹⁹. Das CPE wird in der Mutterzelle bei der Sporulation gebildet und bei der Lyse der Zelle in die Umgebung abgegeben²⁰. Bei der Aufnahme nicht genügend erhitzter Speisen können die Sporen in den Darm gelangen und dort auskeimen. Bei der Sporulation setzen sie dann das Toxin frei und dieses führt aufgrund seiner Wirkung zu Diarrhö und krampfartigen Schmerzen. Das CPE besteht aus einer Polypeptidkette aus 319 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 35 kDa. Im Dünndarm interagiert das toxische Protein mit seinen Rezeptoren, die an der Außenseite der Membran epithelialer Zellen sitzen. Es

ist nachgewiesen, dass das Anheften mehrerer Toxinmoleküle zur Ausbildung von Porenkomplexen (155-200 kDa) und damit zu einer erhöhten Permeabilität der Membran führt²¹⁻²⁵. Durch diese Schädigung kommt es zu Zellyse und somit zu einem Kollaps der Zelle²⁶. Bereits kleine Mengen des Toxins können ausreichen, um eine Zellschädigung einzuleiten. Durch die Membranporen können auch Ca^{2+} -Ionen einströmen, was dann einerseits durch den Zusammenbruch des kolloid-osmotischen Gleichgewichtes und andererseits durch Aktivierung verschiedener Signalkaskadenwege den Tod der Zelle auslöst²⁵.

1.5 Claudine als spezifische Rezeptoren der CPE-Wirkung Als Rezeptoren für CPE wurden Claudin-3 (alternativ als Rvp.1, rat ventral prostate, genannt) und Claudin-4 (alternativ CPE-R, *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Rezeptor, genannt) identifiziert²⁷. Die Vertreter der Claudin-Familie sind kleine Transmembran-Proteine. Sie verfügen über vier Transmembran-Domänen sowie zwei extrazelluläre Schleifen²⁸. Claudine sind der wichtigste Bestandteil der in Epithelien vorkommenden Zellverbindungen, der sog. „Tight-Junctions“ (s. Abb.3).

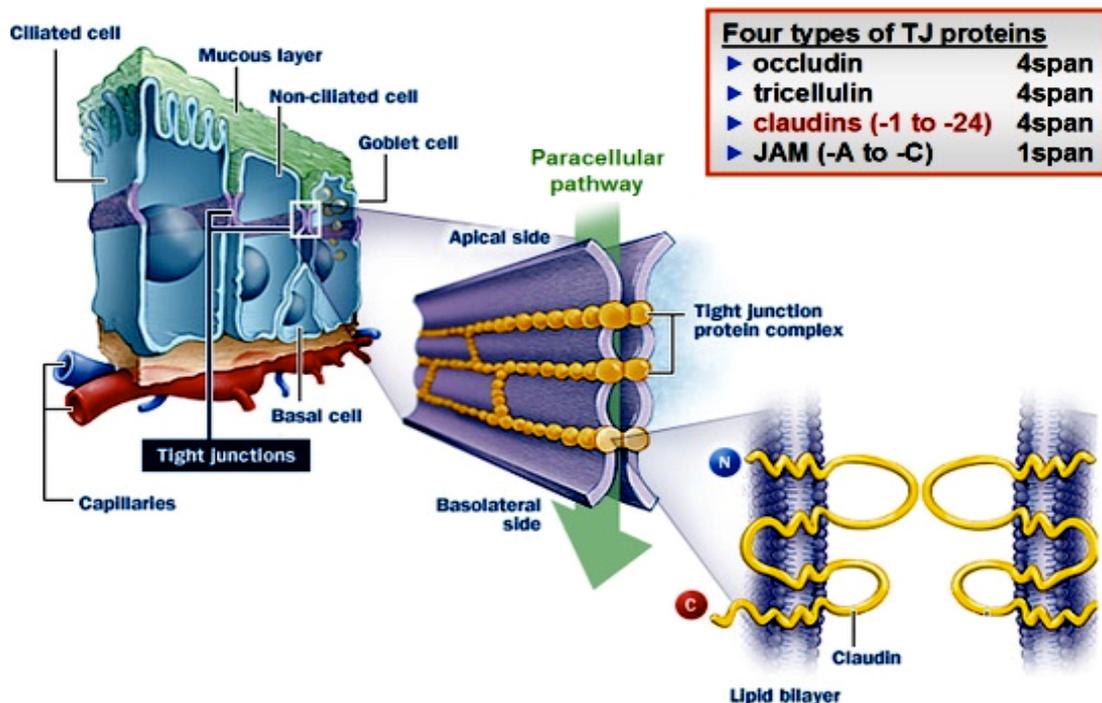


Abb.3: Claudine als Bausteine der „Tight-Junctions“ (nach Fromm et al. 2009)²⁹. Die „Tight-Junctions“ gewährleisten die „Undurchlässigkeit“ der Epithelien. Die Claudine fungieren als wichtigster Bestandteil der „Tight-Junctions“.

Die "Tight-Junctions" befinden sich im apikalen Bereich von Epithelzellen und stellen den engen Kontakt zwischen den Membranen benachbarter Zellen her. Diese

Kontakte bilden eine Diffusionsbarriere, die den parazellulären Transport von Molekülen über das Epithel kontrolliert. Die Expression der Claudine wurde in verschiedenen Geweben untersucht^{30,31}. Es ist gezeigt worden, dass jeder der 24 bekannten Subtypen spezifische Expressionsmuster besitzt. Es gibt Claudine, die ubiquitär zu finden sind, wie z.B. Claudin-1, und andere, die sehr spezifisch exprimiert werden, entweder räumlich, wie Claudin-16, oder zeitlich, wie Claudin-6, das z.B. bei Mäusen nur während der Embryogenese exprimiert wird. Darüber hinaus konnten für Claudine auch tumorspezifische Expressionsmuster identifiziert werden wie z.B. für die Claudine-3 und -4³⁰. Von allen bis jetzt bekannten Claudinen fungieren jedoch nur Claudin-3 und -4 als Rezeptoren für das CPE, wobei Claudin-4 eine signifikant höhere Bindungsaffinität zum Toxin aufweist. Die beiden Proteine zeigen eine deutliche Sequenzhomologie. CPE bindet mit seinem C-Terminus an die zweite extrazelluläre Schleife der Claudine-3 und -4, was den ersten Schritt der CPE-vermittelten Zytotoxizität darstellt (s. Abb.4)³².

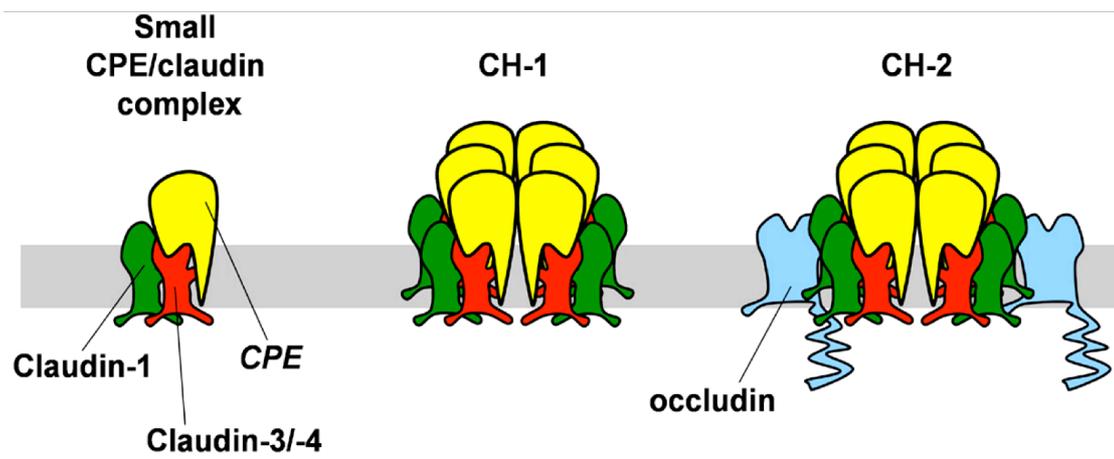


Abb.4: CPE-Wirkmechanismus (nach Mitchel & Koval 2010)³³. Das CPE bindet mit seinem C-Terminus an Claudin-3 bzw. -4. Das führt zur Entstehung von Membran-Poren-Komplexen und zum Zusammenbruch des kolloid-osmotischen Gleichgewichts von beiden Seiten der Zellmembran.

In mehreren Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass Claudin-3 und -4 in bestimmten epithelialen Tumoren (Karzinomen) deutlich überexprimiert sind³⁴⁻³⁹. Vor allem für Claudin-4 ist eine Überexpression im Pankreas-, Kolon-, Magen- und Ovarialkarzinom nachgewiesen worden¹⁴. Für die Behandlung Chemotherapie-resistenter, aber Claudin-3 oder bzw. und -4 exprimierender Tumore stellt das CPE daher einen attraktiven Kandidaten für die Tumorgentherapie dar. In einer Vielzahl von Studien ist belegt worden, dass durch Gabe von rekombinatem CPE sowohl *in*

vitro, als auch ein zytotoxischer Effekt auf Claudin-4-positive Pankreas-, Brust- und Ovarialkarzinomzellen erzielt wird, der mit einer Tumorreduktion oder Elimination einher geht⁴⁰⁻⁴⁴.

1.6 Die Nutzung des CPE in der Tumorthherapie

Einige epitheliale Tumorarten, mit sehr hoher Prävalenz in den westlichen Industrieländern wie das Mamma- und das Kolonkarzinom, exprimieren Claudin-3 und -4 über. Da die Bindung des CPE an seine Rezeptoren hoch spezifisch ist, wird dem *Clostridium perfringens* Enterotoxin ein großes Potential bei der Therapie Claudin-3 und -4 positiver Tumoren zugeschrieben. Sämtliche *in vitro* sowie Studien untersuchten neben der zytotoxischen Aktivität des rekombinanten CPE-Proteins auch die Wirksamkeit des CPE als Fusionsprotein für spezifisches Tumortargeting. Eine Fusionierung mit dem TNF- α zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Therapie des Ovarialkarzinoms⁴⁵. Bei der Anwendung des rekombinanten CPE konnten folgende Vorteile gezeigt werden:

- Es sind bisher keine endogenen Inhibitoren für CPE bekannt, die mit seiner Wirkung interferieren könnten.
- CPE besitzt einen spezifischen Wirkmechanismus und ein geringes Potential für eine Resistenz-Entstehung (wie z.B. Apoptose-Resistenz oder Multidrug-Resistenz).
- Das Toxin entfaltet einen Rezeptor-spezifischen, Dosis-abhängigen, schnellen und starken therapeutischen Effekt.

Das ermöglicht die Anwendung des Enterotoxins bei Therapie-resistenten Tumoren. Für den Ansatz des CPE müssten jedoch einige Nachteile berücksichtigt werden. Das Toxin kann auch für normales, Claudin-3 und -4 exprimierendes Gewebe toxisch sein. Derartige Nebenwirkungen wurden z.B. nach der i.p.-Injektion von rekombinantem CPE in therapeutischen tierexperimentellen Untersuchungen beobachtet⁴⁰. Außerdem ist das CPE bei einer exogenen Applikation nicht in der Lage, effektiv in einen massiven Tumor einzudringen. Das Toxin kann daher nur eine räumlich begrenzte Wirkung entfalten. Darüber hinaus ist für die nachhaltige toxische Aktivität am Tumor durch einen vermehrten Abbau und Verbrauch die wiederholte Gabe von rekombinantem CPE notwendig, was ein wesentliches Problem bei der

Verwendung des rekombinanten Proteins darstellt.

Die Vorteile der selektiven Wirkung des CPE-Toxins könnten in der Tumorbekämpfung besser genutzt werden, indem CPE-exprimierende Vektoren im Rahmen einer Tumorgentherapie verwendet werden. Mittels Gentransfer kann das CPE gezielt in den Tumor eingebracht und somit "vor Ort" zur Expression gebracht werden. Durch solche lokale Verlängerung der Toxin-Verfügbarkeit und Erhöhung der Konzentration kann einerseits eine bessere antitumorale Wirkung erreicht und andererseits die Toxizität für normales Claudin-3 und -4 exprimierendes Gewebe deutlich reduziert werden.

Aus diesen Gründen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Prüfung einer *Clostridium perfringens* Enterotoxins basierten Gentherapie bei soliden Claudin-3 und -4 überexprimierenden epithelialen Tumoren.

2. Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war, die Realisierbarkeit und das Potential der Gentherapie mittels *Clostridium Perfringens* Enterotoxin (CPE) als einen vollkommen neuen Ansatz für antitumorale Suizidgentherapie zu evaluieren. Hierzu sollte im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes *in vitro* Modell humaner Tumorzelllinien etabliert werden, mit dem die zellulären antitumoralen Effekte des CPE untersucht und die zellulären Mechanismen der CPE-Zytotoxizität analysiert werden. Das therapeutische Potential der CPE-Gentherapie sollte im Xenotransplantat-Tiermodell geprüft werden. Bisher ist bekannt, dass das CPE eine hochspezifische und starke toxische Wirkung auf Claudin-3 und Claudin-4 überexprimierender Tumoren entfaltet, wozu solide epitheliale Tumorentitäten wie Kolon-, Mamma-, Pankreas-, Ovarialkarzinom etc. gehören³⁰. Aus diesem Grund stellt das CPE einen attraktiven Kandidaten für die selektive lokale Therapie dieser Tumoren dar. Es kann aufgrund seiner hohen Spezifität und starken zytotoxischen Wirksamkeit als ein neuartiges therapeutisches Gen für eine Suizidgentherapie zur Elimination von residualer Disease, Tumorrezidiven, Metastasen etc. angewendet werden. Im Gegensatz zur externen Applikation des rekombinanten CPE-Proteins ermöglicht das Gentherapiekonzept die CPE-Expression direkt in den Tumorzellen und sollte somit zur Verbesserung der antitumoralen Wirksamkeit des Toxins und zur effizienteren Eliminierung von Claudin-3 und 4-positiven Tumoren beitragen.

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit sollte die Klonierung verschiedener CPE-cDNA Varianten in einen geeigneten effizienten Expressionsvektor, der Gentransfer in ausgewählte humane Tumorzelllinien, die Evaluation der biologischen Aktivität des exprimierten CPE auf den Zelllinien, die *in vitro* Untersuchung des zellulären CPE-Wirkmechanismus und tierexperimentelle Untersuchungen zum therapeutischen Potential der nicht-viralen CPE-Gentherapie im Xenotransplantat-Tumormodell sein.

Zum Erreichen der gestellten Ziele sollten folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

1. Charakterisierung humaner Tumorzelllinien zur Auswahl von geeigneten *in vitro* Modellen: Bestimmung des Claudin-3 und Claudin-4 Expressionsniveaus in humanen Tumorzelllinien auf mRNA- und Proteinebene, Untersuchung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber rekombinantem CPE und Bestimmung sowie Optimierung der Transfektionseffizienz der Zelllinien.

2. Klonierung vier verschiedener CPE-cDNA Varianten in den eukaryotischen Expressionsvektor pCpG-mcs G2.
3. Nachweis der CPE-Expression auf mRNA- und Proteinebene sowie der intrazellulären Lokalisation in den ausgewählten Tumorzelllinien nach Transfektion der generierten CPE-tragenden Konstrukten.
4. Analyse der zytotoxischen Wirkung der CPE-Expression nach Transfektion in den ausgewählten Tumorzelllinien.
5. Untersuchung des zellulären zytotoxischen Mechanismus des CPE-vermittelten antitumoralen Effektes.
6. Untersuchung der CPE-Expression und seiner antitumoralen Wirksamkeit im Xenotransplantat-Tumormodell nach nicht-viralem Gentransfer.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Puffer

Agarose	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Ampicillin	Boehringer,Mannheim,DE
Bacto-Agar	DIFCO,Heidelberg,DE
BSA	Serva,Heidelberg,DE
BSA-Standard	Pierce,Rockford,USA
Chloroform	Carl Roth,Karlsruhe,DE
CL-Xposure-Film	Pierce,Rockford,USA
Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
Coomassie Plus Protein Assay	Pierce,Rockford,USA
DMSO	Carl Roth,Karlsruhe,DE
DNase	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
DTT	Sigma-Aldrich,Taufkirchen,DE
EDTA	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Essigsäure	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Ethanol	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Glycerol	Serva,Heidelberg,DE
Glycin	CarlRoth,Karlsruhe,DE
Glukose	MerckAG,Darmstadt,DE
Hefeextrakt	DIFCO,Heidelberg,DE
Isopropanol	Carl Roth,Karlsruhe,DE
LDS Sample-Puffer	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Kaliumchlorid	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich,Taufkirchen,DE
Metafectene	Biontex,Martinsried,DE
Methanol	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich,Taufkirchen,DE
MES-Laufpuffer	Invitrogen,Karlsruhe,DE
MTT	Sigma-Aldrich,Taufkirchen,DE
Natriumchlorid	CarlRoth,Karlsruhe,DE
Nitrocellulose Hybond TM -C extra	Amersheim Biosciences,Bucks,UK

Novex Bis-Tris Gel 10%	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Novex Bis-Tris Gel 4-12%	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Orange G	Chemapol,Prag,CZE
PBS	PAA Laboratories,Cölbe,DE
Salzsäure	Carl Roth,Karlsruhe,DE
SDS ultra pure	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Spectra TM Multicolor Board Range	Fermentas,Leon Rot,DE
Tris	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Trizol Reagenz	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Trockenmilchpulver	Premier International Food,Links,UK
Trypan-Blau	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories,Cölbe,DE
Trypton	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Tween 20	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Wasserstoffperoxid	Carl Roth,Karlsruhe,DE
Zeocin	Invivogen,San Diego,USA
Verpackungsfolie Saran	Dow Chemical Company,Horgen,CH
Wasser ultra pure	Invitrogen,Karlsruhe,DE

3.1.2 Materialien für die Zellkultur

DMEM	PAA Laboratories,Cölbe,DE
Fetales Klabserum (FKS)	PAA Laboratories,Cölbe,DE
RPMI	PAA Laboratories,Cölbe,DE
Zellkulturflaschen (T75, T25)	PAA Laboratories,Cölbe,DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Wells)	BD Biosciences,Heidelberg,DE

3.1.3 Materialien für PCR und real time RT-PCR

DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
dNTPs	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE
Molekulargewichts-Marker für DNA	Fermentas,Sankt Leon Rot,DE
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE
PCR Puffer II	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE

Primer	Invitek,Berlin,DE
Pwo Master	Roche Diagnostics,Mannheim, DE
Random Hexamers	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE
RNase Inhibitor	Applied Biosystems,Weiterstadt,DE
Taq-Polymerase	Invitek,Berlin,DE
Wasser, PCR grade	Roche Diagnostics,Mannheim,DE

3.1.4 Materialien für Restriktionsspaltungen und Ligation

Apa I	Fermentas,Sankt Leon-Rot,DE
BamH I	New England Biolabs,Ipswich,USA
BamH I-Puffer	New England Biolabs,Ipswich,USA
Bgl II	Fermentas,Sankt Leon-Rot,DE
Hind III	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
Kpn I-Puffer	Fermentas,SanktLeon-Rot,DE
One-Phor-All-Puffer	AmershamPharmacia,Buckinghamshire, UK
R-Puffer	Fermentas,Sankt Leon-Rot,DE
Stu I	AmershamPharmacia,Little Chalfont,UK
Stu I-Puffer	AmershamPharmacia,Little Chalfont,UK
Tango-Puffer	Fermentas,Sankt Leon-Rot,DE
T 4 Ligase	Fermentas,Sankt Leon-Rot,DE
T 4 Ligase-Puffer	Fermentas, Sankt Leon-Rot,DE

3.1.5 Kits

Apo-One Kit (Caspase 3, 7)	Promega,Madison,USA
Apoptose Assay Kit	Calbiochem,San Diego,USA
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
Caspase-1 color Assay Kit	Biovision,Mountain View,USA
CL-XPosure Film	Thermo Fischer Scientific,Bonn,DE
GFP Fusion Topo TA Expression Kit	Invitrogen,San Diego,USA
Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Kit	Genomed,Löhne,DE
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek,Berlin,DE
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitek,Berlin,DE

LightCycler DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
LightCycler DNA Master SYBR GreenI	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
LightCycler FastStart DNA	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
LightCycler h-G6PDH	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
Housekeeping Gene Set	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen,Hilden,DE
RNA 6000 Nano Assay Kit	Agilent Technologies,Santa Clara,USA

3.1.6 Vektoren und Zelllinien

E.coli-G115	Invivogen,San Diego,USA
HCT116	ATCC,Wesel,DE
MCF-7	ATCC,Wesel,DE
Panc-1	ATCC,Wesel,DE
pcDNA3.1/CT-GFP-Topo	Invitrogen,Karlsruhe,DE
pCpG-mcs-G2	Invivogen,San Diego,USA
SKMel-5	ATCC,Wesel,DE

3.1.7 Antikörper

α -Claudin-3,Kaninchen,IgG	Abcam,Cambridge,UK
α -Claudin-4,Kaninchen,IgG	Abcam,Cambridge,UK
α -CPE,Kaninchen,IgG	Biogenesis,Poole,UK
α -GAPDH,Ziege,IgG	Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz, USA
β -Tubulin,Maus,IgG	Becton Dickinson,San Jose,USA
α -Kaninchen,Ziege,IgG-HRP	Promega,Madison,USA
α -Ziege,Kaninchen,IgG	Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz, USA
α -Maus,Ziege,IgM-HRP	Sigma-Aldrich,Taufkirchen,DE

3.1.8 Geräte

The Belly Dancer	Stovall Life Science,Greensboro,USA
Brutschrank	Rudolf Hasse KG,Berlin,DE
Countess automated cell counter	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Elektriphorese-Kammer: Horizon 58	GIBCO BRL,Karlsruhe,DE

Elektrophorese Power supply ST606T	GIBCO BRL,Karlsruhe,DE
FACScalibur	Becton Dickinson,San Jose,USA
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver.Z1	Zeiss,Jena,DE
Kryomikrotom	Leica,Wetzlar,DE
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf,Hamburg,DE
Light cyclers 480	Roche Diagnostics,Mannheim,DE
NanoDrop TM2000	Thermo Fisher Scientific,Wilmington,USA
SDS-Page-Kammer	Invitrogen,Karlsruhe,DE
Semi-Dry-Transfer cell	BioRad Laboratories Inc.,München,DE
Spectrafluor plus	Tecan,Berlin,DE
T3000 Thermocycler	Biometra,Göttingen,DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf,Hamburg,DE
Tischzentrifuge	Eppendorf,Hamburg,DE

3.1.9 Tiermodelle

NMR:nu/na Mäuse/weiblich	Epo GmbH,Berlin,DE
--------------------------	--------------------

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultivierung

In der Arbeit wurden die vier humanen Tumorzelllinien (HCT116, MCF-7, Panc-1 und SKMel-5) zur Untersuchung der zytotoxischen Wirksamkeit des CPE und für den Gentransfer CPE-exprimierender Vektoren verwendet (Tab. 4). Ihre genetische Identität wurde von der Firma DSMZ (Braunschweig) geprüft. Bei der Kultivierung der Tumorzellen wurden die zwei verschiedene Medien, RPMI und DMEM mit 10% FKS verwendet. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

Tab.4: Bezeichnung, Herkunft und Kulturbedingungen der in der Arbeit verwendeten humanen Tumorzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kultivierungsmedium
MCF-7	Mammakarzinom	RPMI +10% FKS
HCT116	Kolonkarzinom	RPMI +10% FKS
Panc1	Pankreaskarzinom	DMEM +10% FKS
SK Mel-5	Melanom	RPMI +10% FKS

3.2.2 Vektorkonstruktion und Klonierung CPE exprimierender Konstrukte

Das Ziel der Klonierung war, unterschiedliche CPE-tragende Konstrukte zu generieren. Mittels "Codon Usage"-Optimierung, Einbau der Kozak-Konsensus Sequenz, sowie Einführung eines Signalpeptids (SS) bei der bakteriellen wildtyp CPE-cDNA sollte die Expression des *Clostridium perfringens* Enterotoxins (CPE) verbessert werden. Durch Insertion verschiedener CPE-cDNA Varianten (wtCPE, wtCPESS, optCPE und optCPESS) wurden die CPE exprimierenden pCpG-basierten Vektoren (s. Abb. 3A) konstruiert. Nach Spaltung des pCpG-Vektors mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Stu I wurde jeweils eine der vier CPE-cDNAs einkloniert (s. Abb.3B).

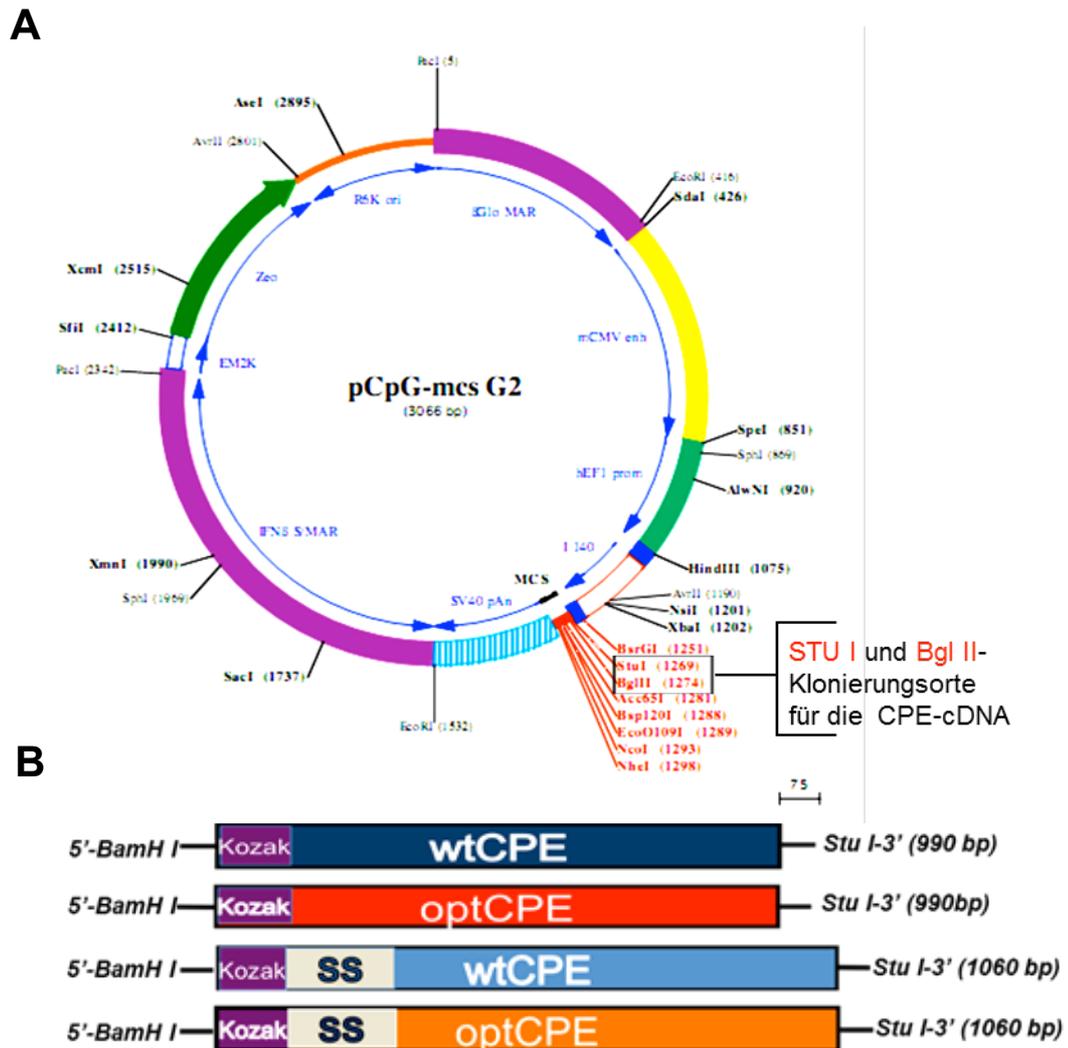


Abb.3: Der pCpG-mcs G2 Expressionsvektor (A) (Quelle: www.invivogen.com) und die vier CPE-Varianten (B). Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Bgl II und Stu I wurde der Vektor im MCS-Bereich gespalten. Jede der CPE-cDNA-Varianten, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamH I und Stu I besitzt, wurde jeweils in den Vektor einkloniert.

Es sind dadurch folgende Konstrukte entstanden:

- Der **pCpG-wtCPE** Vektor mit der bakteriellen wildtyp CPE-cDNA
- Der **pCpG-wtCPESS** Vektor mit der bakteriellen wildtyp CPE-cDNA plus Signalsequenz
- Der **pCpG-optCPE** Vektor mit der Translations-optimierten CPE-cDNA
- Der **pCpG-optCPESS** Vektor mit der Translations-optimierten CPE-cDNA plus Signalsequenz .

Die Kozak-Sequenz, die jede CPE-Variante besitzt, spielt eine wichtige Rolle bei der Translation von Proteinen in den eukaryotischen Zellen. Sie erleichtert die Initiation

der Translation. Die eingefügte Signalsequenz der Immunglobulin Kappa-Kette ermöglicht den kotranslationalen Transport der Proteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und damit ihre anschließende Sekretion aus der Zelle. Das ist von großer Bedeutung bei dem CPE, da seine spezifische Rezeptoren, Claudin-3 und -4 extrazellulär sitzen. Die SS wurde jeweils einmal beim wildtyp und beim optimierten CPE-Gen integriert.

Die “*Codon Usage*” ist wichtig für die Optimierung der Translation. Selten verwendete Codons können die Translation verhindern, während häufig genutzte Codons sie verbessern können. Damit die humanen Tumorzellen das artfremde bakterielle Gen (wtCPE) schnell und effizient für die Translation ablesen können wurde die cDNA gentechnisch verändert. Das Ergebnis ist eine angepasste cDNA-Sequenz (optCPE), die dem “*Codon Usage*”-Repertoire des Menschen weitgehend entspricht.

3.2.2.1 *Primer-Design und PCR*

Die Primer-Paare für die Amplifikation des wtCPE-, optCPE-, wtCPESS- und optCPESS-Gens (Tab. 5) wurden mit Hilfe des Programms “*Clone Manager Professional Suite*“ konstruiert und von der Firma BioTeZ (Berlin) synthetisiert.

Die PCR wurde unter der Verwendung der synthetisierten Primer in Thermocycler durchgeführt.

PCR-Ansatz:

Pwo-Master	25 µL
fw-Primer (10 µM)	2 µL
rev-Primer (10 µM)	2 µL
Template DNA	1-2 µL (10-20 ng)
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,5 µL (2,5 U)</u>
ddH ₂ O ad	50 µL

Für die PCR wurde die Kombination von DNA-Polymerasen Pwo und Taq (1:1) verwendet. Für die PCR-Amplifikation wurde die “Touchdown“-PCR durchgeführt. Dabei wird die “Annealing“-Temperatur der Primer schrittweise um 1-2°C pro Zyklus reduziert, bis eine Temperatur erreicht wird, die der berechneten Schmelztemperatur der Primer entspricht oder etwas darunter liegt. Die “Touchdown“-PCR erhöht die

Spezifität der ersten Primer-Template-Hybridisierung und somit die Spezifität der PCR-Reaktion.

Tab.5: Für Amplifikation des CPE-Gens verwendete PCR-Primer.

<i>Primer</i>	<i>Primer-Länge (bp)</i>	<i>Sequenz (5'→ 3')</i>
wtCPE fw	31	CAGGATCCACCATGCTTAGTAACAATTTAAA
wtCPE rev	31	CAGAATTCTTAAAATTTTTGAAATAAT AATG
wtCPE SS fw	27	AGGCCTACCATGGAGACAGACACACTC
wtCPE SS rev	30	CTGGATCCTTAAAATTTTTGAAATAATATT
optCPE fw	27	AGGCCTACCATGCTGAGCAACAACCTC
optCPE rev	30	GGATCCTCAGAACTTCTGAAAGAGGATGCT
optCPE SS fw	27	AGGCCTACCATGGAGACAGACACACTC
optCPE SS rev	30	GGATCCTCAGAACTTCTGAAAGAGGATGCT

3.2.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Mittels der DNA-Gelelektrophorese wurden DNA-Moleküle nach Größe getrennt. Die gespaltenen Konstrukte wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid versetzt, dann auf 1%-TAE-Agarose-Gel aufgetragen und bei 100V getrennt. Nach Auftrennung der Banden erfolgte Detektion der DNA-Fragmente mit Hilfe von UV-Licht.

<u>TAE-Puffer (50 x):</u>	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 mL
	<u>0,5 M EDTA (H₂O)</u>	<u>100 mL</u>
	ddH ₂ O ad	1 L

3.2.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel

Die unter UV-Licht identifizierten spezifischen Banden wurden aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mittels Invisorb spin DNA Extraktion Kits nach der Vorschrift des Herstellers isoliert und für die weitere Klonierung verwendet.

Transformationsansatz wurde auf Eis für 5 Minuten stehen gelassen und danach erfolgte die Zugabe von 250 µL SOC-Medium, sowie Inkubation auf dem Schüttler bei 300 rpm für 1 Stunde bei 37°C. 50 µL und 150 µL der Transformationslösung wurden auf Low-Salt-LB-Agarplatten (enthaltend das Antibiotikum Zeocin mit 0,1 mg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Agarplatten: 15 g Bacto-Agar
1 L LB-Medium

Low-Salt-LB-Medium: 10 g Trypton/Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ddH₂O ad 1 L

SOC-Medium: 2% Trypton/Pepton
0,5% Hefeextrakt
0,4% Glukose
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
5 mM MgCl₂
5 mM MgSO₄

Mit Hilfe des Antibiotikums wurden positiv transformierte Bakterien selektiert. Auf der Agarplatte gewachsene Kolonien wurden isoliert und in Eppendorf Röhrchen mit Low-Salt-LB-Medium und Zeocin für die Minipräparation (Miniprep) gegeben.

3.2.4 Minipräparation von Plasmid-DNA (Miniprep)

In der Arbeit durchgeführte Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim⁴⁶. Die Minipräparation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterienkolonien einen Tag vorher isoliert und in 5 mL Low-Salt-LB-Medium mit Antibiotikum (Zeocin) in ein Eppendorf-Röhrchen transferiert. Danach wurden die Proben bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und in DNase freiem H₂O

aufgenommen. Zur Validierung der Klonierung erfolgte stets nach dem Miniprep eine Kontrollspaltung mit entsprechenden Restriktionsenzymen (s. 3.2.5.1).

3.2.5 Vektorvalidierung

3.2.5.1 Kontrollverdau

Alle Konstrukte wurden zur Überprüfung der Klonierung mit den Restriktionsendonukleasen Hind III, Stu I, BamH I und Apa I gespalten (s. 3.2.2.4). Der Kontrollverdau lieferte eine Aussage darüber, ob das "Insert" erfolgreich in den Vektor eingebracht wurde. Zum Ausschluss von Punktmutationen etc. erfolgte bei jeder erfolgreichen Klonierung zusätzlich eine Sequenzierung (s. 3.2.5.2).

3.2.5.2 Sequenzierung

Zur Validierung der entstandenen CPE-tragenden Konstrukte wurde eine Sequenzierung von der Firma Invitek (Berlin) durchgeführt. Alle dazu verwendeten Primer (s. Tab.6) wurden von derselben Firma synthetisiert.

Tab.6: Sequenzierungsprimer.

Primer	Primer-Länge (bp)	Sequenz (5'→ 3')
wtCPE fw	18	GTG GCA CTA TGA ACC CTG
wtCPE rev	22	GCA ATA GCA TCA CAA ATT TCA G
optCPE fw	22	TGC TAG ATG ATC TAG CAT TGT A
optCPE rev	22	GAA AGC ATT TTT TTA CTG CAT T

3.2.6 Plasmidpräparation (Maxiprep)

Die positiven Klone wurden nach Transfektion zu Maxipräparation (Maxiprep) angesetzt. Hierzu wurde 1 mL von der Miniprep-Kultur zu 500 mL Low-Salt-LB-Medium dazu pipettiert und wiederum bei 37°C, 100 rpm über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA aus der Probe aufgereinigt und in DNase freiem H₂O suspendiert. Abschließend wurde die Konzentration der Maxiprep-Probe mittels NanoDrop ermittelt und bei -20°C gelagert.

3.2.7 Transfektion der Zellen und Transfektionseffizienzen

Zur Transfektion wurde zunächst eine Zellzählung der vitalen Tumorzellen mittels Countess Zellzahl- und Vitalitäts-Meßgeräts vorgenommen. Die bereits suspendierten Zellen wurden mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 verdünnt und anschließend gezählt. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in eine 6-, 24- oder 96-Well-Platte eingesät (Tab.7) und im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert.

Tab.7 : Verwendete Zellzahlen in den verschiedenen Plattenformaten.

Platte	Zellen/ Well	Kulturmedium µL/ Well
96- Well	20.000	100
24- Well	100.000	500
6- Well	200.000	2000

Für die *in vitro* Experimente wurden die entsprechenden optimalen Transfereffizienzen für jede Tumorzelllinie mit Hilfe des GFP-Proteins ermittelt. Diese sind in der Tabelle 8 zusammengestellt. Bezüglich der optimalen Transfektionsbedingungen wurde für die Transfektion der Zelllinien entweder Fugene HD oder Metafectene verwendet (Tab.8).

Transfektion mit Fugene HD

Es wurde ein Transfektionskomplex aus 100 µL DMEM (ohne FKS), 2-3 µL Plasmid-DNA und 3-6 µL Fugene HD hergestellt. Danach wurde das Gemisch 15 Minuten bei RT stehen gelassen. Während dessen wurde das Medium in der Platte erneuert.. Nach kurzem Vortexen der Transfektionsmischung wurden jeweils 25 µL von dem Gesamtvolumen in jedes Well der Platte transferiert. Dann erfolgte 24 Stunden-Inkubation bei 37°C, 5% CO₂.

Tab.8: Transfektionseffizienzen der ausgewählten Tumorzelllinien.

Zelllinie	Transfektionsreagenz	Transfektionseffizienz in %
MCF-7	Fugene HD	77,9
HCT116	Fugene HD	75,4
Panc-1	Fugene HD	38,1
SKMel-5	Metafectene	34,7

Transfektion mit Metafectene

Für die Transfektion mit Metafectene wurden zwei verschiedene Lösungen vorbereitet:

- Lösung A: besteht aus 30 µL Transfektionsmedium und 1 µg Plasmid-DNA
- Lösung B: besteht aus 20 µL Transfektionsmedium und 3 µL Metafectene

Dann wurde die Lösung A zu Lösung B hinzugefügt. Die Mischung wurde 20 Minuten bei RT inkubiert. Der entstandene Transfektionskomplex wurde vorsichtig gemischt. Abschließend wurden 50 µL von dem Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben.

3.2.8 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi durchgeführt⁴⁷. Dabei wurden die mit Trizol geernteten Zellen 5 Minuten bei RT inkubiert und mit 200 µL Chlorophorm versetzt. Anschließend wurden die Proben ca. 30 Sekunden per Hand geschüttelt, wieder 3 Minuten bei RT inkubiert und 15 Minuten bei 11.200 rpm, 4°C zentrifugiert. Trizol ist eine Mischung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, dessen Zugabe auf die Zellen die Lyse bewirkt. Nach Zugabe von Chlorophorm und Zentrifugation wurden 3 Phasen aufgetrennt, wobei sich die RNA in der obersten Phase befindet. 500 µL von der obersten Phase wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der gesamte Schritt ab der Chlorophorm-Zugabe wiederholt. Danach wurde die RNA gefällt. 500 µL Isopropanol wurden zur wässrigen Phase dazu pipettiert und nach kurzem Vortexen 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Die darauf folgende Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm, 4°C für 10 Minuten. Dann wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1 mL 75% Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte erneut Vortexen und Zentrifugation

für 5 Minuten bei 1.300 rpm, 4°C. Nach Entfernen des Überstandes wurde das entstandene Pellet für 10-20 Minuten bei RT getrocknet. Zum Vermeiden von DNA-Kontamination der RNA-Probe wurde RNase freie DNase dazu gegeben, was den Abbau der nach der Isolierung der verbliebenen DNA ermöglichte.

<u>Reaktionsansatz :</u>	RNA	x µL
	DNase	5 µL
	<u>DNase-Puffer (10 x)</u>	<u>10 µL</u>
	ddH ₂ O, RNase-free ad	100 µL

<u>DNase-Puffer (10 x):</u>	400 mM Tris-HCl, pH 8
	100 mM NaCl
	60 mM MgCl ₂
	10 mM CaCl ₂

Nach Zusammenpipettieren wurden die Proben bei 37°C für 10 Minuten stehen gelassen und anschließend mit RNase freiem Wasser auf 500 µL aufgefüllt. Dann erfolgte Zugabe von 250 µL Chlorophorm und Zentrifugation für 15 min bei 11.200 rpm. Zum Abschluss erfolgten das Fällern mit Isopropanol und das Waschen mit 75% Ethanol. Unmittelbar nach der Suspendierung des Pellets wurde die RNA-Konzentration mittels NanoDrop vermessen.

3.2.9 Real time qRT-PCR für Claudin- und CPE-Expressionsanalyse

3.2.9.1 Reverse Transkription (RT)

Die Evaluation der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde mittels *real time* qRT-PCR durchgeführt. Zunächst wurde die mRNA des untersuchten Gens mit Hilfe einer Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und gleichzeitig amplifiziert (Reverse Transkription). Im nächsten Schritt erfolgte die *real time* qPCR. Dabei wurden die cDNA-Kopien mittels Fluoreszenz-basierter Detektion quantifiziert.

Reverse Transkription

<u>Ansatz:</u>	MgCl ₂ (25 mM)	4µL
	PCR Puffer II (10x)	2µL
	dNTPs (jeweils 10mM)	je 2µL
	Random Hexamers (50µM)	1µL
	RNase Inhibitor	1µL
	MuLV-reverse Transkriptase	1µL
	<u>RNA-Probe (50ng RNA)</u>	<u>3µL</u>
	ddH ₂ O ad	20µL

3.2.9.2. Real time qPCR

Die spezifischen Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurden mit Hilfe des Programms "Clone Manager" und TIB Molbiol konstruiert und von Invitex synthetisiert. Die *real time* qPCR wurde im LightCycler 480 durchgeführt.

SYBR Green System

Zur Quantifizierung der Expression von Claudin-3, Claudin-4 und der vier CPE-Varianten (wtCPE, wtCPESS, optCPE und optCPESS) wurde die Detektion mit SYBR-Green angewendet. Der Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA). Dadurch wird das Fluoreszenzvermögen der dsDNA proportional verstärkt. Die Menge an DNA-Kopien korreliert mit der Stärke des Fluoreszenzsignals.

<u>Programm:</u>	1. Denaturierung	95°C	30 s
	2. Denaturierung	95°C	5 s
	3. Annealing	57/63°C	5 s
	<u>4. Elongation</u>	<u>72°C</u>	<u>10 s</u>
			<i>45 Zyklen</i>
	Schmelzkurve	1. 95°C	
		2. 40°C → 95°C (2°C/s)	
	5. Abkühlen	10°C	

Tab.9: Primer für *real time* qPCR.**Claudin-3 und-4**

Primer	Primer-Länge (bp)	Sequenz (5'→ 3')
Claudin- 3 fw	20	CTGCTCTGCTGCTCGTGTCC
Claudn-3 rev	25	TTAGACGTAGTCCTTGCGGTCGTA
Claudn-4 fw	20	CCTCTGCCAGACCCATATAA
Claudn-4 rev	20	CACCGTGAGTCAGGAGATAA

CPE-Varianten

Primer	Primer-Länge (bp)	Sequenz (5'→ 3')
wtCPE fw	23	GAAATCCTTGATTTAGCTGCTGC
wtCPE rev	23	AAGCTTTTGAGTCCAAGGGTATG
optCPE fw	20	GCTAAGGAGGTGTTCCCTCAT
optCPE rev	20	GTGGCGTAGACCTTGTAGTA

Zur Objektivierung der Quantifizierung von Claudin-3 und -4, sowie der vier CPE-Varianten wurde ihre Expression zu der Expression des G-6-Phosphat-Dehydrogenase-Gens (G-6-PDH, sog. "house keeping"-Gen) relativiert.

FRET- System

Die Quantifizierung des G-6-PDH-Gens wurde mit Hilfe des FRET-Systems (*fluorescence resonance energy transfer*) mit dem Kit von Roche Diagnostics, nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

<u>Programm:</u>	1. Denaturierung	95°C	30 s
	2. Denaturierung	95°C	10 s
	3. Annealing	62°C	10 s
	4. Elongation	72°C	30 s
			45 Zyklen
	5. Abkühlen	10°C	

3.2.10 Proteinisolierung und -quantifizierung

Für die Präparation der Proteine aus Zelllysaten wurden die Zellpellets in 20-35 µl RIPA-Lysispuffer aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend

wurden die Lysate 30 Minuten bei 14.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Nach der Lyse und der Zentrifugation befanden sich die Proteine in den Überständen. Dann wurden die Überstände in neue Eppendorf-Röhrchen transferiert und anschließend mit PBS für die Proteinquantifizierung 1:10 verdünnt.

RIPA-Lysispuffer: 1% NP-40
1% Natriumdeoxycholat
0,1% SDS
150 mM NaCl
5 mM EDTA
50 mM Tris pH 7.2
1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor/10 mL RIPA

Bei der Proteinquantifizierung wurde die Methode nach Bradford mit dem Farbstoff Coomassie-Blau angewendet⁴⁸. Er reagiert mit den Aminogruppen der Proteine und es entsteht ein gefärbter Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 595 nm hat. Als Eichkurve dienten verschiedene Verdünnungen vom BSA im Bereich von 1:75 bis 1:2.000, sowie nur reines PBS (negative Kontrolle), die in eine 96-Well Platte pipettiert wurden. Nachdem die Proteinproben mit PBS 1:10 verdünnt wurden, wurden 300 µL Coomassie Plus Protein Assay Reagent zu den Standards bzw. zu den verdünnten Proben gegeben und die Extinktionsbestimmung bei 595 nm mit Hilfe des Plattenreaders durchgeführt.

3.2.11 Western-Blot

Western Blot ist ein Verfahren, der zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen dient. Dabei werden sie entsprechend ihrer Größe (Molekulargewicht) mittels Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen (Blotting). Danach können sie mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert und mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden.

Western-Blot Ansatz:

Protein	50 µg
LDS (Puffer)	7,5 µL
<u>DTT (1M)</u>	<u>3 µL</u>
PBS ad	30 µL

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden sie auf Nitrocellulosemembran mittels "Semidry-Transfer-System" übertragen. Dann wurden die Membranen mit Blocking-Lösung (aus Milchpulver, BSA und TBST) behandelt. Dann erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht und der erste Waschschrift mit TBST (5x5 Minuten). Danach wurde mit dem sekundären Antikörper (HRP gekoppelt) für 1 Stunde bei RT inkubiert und 5x5 Minuten mit TBST gewaschen. Im Anschluss wurde es detektiert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einer ECL-Lösung für 2 Minuten inkubiert. Die Lumineszenzreaktion mittels Luminol ermöglichte die nachfolgenden Belichtung auf einem CL-Xposure Film.

Verwendete Lösungen:

Laufpuffer: 1 x MES-Puffer

Transferpuffer: 25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1% SDS
20% Methanol
ddH₂O ad 1L

Blockierungspuffer: TBST
5% Trockenmilchpulver
1% BSA

TBS: 50 mM Tris
150 mM NaCl
ddH₂O ad 900 mL, pH 7,5 mit HCl einstellen

TBST: TBS
0,05% Tween20

ECL-Lösung: 4 mL Lösung A (250 µg/mL Luminol in 0,1M Tris/HCl pH 8,6)
400 µL Lösung B (1,1 mg/mL para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO)
1,2 µL 35% H₂O₂

Antikörper für Western-Blot und Immunhistochemie:

primär: α-Claudin-3 (Kaninchen) 1:2.000 in TBST+5%BSA
 α-Claudin-4 (Kaninchen) 1:2.000 in TBST+5%BSA
 α-CPE (Kaninchen) 1:5.000 in TBST+5%BSA
 α-β-Tubulin (Maus) 1:500 in TBST+5%BSA

sekundär: α-Kaninchen (Ziege) IgG-HRP 1:10.000 in TBST
 α-Ziege (Kaninchen) IgG-HRP 1:10.000 in TBST
 α-Maus (Ziege) IgM-HRP 1:10.000 in TBST

3.2.12 Immunfluoreszenz

50.000 Zellen wurden in 4-Well-chamber slides eingesät. Nach 24h erfolgte der Gentransfer des optCPE exprimierenden Vektors. Die Zellen wurden 12, 24 und 48 Stunden nach dem Gentransfer mit PBS gewaschen, 15 Minuten bei RT mit 0,04% Glutaraldehyd fixiert, 10 Minuten mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend 1 Minute mit 5% BSA in PBS bei RT blockiert. Dann erfolgte die Zugabe des Kaninchen-Anti-CPE-Antikörpers und Inkubation bei RT für 3 Stunden. Danach wurden die Tumorzellen mit TBST gewaschen und mit dem sekundären Alexa 488-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper 1 Stunde bei RT inkubiert. Mittels Alexa 55 (Invitrogen) und DAPI (Sigma) wurden das Zytoplasma bzw. die Zellkerne gefärbt. Die Evaluation der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss AxioObserver.Z1.

3.2.13 Immunhistochemie

Für die Detektion des CPE im transfizierten Tumorgewebe wurden am Kryomikrotom Kryoschnitte mit Dicke von 7µm angefertigt. Diese wurden 15 Minuten in 0,04%-Glutaraldehyd fixiert und dann mit PBS bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte Blockierung für 20 Minuten mit 1%-H₂O₂ und wiederum Waschen mit PBS für 10 Minuten. Danach wurde der Kaninchen anti-CPE-Antikörper zugegeben, 2 Stunden bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen.

Der HRP-gekoppelte Ziege anti-Kaninchen-Antikörper wurde auf die Kryoschnitte gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurde mit PBS gewaschen. Dann

wurden die Präparate 2 Minuten bei RT mit Diaminobenzidin inkubiert und nochmals gewaschen. Danach erfolgte Gegenfärbung für 1 Minute mit Hämalaun-Lösung, Spülung mit Wasser, sowie Eindeckung mit Glycergel. Die fertigen Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht.

3.2.14 Hämatoxylin (HE) Färbung

Aus dem Tierexperiment entstandene Tumorschnitte wurden zur weiteren Aufklärung des CPE-Wirkmechanismus mit HE gefärbt. Das Hämatoxylin ist ein farbloser Pflanzenfarbstoff und er wird durch Alkoholextraktion aus Blauholz gewonnen. Durch Oxidation wird Hämatoxylin in den Farbstoff Hämatein überführt. Über Zugabe von Alaunen entstehen die unterschiedlichen Hämatoxylin-Alaune=Hämalaune. Während der Färbung lagern sich die positiv geladenen Komplexverbindungen des Alauns an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren. Die eigentliche tiefblaue Färbung der Kerne wird durch Bläuen erreicht (einstellen des pH-Wertes über 3). Zunächst wurden die Gewebeschnitte 30 Sekunden mit Isopropanol fixiert und anschließend in Hämalaun für 2 Minuten stehen gelassen. Danach erfolgte der erste Waschschrift mit Leitungswasser (2 mal kurz gespült) sowie die Inkubation für 1 Minute in Eosinlösung. Dann wurden die Präparate erneut kurz mit Wasser gewaschen, 1 Minute in 50%-, 1 Minute in 70%- und abschließend 2 Minuten in 96%-Ethanol inkubiert und danach eingedeckt und im Mikroskop evaluiert.

3.2.15 Zytotoxizitätstests

3.2.15.1 Alamar Blue-Zytotoxizitätstest

Die Zelltoxizität des rekombinanten CPE-Proteins bzw. des CPE-Gens in den vier humanen Tumorzelllinien (HTC116, MCF-7, Panc-1 und SKMel-5) wurde mittels Alamar Blue Assay evaluiert. Der Test beruht auf den chemischen Eigenschaften der Substanz Resazurin (Natriumsalz), die eine blaue Farbe besitzt. Vitale Zellen können Resazurin zu Resorufin reduzieren⁴⁹. Die blaue Farbe wird in rot umgewandelt. Durch die Intensität und Geschwindigkeit der Farbänderung, lässt sich der Anteil vitaler Zellen quantifizieren. Tote oder geschädigte Zellen verstoffwechseln den blauen Stoff nicht bzw. sehr langsam und das macht sich durch die entsprechende Farbe der Lösung bemerkbar. Jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach optCPE-

Gentransfer bzw. nach Zugabe des rekombinanten CPE wurde Alamar Blue-Lösung in Verhältnis 1:10 zum Nährmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C für etwa 2,5 Stunden. Die Evaluation der Zellvitalität erfolgte durch eine sechsfache Bestimmung der Extinktion mittels Plattenreaders bei 560 und 620 nm. Als Kontrolle bei diesem Experiment dienten die mit Leervektor (pCpG-mcs G₂) transfizierten Zellen.

3.2.15.2 MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Test wird zur Bestimmung der Zellproliferation bzw. als Zytotoxizitätstest verwendet. Er wurde in dieser Arbeit zur Evaluation der Zelltoxizität nach Zugabe von CPE aus dem Kulturüberstand optCPE transfizierter HCT116 und MCF-7 Zellen auf nicht behandelte Tumorzellen derselben Zelllinie angewendet.

Beim MTT-Test wird in den vitalen Zellen das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] zu der dunkelblauen, wasserunlöslichen Substanz Formazan reduziert. Nach der Zugabe einer SDS-HCl-Mischung kommt es zur Zellyse, wobei das Formazan freigesetzt wird. Die Optische Dichte (OD) der Formazan-Lösung kann spektrophotometrisch bestimmt werden. In dem MTT-Test korreliert sie mit der metabolischen Aktivität und der Zahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen.

Bei dem MTT-Test wurden 10 µL MTT-Lösung pro well in der 96-Well-Platte zugegeben. Nach drei Stunden Inkubation der Proben bei 37°C erfolgte die Absaugung des Mediums und die Zugabe von 150 µL DMSO in jedes Well. Danach wurde die Platte ca. 1 min geschüttelt, damit der Farbstoff gelöst wird. Anschließend wurde die Extinktionsmessung mit Hilfe des Plattenreaders bei 560 nm durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente die Zelllinie SKMel-5, die kein Claudin-4 und Claudin-3 exprimiert.

3.2.16 CPE-spezifischer ELISA

Die Quantifizierung des CPE im Kulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Der Test wurde 24 und 48 Stunden nach Transfektion der Tumorzelllinien HCT116 und MCF-7 mit dem optCPE durchgeführt. Jeweils 100 µL Überstand wurden in eine 96-Well-Platte transferiert. Die Toxin-Detektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Als Standard-Kurve wurden verschiedene Konzentrationen des rekombinanten CPE-

Proteins (0-25 ng/mL) verwendet. Die Messung wurde im Plattenreader bei 450 nm durchgeführt.

3.2.17 Caspase-Assays (Caspase 1,3 und 7)

Der Caspase-Assay sollte eine Untersuchung des Mechanismus des Zelltodes bei CPE-behandelten Tumorzellen ermöglichen. Dadurch sollte die Erkenntnis über die CPE-Wirkung erweitert werden. Hierfür wurden die HCT116 und MCF-7 Zellen eingesät und mit dem optCPE transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0-48 Stunden nach Transfektion) wurden Kulturüberstände abgenommen und nach der Aktivität der Caspase 3 und 7 mittels des Apo-One-Kits geprüft. Die Aktivität der Caspase-1 wurde mittels des Caspase1-Color-Assay bestimmt. Beide Experimente wurden nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der Caspase 3 und 7 Aktivität erfolgte durch Messung der freigesetzte Lumineszenz (RLU). Diese der Caspase 1 Aktivität im Plattenreader bei 405 nm.

3.2.18 Apoptose Assay

Zur Untersuchung des CPE-Wirkmechanismus wurde nach optCPE-Genstransfer der Apoptose-Assay-Kit von Calbiochem angewendet. Der Test beruht auf die Markierung der CPE behandelten Zellen mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem Annexin-V und Propidiumiodid (PI). Das Annexin-V bindet an exponiertes Phosphatidyl-Serin der Membranen apoptotischer Zellen⁵⁰. Das Propidiumiodid kann geschädigte Zellmembranen durchdringen und an DNA binden. Die PI-Färbung ist charakteristisch für Zellen in der spät-apoptotischen bzw. der nekrotischen Phase. Eine Differenzierung und Quantifizierung von vitalen, früh-apoptotischen und nekrotischen Tumorzellen wurde mittels FACS durchgeführt.

3.2.19 FACS

Die Durchflusszytometrie ist eine analytische Methode, die zur Evaluation der Zellgröße, der Struktur (Oberfläche, Granularität etc.) und dem Sortieren verschiedener Zellpopulationen dient. Sie basiert auf der Messung optischer Signale, die nach Passieren der Zellen durch einen Laserstrahl entstehen. Dabei wird die Wellenlänge des gestreuten Lichtes quantifiziert. Des Weiteren kann mit dem

gestreuten Licht im Durchflusszytometer auch die Fluoreszenz verschiedener, intra- sowie extrazellulär gebundener Farbstoffe gemessen und quantifiziert werden.

Die FACS-Analyse wurde in dieser Arbeit zur Evaluation der Apoptose der mit dem rekombinanten CPE behandelten bzw. mit dem optCPE transfizierten HCT116 und MCF-7 Zellen angewendet. Die Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe (Annexin-V und PI) wurden in zwei Kanälen gemessen: Annexin-V (FITC), im Kanal 1 (FL1), mit der Wellenlänge von 518 nm und PI im Kanal 2 (FL2), mit der Wellenlänge von 620 nm. Die Emissionsspektren von FITC und PI überlappen sich und das setzte eine Kompensationseinstellung direkt vor der Messung voraus. Bei jeder FACS-Analyse wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. Als Kontrolle dienten nicht mit dem rekombinanten Toxin behandelte bzw. nicht transfizierte Zellen der entsprechenden Tumorzelllinie. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software von Becton Dickinson.

3.2.20 Biologischer Assay der CPE-Aktivität

Der biologische Assay ermöglichte eine Untersuchung der Aktivität des von erfolgreich *in vitro* transfizierten Tumorzellen produzierten CPE auf nicht transfizierte, Claudin-3 und -4 exprimierende HCT116 und MCF-7 Zellen, bzw. auf SKMel-5 Kontrollzellen. Hierzu wurden jeweils 4×10^5 Zellen pro well in einer 6-Well-Platte eingesät. Nach 24 Stunden wurden die drei Zelllinien mit dem Leervektor und mit dem optCPE-exprimierenden Vektor transfiziert. Parallel wurden am selben Tag 1×10^4 Zellen pro well in einer 96-Well-Platte eingesät und über Nacht inkubiert. Am Tag 2 nach der Transfektion wurde der Kulturüberstand aus dem Well der transfizierten Zellen abgenommen und in auf die nicht transfizierten Zellen der entsprechenden Zelllinie in der 96-Well-Platte gegeben. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation erfolgte der MTT-Zytotoxizitätstest. Die Messung wurde mit Hilfe des Plattenreaders durchgeführt (s. 3.2.15.2)

3.2.21 Laktat-dehydrogenase (LDH)-Assay

Zur Quantifizierung der LDH-Freisetzung aus nach Transfektion mit dem optCPE geschädigten Tumorzellen diente der LDH-Assay. Die Freisetzung der zytoplasmatischen LDH stellt einen Indikator für Membran-Schädigungen und Nekrose dar. Hierzu wurden zu bestimmten Zeiten (0-48 Stunden nach dem

Gentransfer) Kulturüberstände abgenommen und mit dem Cytotoxicity Detection Kit nach Angabe des Herstellers behandelt.

3.2.22 Modell

3.2.22.1 Nicht viraler Gentransfer

Zur Untersuchung der Toxizität des CPE wurde ein Tierexperiment mit 18 Mäusen (NMRI nu/nu, weiblich) durchgeführt. Zur Etablierung der MCF-7 Xenotransplantat-Tumoren wurde den Tieren 1×10^7 Zellen subkutan in die linke Flanke appliziert. Etwa 14 Tage danach waren die ca. 5x5 mm großen Tumore etabliert, in die dann der nicht-virale Gentransfer erfolgte. Die Mäuse wurden nach der Tumortransplantation in folgenden zwei Gruppen aufgeteilt:

- Gruppe 1: Leervektor-transfizierte Kontrollgruppe
- Gruppe 2: pCpG-mcs G2-optCPE-transfizierte Gruppe

Der Gen-Transfer erfolgte dreimalig in Intervallen von 7 Tagen direkt intratumoral, mittels 5 Jet-Injektionen und nachfolgender Elektroporation von 5 Pulsen von 200V/cm/20 ms. Dabei erhielt jedes Tier der Gruppen 1 und 2 jeweils 50 µg DNA, die in 5 Gaben mit jeweils 10 µL Volumen (1µg DNA/ 1µL PBS) aufgeteilt wurde. Die Jet-Injection ist eine Methode, bei der nackte DNA als hochbeschleunigter Flüssigkeitsstrahl (High-Speed-Jet) direkt in das Zielgewebe appliziert wird. Die zeichnet sich durch gute Transfereffizienz bei einfacher Durchführung und geringen Nebenwirkungen aus⁷. Nach jeder Applikation von Jet-Injektion erfolgte anschließend eine Elektroporation. Sie beruht auf dem Effekt der kurzzeitigen Permeabilisierung der Zellmembran in einem elektrischen Feld, die den Gen-Transfer in die Zelle ermöglicht.

3.2.22.2 CPE-Expression und Getherapie

Die Körpertemperatur und das Körpergewicht der Mäuse wurden als Kontrollparameter während des Experiments bestimmt. Das Tumolvolumen wurde an den Tagen 1, 5, 8, 12, 15, 19 und 22 nach dem Gentransfer durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Tumolvolumen (cm}^3\text{)} = \text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times 0,5 \quad (\text{Länge} > \text{Breite})$$

Zur Validierung der optCPE-Expression auf Proteinebene wurde eine Untersuchung der Expressionskinetik durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 2 Tiere 24, 48 und 72 Stunden nach dem Gentransfer mit optCPE getötet und die Tumoren mittels Western-Blot auf CPE-Expression geprüft (s. 3.2.11). Darüber hinaus wurde die CPE-Expression im Tumorgewebe mittels Immunhistochemie nachgewiesen (s. 3.2.13). Die Evaluierung von Tumornekrosen durch CPE-Gentransfer wurde an HE-gefärbten Schnitten vorgenommen (s. 3.2.14).

Die restlichen Tiere wurden am Tag 25 post Transfektion getötet. Die Tumorumfänge der Tiere in beiden Gruppen wurden vermessen und miteinander verglichen. Des Weiteren wurde die CPE-Protein-Expression in dem Tumorgewebe mittels Western-Blot untersucht.

3.2.23 Statistische Verfahren

Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch Berechnung der p-Werte mittels Student t-Tests, sowie des parameterfreien U-Tests von Mann-Whitney. Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant interpretiert.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des *in vitro* Modells

Für die Arbeit sollte zunächst ein geeignetes humanes Tumorzellmodell etabliert werden und daher wurden für die Prüfung der CPE-vermittelten *in vitro* Toxizität verschiedene Tumorzelllinien selektiert. Das wichtigste Kriterium dabei stellte die Expression der CPE-Rezeptoren Claudin-3 und -4 dar, da die CPE-Wirkung an ihre Präsenz gekoppelt ist. Die Rezeptor-Verfügbarkeit der Zellen sollte auf mRNA-, sowie auf Proteinebene überprüft werden. Darüber hinaus war es von Bedeutung eine CPE-resistente Zelllinie für die Untersuchung heranzuziehen, die Claudin-3 und Claudin-4 negativ ist. Diese sollte bei den Experimenten keine Sensitivität gegenüber dem Enterotoxin zeigen und als Negativkontrolle fungieren. Nach der Claudin-3 und -4 Expressionsanalyse und nach der Selektion der geeigneten Tumorzelllinien sollte ihre Empfindlichkeit gegenüber rekombinatem CPE geprüft werden. Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom), HCT116 (Kolonkarzinom), Panc-1 (Pankreaskarzinom) und SKMel-5 (Melanom) verwendet.

4.1.1 Analyse der Claudin-3 und Claudin-4-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene

Die Evaluation der mRNA-Expression beider spezifischer CPE-Rezeptoren, Claudin-3 und Claudin-4, erfolgte mittels *real time* qRT-PCR. Als "house keeping"-Gen wurde das Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PDH) Gen ausgewählt, das durch die vier untersuchten Tumorzelllinien annähernd gleich hoch exprimiert wird. Die Expression der Claudine wurden zum "house keeping"-Gen relativiert und die Ergebnisse sind in der Abb.6 dargestellt. Die Referenzkurven für die Quantifizierung der Claudin-3, Claudin-4 und G-6-PDH-mRNA wurden mit Hilfe einer cDNA-Konzentrationsreihe (5 bis 200 ng) der Kalibrator-Zelllinie erstellt. Als solche wurde bei diesem Experiment die Zelllinie MCF-7 festgelegt. Zusätzlich erfolgte nach der *real time* qRT-PCR eine Trennung der entsprechenden PCR-Produkte mittels Elektrophorese. In der *real time* qRT-PCR zeigten die MCF-7 Zellen die höchste Expression sowohl von Claudin-3, als auch von Claudin-4. Die Claudin-3 und Claudin-4-Expression der HCT116 Zellen präsentierte sich niedriger, als die der MCF-7 Zellen, jedoch konnte bei der Kolonkarzinomzelllinie die Expression beider Claudine nachgewiesen werden. Bei der Tumorzelllinie Panc-1 ließ sich eine im

Vergleich zu MCF-7 und HCT116 relativ niedrigere Claudin-4 und keine Claudin-3 Expression evaluieren. Im Gegensatz dazu konnte bei SKMel-5 keine Expression der Claudine detektiert werden.

Zur Validierung der Claudin-3- und -4 Expression auf Proteinebene wurde der Western-Blot angewendet. Durch den Western-Blot konnten die Ergebnisse der quantitativen *real time* qRT-PCR bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls, dass die MCF-7 und HCT116 Zelllinien beide CPE-Rezeptoren stark exprimieren. Sowohl Claudin-4, als auch Claudin-3 wurden in den Mammakarzinom-Zellen am höchsten detektiert. Bei HCT116 präsentierte sich, ähnlich wie in der *real time* qRT-PCR, eine relativ niedrigere Expression beider Claudine, als bei MCF-7. Darüber hinaus konnte im Western-Blot bei Panc-1 eine, im Vergleich zu den vorigen zwei Zelllinien deutlich niedrigere Claudin-4 Expression ermittelt werden. Bei der Melanom-Zelllinie konnte auf der Proteinebene keine Claudin-3 sowie keine Claudin-4 Expression evaluiert werden. Somit zeigte sie sich als Negativkontrolle für die weiteren Experimente geeignet.

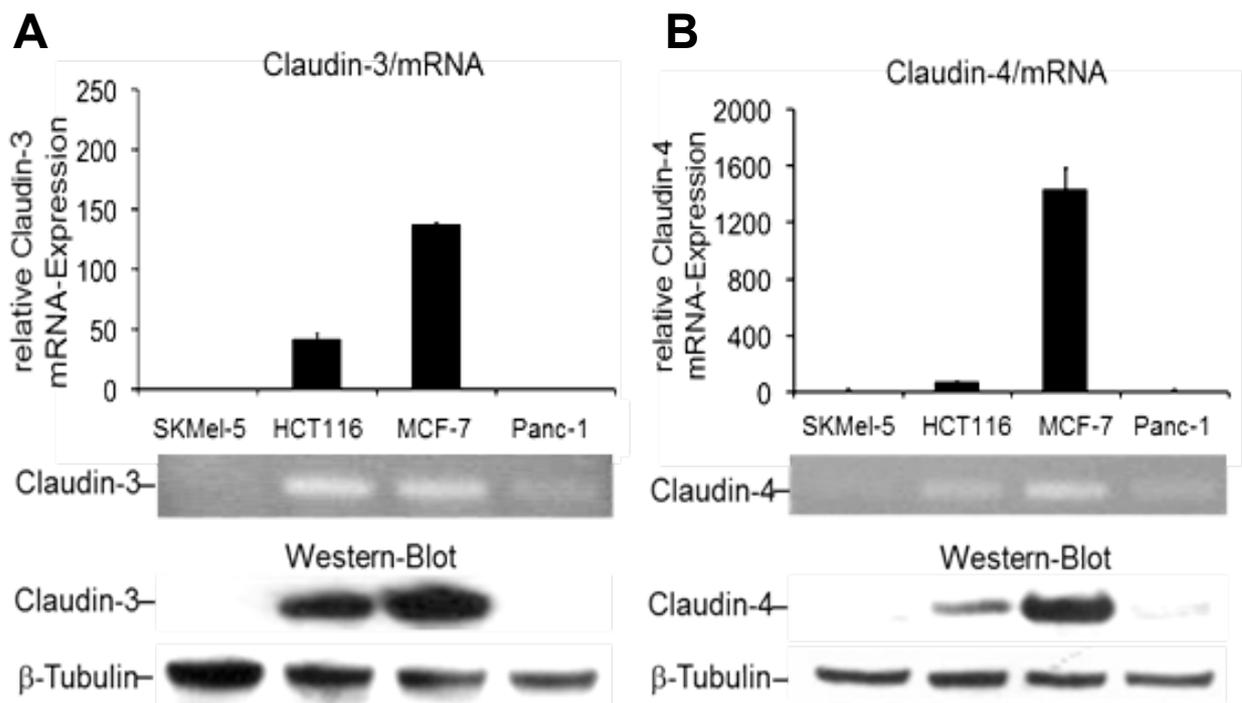


Abb.6: Quantitative Analyse der Claudin-3 (A) und Claudin-4 (B) Expression auf mRNA- und semiquantitative Analyse auf Proteinebene in den humanen Tumorzelllinien MCF-7, HCT116, Panc-1 und SKMel-5. Die *real time* qRT-PCR zeigt eine hohe Claudin-3 und -4 Expression in den MCF-7 und HCT116 Zellen. Die gemessenen Werte wurden zu dem "house keeping"-Gen G-6-PDH normalisiert. Die Agarose-Gele (untere Panel) zeigen die Claudin-3- bzw. -4-spezifischen PCR-Produkte von 126 bzw. 136 bp. Der Western-Blot (unterste Panel) bestätigt die Claudin-3 und -4 Expression in den Zelllinien MCF-7 und HCT116 und zeigt eine relativ niedrigere Expression des Claudin-4 in der Zelllinie Panc-1. Als Ladekontrolle dient β -Tubulin.

4.1.2 Evaluation der *in vitro* Tumorzellsensitivität gegenüber rekombinantem CPE

Der nächste Schritt zur Etablierung des *in vitro* Tumorzellmodells bestand in der Sensitivitätsprüfung der Claudin-3 und -4 exprimierenden Zelllinien MCF-7, HCT116 und Panc-1 sowie der Kontrolllinie SKMel-5 auf CPE. Für das Ziel wurde in folgendem Experiment das rekombinante CPE-Protein (rekCPE) herangezogen. Die Zytotoxizität fünf verschiedener Konzentrationen des rekCPE (0,05 bis 0,25 µg/mL) wurden 24, 48 sowie 72 Stunden nach deren Zugabe auf die Tumorzellen evaluiert. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die mit PBS behandelt wurden. Die Zytotoxizitätsbestimmung wurde mittels Alamar Blue-Assay durchgeführt (s. 3.2.15.1).

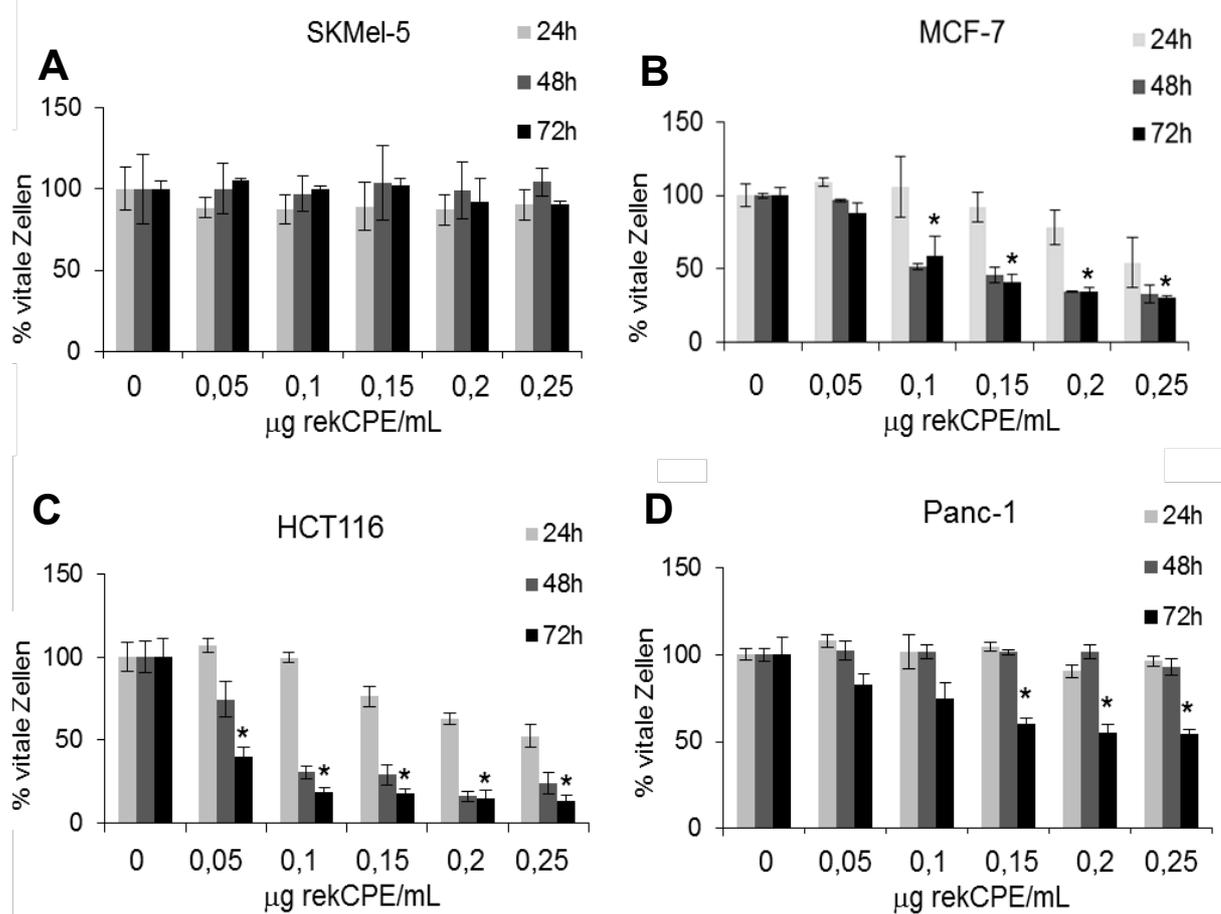


Abb.7: *In vitro* Sensitivität der ausgewählten Tumorzelllinien gegenüber rekombinantem CPE: Das rekombinante CPE wurde in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,05-0,25 µg/mL) auf die Zellen appliziert. Jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der rekCPE-Zugabe erfolgte der Alamar Blue-Test. Es zeigt sich eine starke *in vitro* Zytotoxizität des rekCPE bei den Claudin-3 und -4 exprimierenden MCF-7 (B) und HCT116 (C) sowie eine vergleichbar niedrigere bei Panc-1 Zellen (D). Bei der Kontrollzelle SKMel-5 (A) wurde dagegen keine Wirksamkeit des rekCPE beobachtet; (*), $p < 0,001$.

Die Tumorzelllinie SKMel-5 zeigte sich gegenüber der Wirkung des rekombinanten CPE nicht sensitiv, da keine signifikante Toxizität nach Applikation des Toxins

ermittelt werden konnte. Bei den Claudin-3 und -4 exprimierenden HCT116 und MCF-7 wurde dagegen eine zeit- und konzentrationsabhängige rekCPE-Zytotoxizität nachgewiesen. Diese war jeweils 72 Stunden nach der Zugabe des Toxins am stärksten ausgeprägt und betrug 87% bei HCT116 und 78% bei MCF-7. Panc-1 zeigte sich gegenüber dem rekCPE im Vergleich zu HCT116 und MCF-7 weniger empfindlich, da 72 Stunden nach der Toxin-Applikation 45% der Pankreaskarzinom-Zellen abgestorben waren (s. Abb.7).

4.2 In vitro CPE-Gentransfer und Expression

4.2.1 Konstruktion der CPE-exprimierenden Plasmid-Vektoren

Eine wesentliche Voraussetzung und Grundlage für die weiteren Experimente nach der Verifizierung des Tumorzellmodells bezüglich der CPE-Wirksamkeit bei Claudin-3 und -4 exprimierenden epithelialen Tumoren war die Klonierung der CPE-tragenden Konstrukte. Hierzu wurden in den Expressionsvektor pCpG-mcs G2 (pCpG) vier Varianten der CPE-cDNA-Sequenz (s. 3.2.2) einkloniert.

Für die Prüfung der „sense“-Orientierung des Gens in dem Konstrukt wurde jeweils eine Kontrollspaltung mit den Restriktionsenzymen Stu I und Apa I durchgeführt (s. Abb.8). Eine Sequenzierung des Konstruktes bestätigte das Klonierungsergebnis.

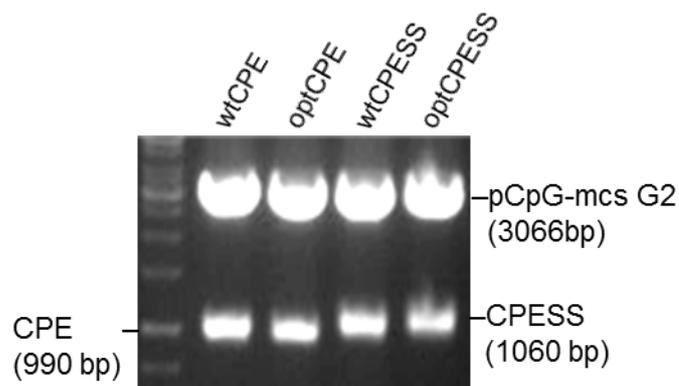


Abb.8: Kontrollspaltung mit den Restriktionsendonukleasen Stu I und Apa I: Nach dem Plasmid-Verdau wurden Vektor- und Insert-Fragmente mittels Elektrophorese getrennt. Auf dem Agarose-Gel zeigen die CPE-Produkte eine Längendifferenz, die durch den Zusatz der Signalsequenz zu dem wtCPE und zu dem optCPE entsteht.

4.2.2 In vitro Gentransfer und Analyse der CPE-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Nach der erfolgreichen Klonierung erfolgte die Evaluation der CPE-Expression in den

Tumorzelllinien nach Transfektion der vier verschiedenen CPE-Gene. Die CPE-exprimierenden Konstrukte pCpG-wtCPE, pCpG-optCPE, pCpG-wtCPESS, pCpG-optCPESS sowie der pCpG-Vektor wurden jeweils in die Tumorzelllinien MCF-7, HCT116, Panc-1 und SKMel-5 unter den optimalen Bedingungen transfiziert (s. Tab.8). Die Analyse der CPE-Expression erfolgte 24 Stunden nach dem Gentransfer mittels *real time* qRT-PCR (mRNA-Ebene) und Western-Blot (Protein-Ebene).

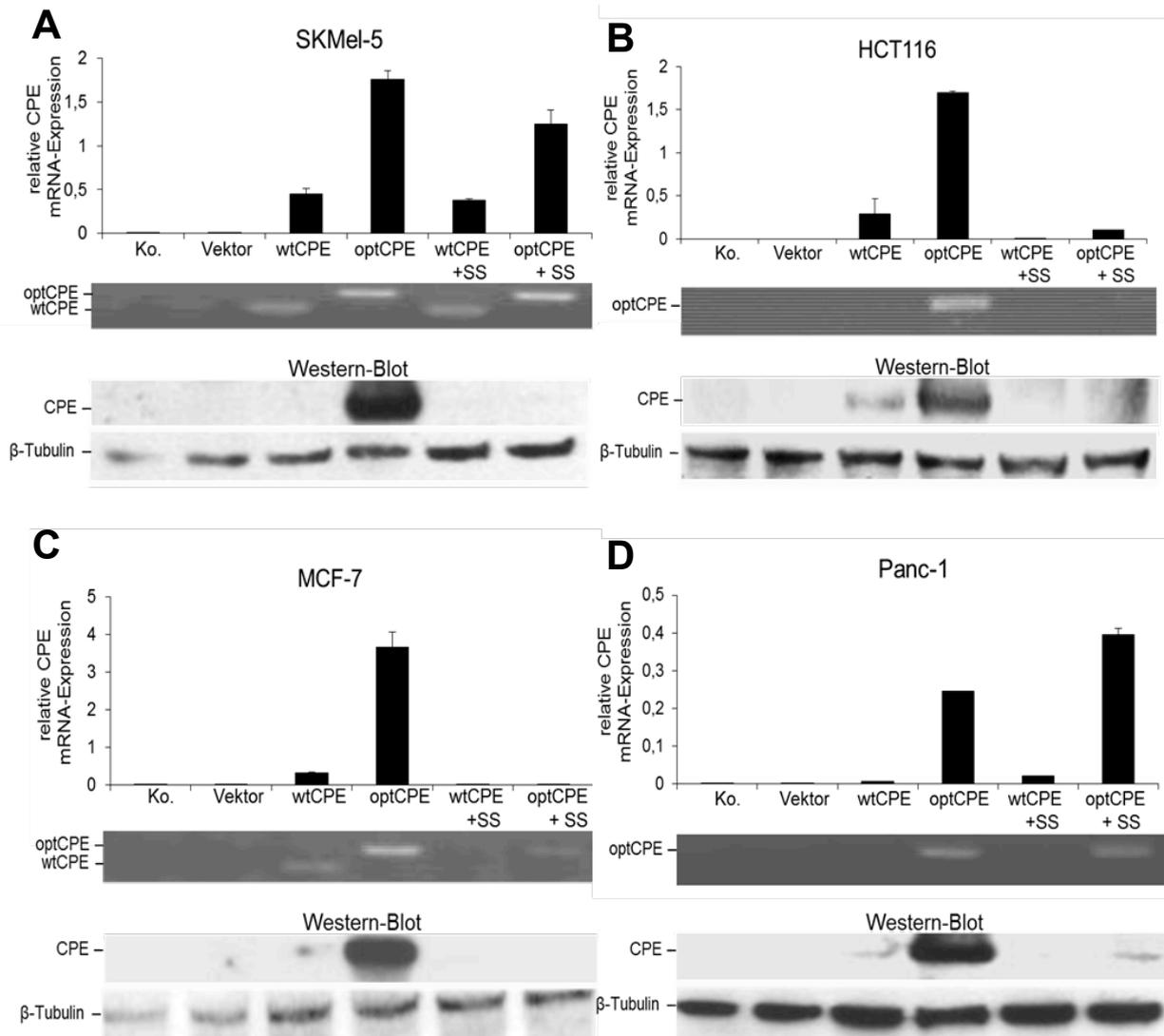


Abb.9: CPE-Expressionsanalyse in den Tumorzelllinien SKMel-5 (A), HCT116 (B), MCF-7 (C) und Panc-1 (D): Die *real time* qPCR, die entsprechenden PCR-Produkte (untere Panel), sowie der Western-Blot (unterste Panel) jeweils 24 Stunden nach Gentransfer mit den wtCPE-, optCPE-, wtCPESS- und wtCPESS-Konstrukten. G-6-PDH dient als "house keeping" bei der *real time* qRT-PCR. Als Ladekontrolle bei dem Western-Blot fungiert β -Tubulin.

Aufgrund der Translationsoptimierung der wtCPE-cDNA wurde eine höhere CPE Expression nach Gentransfer des optCPE und des optCPESS erwartet. Die Transfektion des optCPE-Konstruktes zeigte tatsächlich eine bessere Expression im Vergleich zum wtCPE in allen untersuchten Tumorzelllinien. In der Zelllinie MCF-7

wurde die höchste mRNA-Expression des optCPE nachgewiesen. Nach optCPE-Gentransfer wurde im Western-Blot ebenfalls in allen Tumorzelllinien eine CPE-Expression evaluiert. Der wtCPE-Gentransfer führte dagegen zur CPE-mRNA-Expression in MCF-7, HCT116 und SKMel-5 Zellen. Auf Proteinebene wurde das wtCPE lediglich von HCT116 und nur sehr schwach von MCF-7 exprimiert. Die Einführung der Signalsequenz trug überraschenderweise zu keiner Verbesserung der CPE-Expression bei, so dass beide SS-tragenden Konstrukte keine CPE-Expression in den untersuchten Zelllinien bewirken konnten (s. Abb.9).

Diese Analysen zeigten, dass das optCPE-tragende Konstrukt in allen vier Zelllinien zur besten Expression auf mRNA- und Proteinebene führte.

4.2.3 Kinetik der *in vitro* CPE-Expression

Ein interessanter Punkt bei der *in vitro* Evaluation des CPE-Gentransfers war die Bestimmung der CPE-Expressionskinetik. Für dieses Experiment wurde repräsentativ die Tumorzelllinie MCF-7 untersucht. Sie wurde mit den Konstrukten wtCPE oder optCPE transfiziert. Jeweils 4, 6 sowie 12 Stunden danach wurde eine Expressionsanalyse mittels Western-Blot durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass 4 und 6 Stunden nach Gentransfer keine CPE-Protein-Expression stattfindet. 12 Stunden nach der Transfektion wurde jedoch optCPE-Protein in den Zellen detektiert. Für den wtCPE-tragenden Vektor konnte dagegen in den ersten 12 Stunden nach Gentransfer keine Protein-Expression gezeigt werden (s. Abb.10). Dieses Experiment ermöglichte eine erste Vorstellung über die minimale Zeit, in diesem Fall 12h, die eine Tumorzelllinie für die CPE-Expression auf der Proteinebene benötigt.

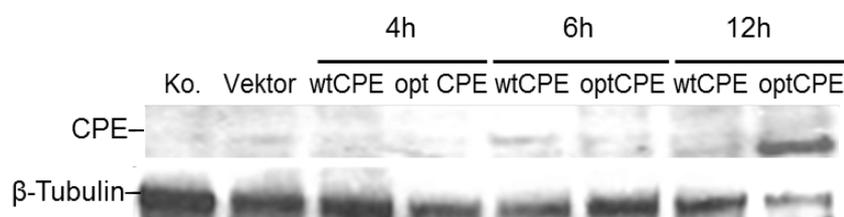


Abb.10: *In vitro* CPE-Expressionskinetik auf Proteinebene. Die Tumorzelllinie MCF-7 wurde mit wtCPE oder optCPE transfiziert. Jeweils 4, 6 und 12 Stunden danach erfolgte die Expressionsanalyse mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle diente β -Tubulin. Das optCPE-Protein konnte 12 Stunden nach der Transfektion detektiert werden.

4.2.4 Intrazelluläre Lokalisation des CPE in transfizierten Tumorzellen

Neben der Expressionskinetik war auch die intrazelluläre Lokalisation des CPE von Interesse. Eine Abklärung der zeitabhängigen Lokalisation des CPE in der Zelle könnte als indirekter Hinweis auf den CPE-Wirkmechanismus dienen. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszenz-Aufnahmen 12, 24 und 48 Stunden nach optCPE-Genstransfer angefertigt. Für dieses Experiment wurden die CPE-sensitiven Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 ausgewählt. Sie wurden transfiziert und zu den oben genannten Zeiten mit spezifischen Anti-CPE-Antikörper für die Immunfluoreszenz inkubiert (s. 3.2.12). Das Zytoplasma wurde orange (Alexia 55) und die Zellkerne blau (DAPI) angefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung des CPE, zunächst im Zytosol und dann zu einem späteren Zeitpunkt auch membranständig. 12 Stunden nach der Transfektion wurde sowohl bei MCF-7, als auch bei HCT 116 eine zytoplasmatische CPE-Akkumulation beobachtet (s. Abb.11). Nach weiteren 12 Stunden zeigte sich, zusätzlich zu der zytoplasmatischen Anhäufung, eine beginnende Umverteilung des Toxins in die Zellmembran. Schlussendlich zeigten die 24 Stunden nach dem Genstransfer angefertigten Fluoreszenzbilder deutlich eine Bindung des CPE an der Zellmembran bei den MCF-7 und HCT116 Zellen.

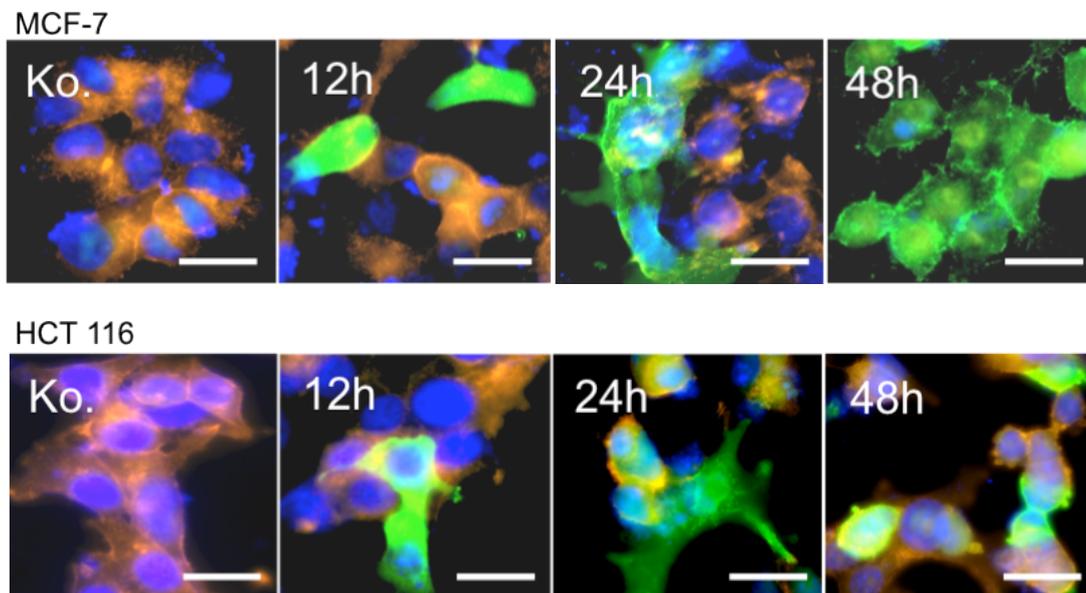


Abb.11: Immunfluoreszenz der zeitabhängigen Lokalisation des CPE (grün) in mit optCPE transfizierten MCF-7 und HCT 116 Zellen. Nach Gegenfärbung mit Alexia 55 und DAPI stellen sich das Zytoplasma orange und die Zellkerne blau dar. Es zeigt sich initial eine zytoplasmatische Akkumulation des CPE in den ersten 12 Stunden nach Transfektion. Nach 24 bis 48 Stunden lässt sich das CPE eher membranständig lokalisieren. Balken 20µm.

4.3 CPE-vermittelte antitumorale Wirkungen in transfizierten Tumorzellen

4.3.1 CPE-vermittelte Zytotoxizität nach in vitro Gentransfer

Bei den Tumorzelllinien MCF-7, HCT116 und teilweise Panc-1 konnte eine Expression der CPE-Rezeptoren Claudin-3 (nicht bei Panc-1) und Claudin-4 nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließ sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte zytotoxische Wirkung des rekombinanten CPE auf diesen Zelllinien nachweisen. Nach erfolgreicher Transfektion mit den verschiedenen CPE-exprimierenden Konstrukten sollte im folgenden Experiment die CPE-vermittelte Zelltoxizität in den Tumorzelllinien sowie in der Kontrolllinie SKMel-5 evaluiert werden. Hierzu wurde der Alamar Blue-Zytotoxizitätstest jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach dem Gentransfer durchgeführt. Die Zellkulturen wurden zusätzlich unter dem Mikroskop bezüglich ihrer Vitalität bewertet und dokumentiert.

Es ließ sich eine signifikante toxische CPE-Wirkung, vor allem für das optCPE-Konstrukt ermitteln. Diese zeigte eine Korrelation sowohl mit der Länge des Zeitintervalls nach dem Gentransfer, als auch mit der Claudin-3 und Claudin-4 Expression in den Zellen. Die Zelllinie MCF-7, die beide Claudine am stärksten exprimiert, präsentierte sich als die sensitivste gegenüber der optCPE-Wirkung. Im Verlauf wurde eine Zytotoxizität von nahezu 100% (72h nach der Transfektion) erreicht. Mikroskopisch waren dementsprechend keine vitalen Zellen zu beobachten (s. Abb.12C). Die Zelllinie HCT116, die wie MCF-7 das Claudin-3 und das Claudin-4 exprimiert, zeigte auch eine relativ hohe Sensitivität gegenüber dem optCPE. 48 Stunden nach dem optCPE-Gentransfer waren etwa 50% und 72 Stunden danach über 85% der Tumorzellen abgestorben. Dieser Befund konnte auch in der Mikroskopie bestätigt werden (s. Abb.12B). Bei der Zelllinie Panc-1, die lediglich das Claudin-4 exprimiert, waren nach 72 Stunden 45% der Zellen durch die toxische Wirkung des optCPE betroffen. Die Mikroskop-Aufnahmen bestätigten wiederum das Ergebnis (s. Abb.12D). Die Kontrollzelllinie SKMel-5, die im Gegensatz zu den bereits analysierten Tumorzelllinien MCF-7, HCT116 und Panc-1 Claudin-negativ ist, zeigte keine Sensitivität gegenüber dem optCPE-Gentransfer. Auf den entsprechenden Mikroskop-Aufnahmen wurde kein Hinweis auf Schädigung der SKMel-5 Zellen festgestellt (s. Abb.12A). Das wtCPE wurde nach Gentransfer in den Zelllinien HCT116 und MCF-7 auf Proteinebene exprimiert. Die relativ niedrigere wtCPE-Expression im Vergleich zu optCPE bewirkte dementsprechend eine schwächer

ausgeprägte Zelltoxizität in den selben Zelllinien, welche bei 35% in HCT116 und bei 55% in MCF-7 lag.

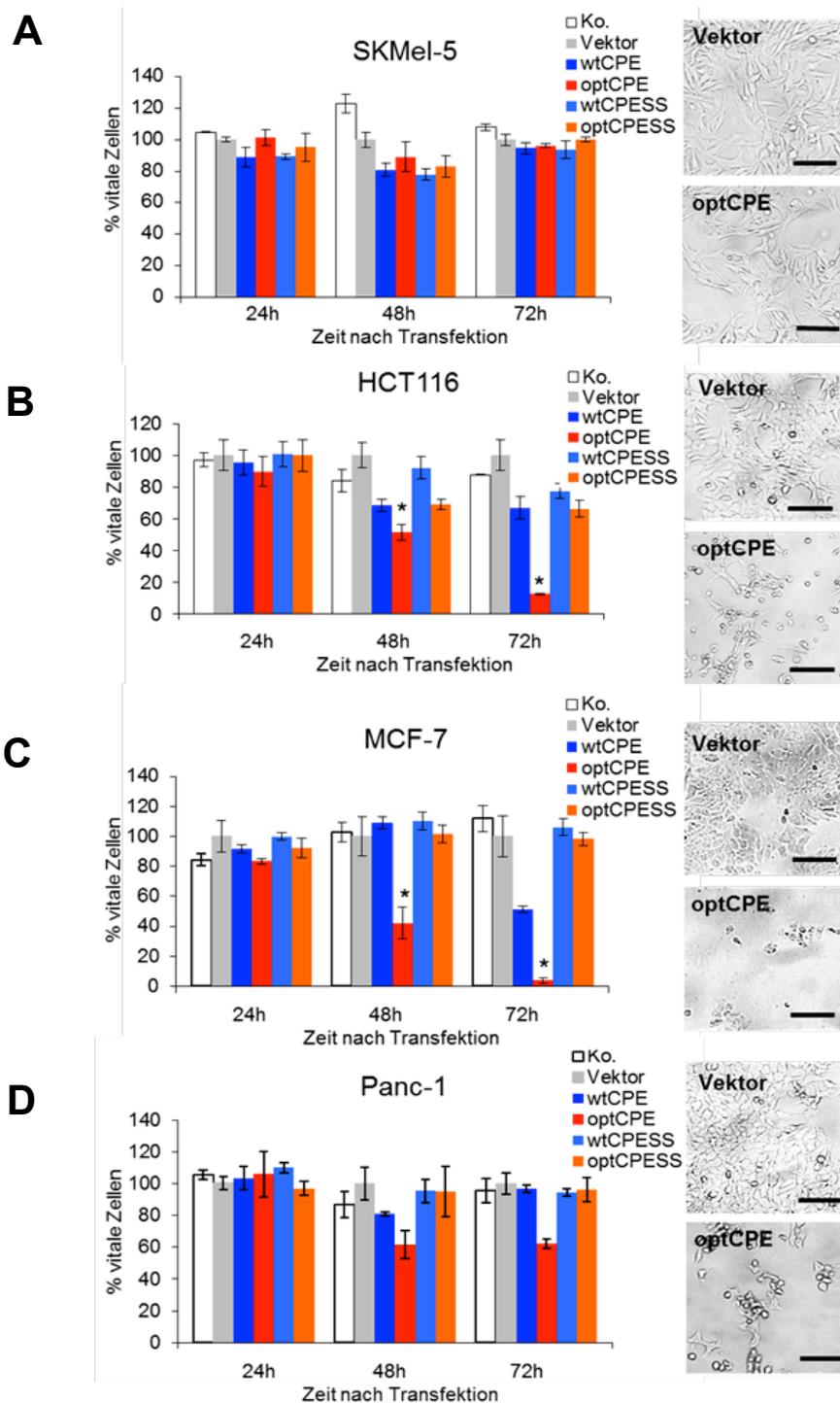


Abb.12: CPE-vermittelte Zytotoxizität in den Zelllinien SKMel-5 (A), HCT116 (B), MCF-7 (C) und Panc-1 (D). Mittels Alamar Blue-Assay wurde die Wirkung des CPE-Genstransfers in den Tumorzelllinien zu drei Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach *in vitro* Transfektion mit den CPE-tragenden Konstrukten geprüft. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte sowie pCpG-Vektor transfizierte Zellen (Vektor). Die Vektor-transfizierten Zellen wurden als 100% definiert. Repräsentativ dargestellt sind Mikroskop-Aufnahmen 72 Stunden nach Transfektion des pCpG-Vektors sowie des optCPE. Balken 100 µm; (*), $p < 0,004$.

Beide Signalsequenz-tragende Konstrukte zeigten im Western-Blot keine Expression. Daher präsentierte sich weder bei den drei Claudin-positiven, noch bei der Kontrollzelllinie eine zytotoxische Aktivität nach dem Gentransfer des wtCPESS und des optCPESS. Da das optCPE-Konstrukt die beste Expressionseffizienz und biologische Wirksamkeit zeigte, wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem Konstrukt durchgeführt.

4.3.2 Evaluation des CPE-"Bystander-Effektes" nach Gentransfer

Bei dem Alamar Blue-Assay nach *in vitro* Transfektion mit dem optCPE-exprimierenden Vektor fiel eine Zytotoxizitätsrate in den Claudin-positiven Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 auf, die höher als die entsprechende Transfektionseffizienzrate ist (s. Tab.8 und 4.3.1). Das ist möglicherweise durch eine Freisetzung des CPE aus den sterbenden bzw. bereits toten Tumorzellen in den Extrazellularraum zu erklären. Das Phänomen, dass nicht transfizierte bzw. kein CPE-exprimierende Tumorzellen aufgrund der Toxin-Wirkung zu Grunde gehen, wird "Bystander-Effekt" genannt. Da bei den Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 ein "Bystander-Effekt" vermutet werden konnte, erfolgten diesbezüglich weitere Untersuchungen. Hierfür wurden die o.g. Zelllinien mit dem optCPE transfiziert. Jeweils 24 und 48 Stunden nach dem optCPE-Gentransfer erfolgte eine Validierung der CPE-Anwesenheit in dem Überstand mittels Western-Blot (s. Abb.13A). Eine zweifache Negativkontrolle wurde dabei mitgeführt: einerseits nicht transfizierte MCF-7 oder HCT116 Zellen (Ko.) und zusätzlich dazu Tumorzellen, die mit dem pCpG-Vektor transfiziert wurden. Der Western-Blot zeigte eine optCPE-Freisetzung in beiden untersuchten Tumorzelllinien sowohl 24, als auch 48 Stunden nach der Transfektion (s. Abb.13A). In den HCT116 Zellen wurde zu den beiden Zeiten eine viel höhere CPE-Menge im Vergleich zu MCF-7 mittels ELISA detektiert (s. Abb.13B). Das könnte allerdings an der höheren Sensitivität der MCF-7 gegenüber CPE liegen, da das stärkere Absterben der MCF-7 Zellen die niedrigere CPE-Freisetzung in den Überstand im Vergleich zu HCT116 erklären könnte. Der Kulturüberstand, der 48 Stunden nach dem Gentransfer abgenommen wurde, wurde dann auf nicht-transfizierte Zellen derselben Zelllinie sowie auf die SKMel-5 Kontrollzellen appliziert (s. Abb.13C).

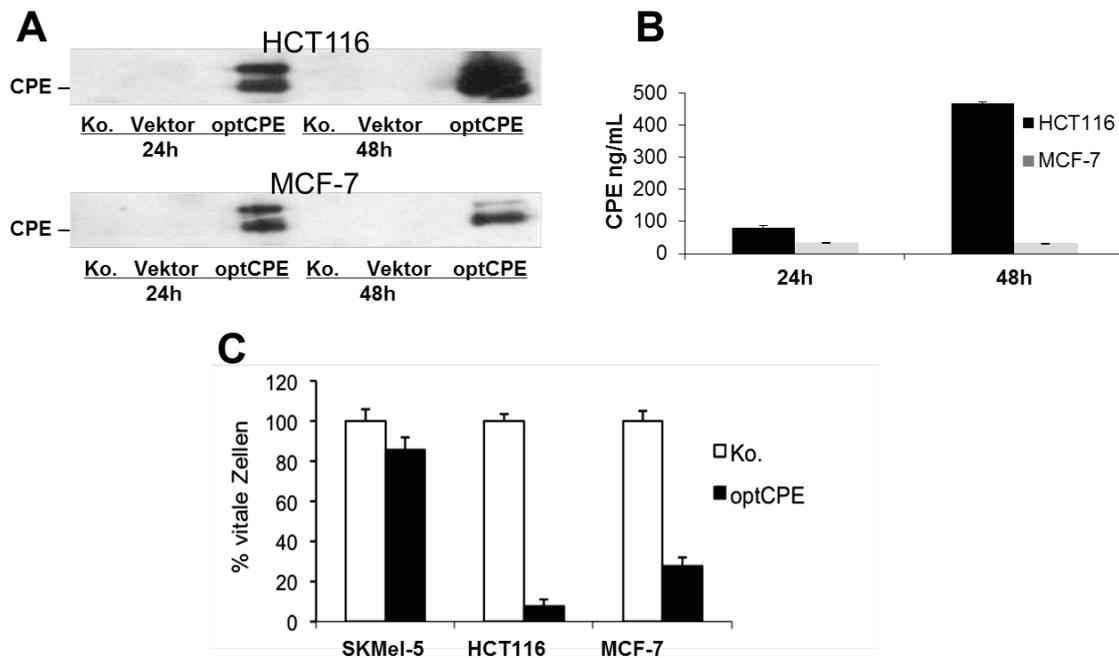


Abb.13: Evaluation des "Bystander-Effektes" durch CPE-Freisetzung. Die Zelllinien HCT116 und MCF-7 wurden mit dem optCPE-Gen oder mit dem pCpG-Vektor (Vektor) transfiziert. 48 Stunden danach wurde der Kulturüberstand mittels Western-Blot auf CPE geprüft (A). Als Kontrolle dienten Kulturüberstände nicht-transfizierter HCT116 und MCF-7 Zellen (Ko.). Die CPE-Konzentration wurde mittels ELISA quantifiziert (B). Abschließend wurde die Toxizität des CPE aus den Kulturüberständen mittels biologischen Assay untersucht (C).

Es sollte hierbei ermittelt werden, ob das in den Kulturüberstand transfizierter Tumorzellen sezernierte CPE eine zytotoxische Wirksamkeit besitzt. Dabei zeigte sich eine Reduktion der vitalen HCT116 Zellen nach dem optCPE-Gentransfer zu 90% im Vergleich zur Kontrolle, die mit dem Überstand nicht-transfizierter Zellen behandelt wurde. Die Mammakarzinom-Zelllinie zeigte sich in diesem Versuch ebenfalls gegenüber CPE sensitiv. Die CPE-Toxizität betrug bei MCF-7 75% (s. Abb.13C).

4.4 Zellulärer Mechanismus der Toxizität nach in vitro CPE-Gentransfer

4.4.1 Analyse der Caspase 1,3 und 7 Aktivierung nach CPE-Gentransfer

Ein wichtiger Punkt für die Etablierung des therapeutischen Ansatzes mit dem *Clostridium perfringens* Enterotoxin bei Claudin-3 und -4 positiven epithelialen Tumoren ist die Abklärung des genauen CPE-Wirkmechanismus. Hierfür wäre eine Abgrenzung zwischen dem programmierten Zelltod, der Apoptose, und der Nekrose von Bedeutung, da die daraus entstehenden Konsequenzen bezüglich der Immunantwort wichtig für die antitumorale CPE-Wirkung sein könnten. Die Caspasen 3 und 7 spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Signalkaskade und können

daher als Apoptose-Marker verwendet werden. Durch Bestimmung ihrer Aktivität in den CPE-gentransfizierten Tumorzellen könnte eine klare Aussage über den Toxin-Wirkmechanismus ermöglicht werden. Für diese Experimente wurden die CPE-empfindlichen Zelllinien MCF-7 und HCT116 herangezogen. Sie wurden mit dem optCPE-Konstrukt transfiziert und 12, 24 und 48 Stunden danach mit dem Caspase 3/7 Kit untersucht (s. Abb.14A)

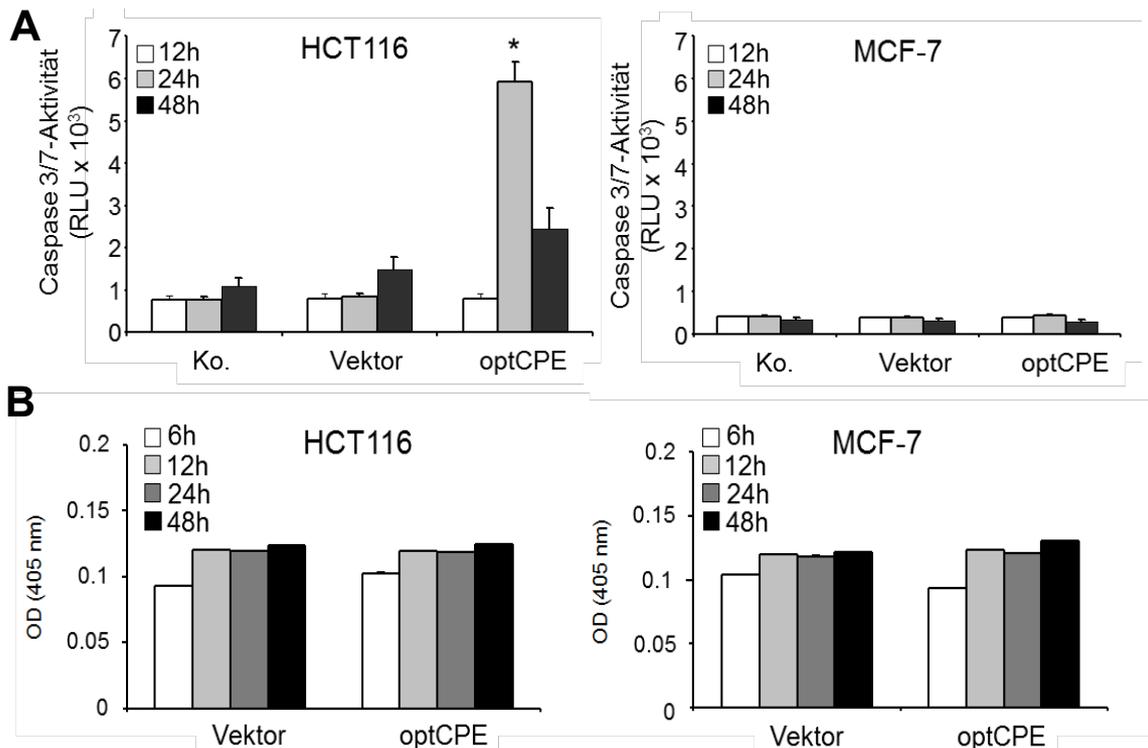


Abb.14: Analyse der Caspase 3/7 (A)- und Caspase 1 (B)-Aktivität in CPE-exprimierenden MCF-7 und HCT116 Zellen. Die Aktivität der Caspase 3/7 aus Kulturmedium und die Aktivität der Caspase 1 aus Zelllysaten wurde zu den Zeitpunkten 6 (nur Caspase 1), 12, 24 und 48 Stunden nach Transfektion mit dem optCPE und dem pCpG-Vektor (Vektor) untersucht (s. 3.2.17). Die Zelllinie HCT116 zeigte als einzige einen signifikanten Anstieg der Caspase3/7-Aktivität 24 Stunden nach optCPE-Gentransfer. Es konnte des Weiteren keine Erhöhung der Caspase 1-Aktivität in den Claudin-positiven Tumorzelllinien nach optCPE-Transfektion nachgewiesen werden. (*), $p < 0,05$.

Bei den Mammakarzinom-Zellen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der Bestimmung ein Aktivitätsanstieg der Caspase 3 oder 7. Bei den HCT116 Zellen wurde dagegen eine signifikante Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität nach 24 Stunden sowie eine späte geringere Aktivität 48 Stunden nach der Transfektion nachgewiesen (s. Abb.14A). Dieses Experiment ist ein Hinweis darauf, dass die HCT116 Zellen nach Schädigung durch das optCPE, möglicherweise in die Apoptose getrieben werden. Bei der Zelllinie MCF-7 fehlt jedoch dieser Hinweis. Das könnte allerdings daran liegen, dass die MCF-7 Zellen bezüglich CPE sensitiver, als die HCT116 sind. Daher

wäre es möglich, dass sie schneller nach dem optCPE-Genstransfer sterben und aufgrund dessen kein Caspase 3/7-Anstieg zu den untersuchten Zeiten zu detektieren ist. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die MCF-7 Zellen nach der Membranschädigung durch das optCPE in Pyroptose getrieben werden. Da bekannt ist, dass bei der Pyroptose die Caspase 1 aktiviert wird, wurde ein Caspase 1-Assay durchgeführt. Der Test fiel sowohl bei MCF-7, als auch bei HCT116 negativ aus (s. Abb.14B) und zeigte somit, dass die Pyroptose als Zelltod-Mechanismus nicht in Frage kommt.

4.4.2 FACScan Analyse mittels Annexin-V/Propidiumiodid (PI) nach CPE-Genstransfer

Die bereits durchgeführten Experimente zur Abklärung des CPE-Wirkmechanismus mit den Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 zeigten indirekt, dass die Nekrose als ein möglicher Zelltodmechanismus in Frage kommt. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Apoptose-Assay durchgeführt, der zu einer Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose als Form des Tumorzelltodes nach optCPE-Genstransfer beitragen soll. Die Behandlung der transfizierten MCF-7 und HCT116 Zelllinien mit Annexin-V sowie PI sollte eine Unterscheidung diesbezüglich erlauben. Diese Methode basiert auf den Eigenschaften nekrotischer Zellen Propidiumiodid zu binden, welches durch die geschädigten Zellmembran in die Zelle eindringen und mit DNA interagieren kann. Im Gegensatz dazu binden apoptotische Zellen das Annexin-V an das durch die Apoptose exponierte Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin⁴⁹.

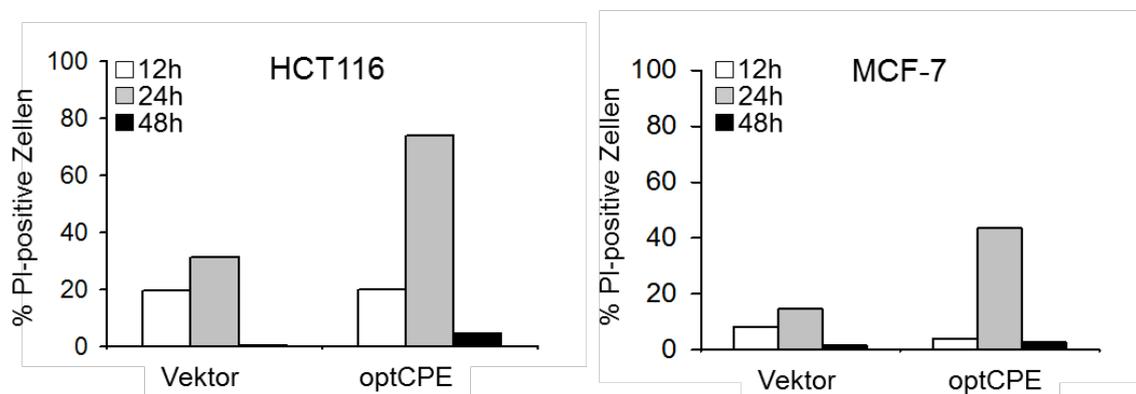


Abb.15: FACS-Untersuchung des CPE-Wirkmechanismus mittels Bestimmung der PI-positiven Tumorzellpopulationen. Ein signifikanter Anstieg PI-positiver Zellen ließ sich bei den beiden Zelllinien, HCT116 sowie MCF-7 24 Stunden nach Transfektion mit dem optCPE beobachten. Als Kontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Zellen (Vektor).

4.3.3 Analyse der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung nach CPE-Gentransfer

Der Apoptose-Assay zeigte sowohl bei MCF-7 als auch bei HCT116 einen erhöhten Anteil an PI-positiven Zellen, 24 Stunden nach optCPE-Gentransfer, jedoch keine Annexin-V Positivität. Das ließ die Nekrose als wahrscheinlichen Zelltodmechanismus nach optCPE-Transfektion Claudin-3 und -4 exprimierender Tumorzellen vermuten. Ein weiterer Parameter in den sterbenden Zellen, die in die Nekrose getrieben werden, stellt das zytosolische Enzym Laktat-Dehydrogenase dar. Ein Anstieg dieses Parameters würde die Hypothese der Nekrose und Membranschädigung bestätigen. Daraufhin wurde ein LDH-Assay jeweils 6, 12, 24 sowie 48 Stunden nach optCPE-Transfektion der MCF-7 und HCT116 Zellen durchgeführt. Dadurch sollte eine mögliche Erhöhung der LDH-Freisetzung in durch CPE geschädigten Zellen evaluiert werden. Hierzu wurden wiederum die zwei Claudin-positiven Zelllinien auf LDH-Anstieg nach Transfektion mit dem optCPE überprüft. In beiden Zelllinien zeigte sich im Überstand ein signifikanter, zweifacher LDH-Anstieg im Vergleich zu der Kontrolle (s. Abb.16A).

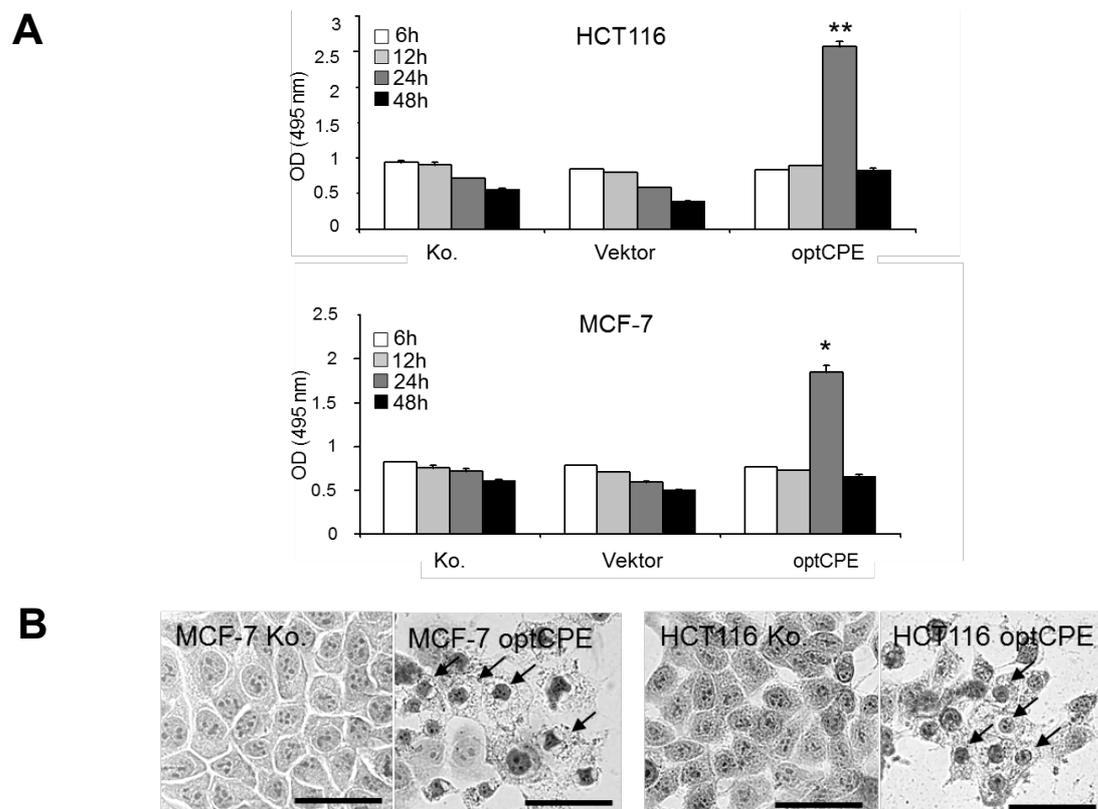


Abb.16: Bestimmung der LDH-Freisetzung bei transfizierten MCF-7 und HCT116 Zellen (A) sowie mikroskopische Evaluation (B) der Zellen. 24 Stunden nach Gentransfer mit optCPE wurde mittels LDH-Assay bei MCF-7 und HCT116 eine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung nachgewiesen. (**), $p=0,002$; (*), $p<0,001$. Auf den mikroskopischen Aufnahmen weisen die Pfeile auf typische Zellmorphologie hin: pyknotische Zellkerne und entleertes Zytoplasma. Balken 50 μ m.

Dieses Ergebnis spricht für die Entstehung von Poren in der Zellmembran der betroffenen Zellen nach CPE-Interaktion und bestätigt, dass die Nekrose der Zelltodmechanismus sein kann. Zusätzlich zu dem LDH-Test wurden von den untersuchten Zellen Aufnahmen unter dem Mikroskop angefertigt. Die mit optCPE transfizierten Zellen zeigten im Gegensatz zu der Kontrolle ein zum Nekrosegesehen passendes Bild mit charakteristischen pyknotischen Zellkernen und entleertem Zytoplasma (s. Abb.16B). Zusammenfassend weisen diese Analysen darauf hin, dass der CPE-Gentransfer in den Tumorzellen zu einem Nekrose-Zelltod führt, der mit der Desintegration der Zellmembran nach CPE-Bindung assoziiert ist.

4.5 CPE-Gentherapie

Der *in vitro* gentherapeutische Einsatz des *Clostridium perfringens* Enterotoxin führte zu einer stark ausgeprägten zytotoxischen Wirkung bei Claudin-3 und Claudin-4 exprimierenden Tumorzellen bereits 48 Stunden nach dem Gentransfer. Somit zeigte das Toxin ein viel versprechendes Potential für die Gentherapie. Ein unentbehrlicher Schritt für die Etablierung der CPE-Gentherapie stellen die Experimente dar. Aus diesem Grund wurde die antitumorale Aktivität des optCPE im Tierversuch untersucht.

4.5.1 Intratumoraler Gentransfer

Die MCF-7 Xenotransplantat-Tumoren wurden in den Versuchstieren subkutan etabliert (s. 3.2.22.1). Die Gruppen wurden aus je 5 Tieren gebildet, die am 45. Tag nach der Tumorzellinokulation optCPE-gentransfiziert wurden. Die Kontrollgruppe wurde zum selben Zeitpunkt mit dem pCpG-Vektor transfiziert. Der Gentransfer erfolgte mittels Jet-Injektion mit nachfolgender Elektroporation und wurde insgesamt dreimalig in einem Intervall von 7 Tagen durchgeführt. Die optCPE-Genexpression wurde auf Proteinebene mittels Western-Blot überprüft.

4.5.2 Analyse der CPE-Expression auf Protein-Ebene

Der erste Schritt bei der Expressionsvalidierung war die Bestimmung der CPE-Expressionskinetik. Hierfür wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach dem optCPE-Gentransfer zwei mit demselben Konstrukt transfizierte Tiere getötet und aus dem Tumorgewebe Protein-Lysate angefertigt (s. 3.2.10). Diese wurden

anschließend zum Protein-Nachweis verwendet. Der Western-Blot zeigte eine CPE-Expression in allen Tumoren über dem gesamten Zeitraum der Untersuchung, also von 24 bis 72 Stunden nach der optCPE-Transfektion. Im Gegensatz dazu konnte bei der Negativkontrolle kein CPE detektiert werden (s. Abb.17).

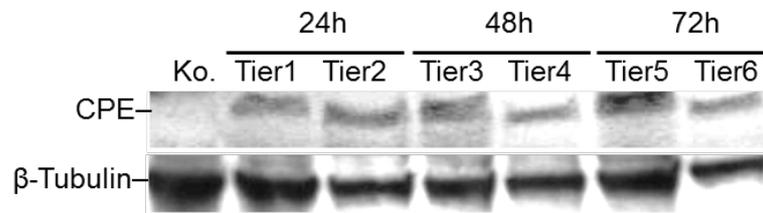


Abb.17: Expressionskinetik nach optCPE-Gentransfer. Jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden die CPE-Expression im MCF-7 Tumorgewebe mittels Western-Blot untersucht. Die Gewebeproben wurden zu den verschiedenen Zeiten nach optCPE-Gentransfer entnommen. Als Negativkontrolle (Ko.) fungierte pCpG-Vektor transfiziertes Tumorgewebe.

Des Weiteren wurde die intratumorale optCPE-Expression nach dem nicht-viralen Gentransfer für den verlängerten Zeitraum von bis zu 5 Tagen analysiert (s. Abb.18A). Hierbei zeigte sich im Western-Blot eine effiziente und kontinuierliche optCPE-Expression vom ersten bis zum fünften Tag nach dem Gentransfer (s. Abb.18A). Im Gegensatz zu der Experimentalgruppe wurde das CPE in der Kontrollgruppe (Ko.) nicht exprimiert. Die Immunhistochemie ermöglichte eine Evaluierung der räumlichen Gewebe-Verteilung des optCPE nach dem Gentransfer. Hierzu wurden die angefertigten Präparate mit entsprechenden Anti-CPE-Antikörpern behandelt und mikroskopisch evaluiert (s. 3.2.13). Präparate von dem ersten und von dem zweiten Tag nach dem optCPE-Gentransfer zeigen begrenzte, umschriebene und diffus-verteilte Areale, die das CPE stark exprimieren (s. Abb.18B, braun-gefärbte Areale). Dagegen zeigte die Kontrolle keine CPE-Expression. Die Untersuchung der CPE-Expressionskinetik erlaubte, dass ein optimaler Zeitpunkt für den wiederholten Gentransfer mit dem optCPE bestimmt wird. Der Gentransfer sollte in einem Intervall von 7 Tagen erfolgen.

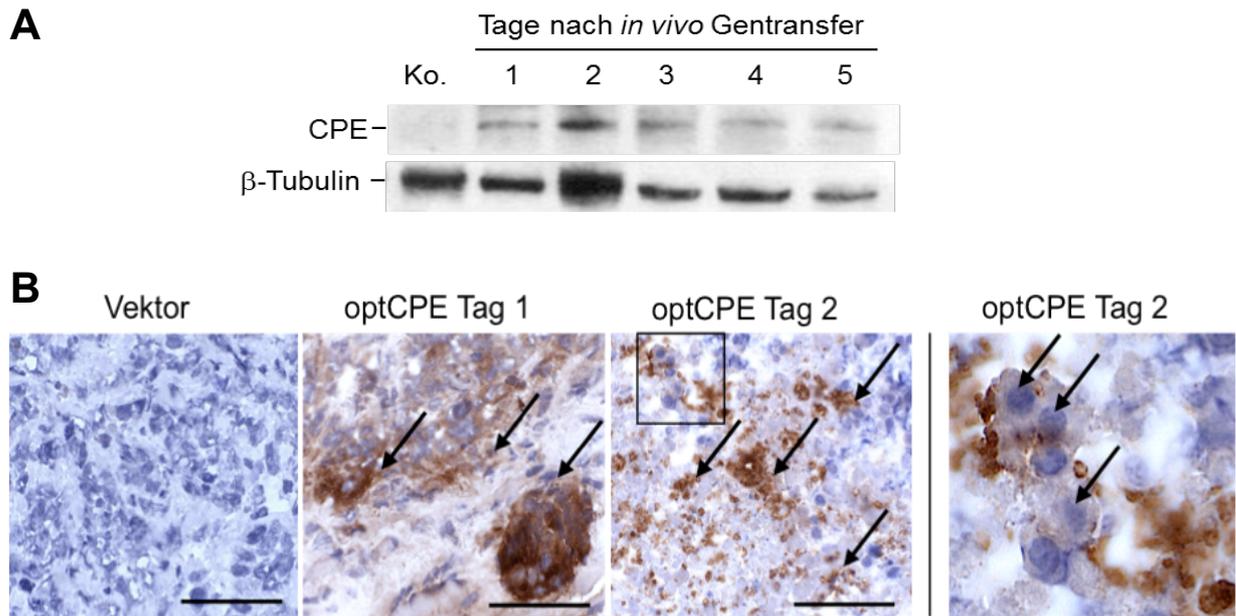


Abb.18: Intratumorale optCPE-Expression und Lokalisation. Zeit-abhängige CPE-Expression in MCF-7-positivem Tumorgewebe, evaluiert mittels Western-Blot (A). Als Ladekontrolle dient β -Tubulin. Die immunhistochemischen Bilder (B) zeigen repräsentativ CPE-exprimierende Areale (braun gefärbt, Pfeile) in den Tumoren 1 bzw. 2 Tage nach optCPE-Gentransfer, verglichen zu der Negativkontrolle (Vektor). Die Aufnahme rechts zeigt Nekrose-assoziierte Veränderungen der Tumorzellen (Pfeile). Vergrößerter Ausschnitt des im Quadrat umschriebenen Bereichs). Balken 200 μ m.

4.5.3 Antitumorale Wirkung des CPE-Gentransfers

Für die Evaluation der antitumoralen CPE-Wirkung wurden die Tumoren der zwei Versuchsgruppen (Vektor-transfizierte Kontrolle und optCPE-transfizierte Gruppe, s. Abb19) zu 6 Zeitpunkten während des Experimentes vermessen und bezüglich ihres Volumens verglichen (s. 3.2.22.2).

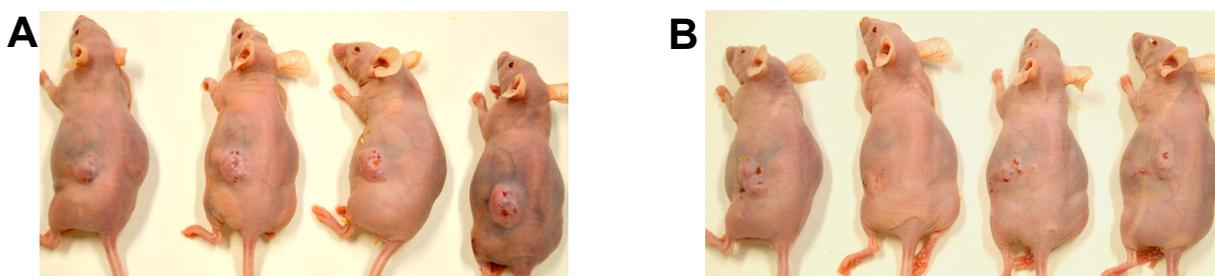


Abb.19: Repräsentative Darstellung der subkutan etablierten und behandelten Xenotransplantat-Tumoren. Vektor-transfizierte Tiere der Kontrollgruppe (A) und optCPE-gentransfizierte Tiere (B) am 22.Tag der Behandlung. Der Gentransfer erfolgte mittels Jet-Injektion/Elektroporation.

Des Weiteren wurden HE-Präparate aus dem Tumorgewebe angefertigt und unter dem Mikroskop evaluiert. Dabei wurde die Struktur der Tumorzellen nach dem

optCPE-Gentransfer bewertet und mit der Kontrollgruppe verglichen. Der optCPE-Gentransfer in die MCF-7 Tumoren bewirkte eine signifikante Reduktion ($p=0.0317$) des mittleren Tumolvolumens um 55%. Die Tumorgöße in der optCPE-transfizierte Gruppe lag zum Zeitpunkt der Auswertung bei $0,322\pm 0,08\text{ cm}^3$, wohingegen der Durchschnitt in der Kontrollgruppe $0,714\pm 0,12\text{ cm}^3$ betrug (s. Abb. 20A). Die Abnahme des Tumorwachstums in der optCPE-transfizierten Gruppe ist mit der Entstehung ausgedehnter Tumornekrose-Areale assoziiert und stellt einen klaren Nachweis für die antitumorale optCPE-Wirkung dar. Auf den HE-Aufnahmen, angefertigt aus denselben Tumoren, zeigten sich ausgedehnte nekrotische Areale (s. Abb. 20B). Diese Areale erscheinen eindeutig großflächiger als die der CPE-Expression (Vergleich zu Abb.18B). Dieses Ergebnis kann als ein Hinweis auf einen "Bystander-Effekt" nach optCPE-Gentransfer in MCF-7 Tumoren gedeutet werden.

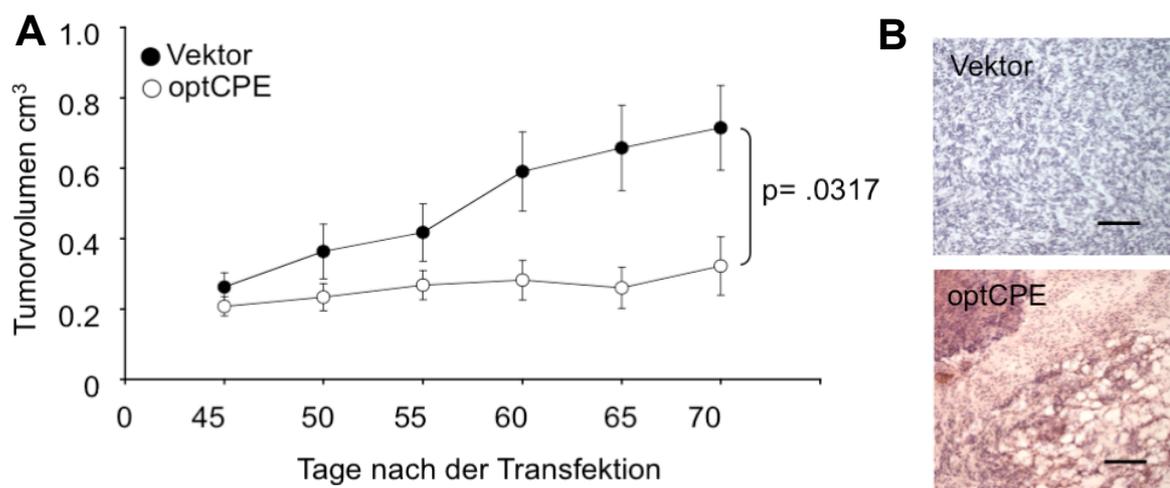


Abb.20: CPE-Wirkung auf MCF-7 Tumoren. Im Tierexperiment führte der optCPE-Gentransfer zu einer signifikanten Tumorreduktion von 55% ($p=0,032$) im Vergleich zu der Vektor-transfizierten Kontrollgruppe(A). Die HE-gefärbten Kryoschnitte zeigten bei der optCPE-transfizierten Gruppe ausgedehnte nekrotische Areale im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (B). Balken $300\mu\text{m}$.

Somit konnte im Tierexperiment eine optCPE-vermittelte Zytotoxizität auf MCF-7 Tumoren, mit einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte die *in vitro* optCPE-Gentherapie eine spezifische zytotoxische Wirkung bei Claudin-3 und vor allem bei Claudin-4 exprimierenden Tumoren, welche vom Expressionslevel des Rezeptors abhängig ist. Diese optCPE-Aktivität wurde durch einen "Bystander-Effekt" potenziert, so dass bei den Claudin-4

stark positiven Zelllinien MCF-7 und HCT116 eine Zytotoxizität von 100% bzw. 85% 72 Stunden nach dem Gentransfer ermittelt wurde. Die Analysen bezüglich des Wirkmechanismus wiesen auf den Nekrose-Zelltod als wahrscheinliche Folge der CPE-vermittelten Toxizität hin. Alle Befunde, welche auf dem *in vitro* Zellmodell erhoben wurden ließen sich auch, am Tiermodell bestätigen. Im Maus-Versuch zeigte sich eine signifikante Tumorreduktion um 55% in der optCPE transfizierten Gruppe im Vergleich zu der Vektor-transfizierten Kontrolle. Mit Hilfe von Immunhistologie sowie von HE-gefärbten Kryoschnitten wurde auch *“Bystander-Effekt“* evaluiert.

5. DISKUSSION

Neben anderen therapeutischen Genen haben auch bakterielle Toxine für die Gentherapie an Attraktivität gewonnen. Einige bakterielle Toxine, wie das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE), das Diphtherietoxin (DT), das *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und das Streptolysin O (SLO) besitzen starke zytotoxische Aktivität und das macht sie für eine antitumorale Therapie viel versprechend⁵¹⁻⁵⁷. Viele Arbeitsgruppen haben sich mit diesem Thema beschäftigt und ihre Analysen bezüglich der Anwendung von DT, PE und SLO in der Onkologie zeigten ihre mangelnde Spezifität als ein wesentliches Problem auf^{14,57}. Im Gegensatz dazu bietet das CPE eine Selektivität in seiner Toxizität. Das CPE ist ein 35 kDa-großes bakterielles Protein, welches kausal mit Lebensmittelvergiftung assoziiert wird^{25,60}. Seine zytotoxische Aktivität beruht, im Gegensatz zu den oben erwähnten Toxinen, auf einer hochspezifischen Interaktion mit den Zelloberflächenrezeptoren Claudin-3 und Claudin-4^{33,62,64}. CPE bindet mit seinem C-Terminus an den Claudin-3 bzw. -4 Rezeptor und diese Bindung führt zu einer Änderung der Membranpermeabilität und schließlich zu Lyse und Zelltod^{25,61,63}. Da eine Reihe von Analysen die Überexpression des Claudin-3 und Claudin-4 in verschiedenen Tumoren epithelialer Herkunft gezeigt haben, besitzt das CPE eine besondere Attraktivität als potenzielles Therapeutikum in der Onkologie⁶⁵⁻⁷⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die CPE-cDNA im Rahmen einer Suizidgentherapie von Tumoren verwendet. Im Mittelpunkt stand neben der *in vitro* Evaluation der antitumoralen CPE-Aktivität nach Transfektion Claudin-3 und Claudin-4 positiver Tumorzellen, auch die Abklärung des zytotoxischen CPE-Wirkmechanismus nach Gentransfer und die Evaluation der Aktivität der CPE-Gentherapie.

5.1 *In vitro* Tumorzellmodell

Von besonderer Bedeutung für die Untersuchung der zytotoxischen CPE-Aktivität war die Etablierung eines geeigneten *in vitro* Tumorzellmodells. Die wichtigste Voraussetzung hierfür stellte die Expression der spezifischen CPE-Rezeptoren, Claudin-3 und Claudin-4 in den Tumorzellen dar. Diese ermöglicht die Entfaltung der CPE-Wirkung. Beide Claudine sind an der Struktur und Funktion der „Tight-

Junctions“ beteiligt und werden unter anderem im Gastrointestinaltrakt von Wirbeltieren und Menschen exprimiert⁷³. Des Weiteren werden Claudin-3 und/oder Claudin-4 in manchen epithelialen Tumoren, wie im Ovarial-, Endometrium-, Mamma-, Nasopharynx-, Pankreas-, Kolon-, Urothel- und Prostatakarzinom sowie in einigen Malignomen nicht epithelialer Ursprungs wie z.B. im Mukosa-assoziierten Lymphom-Gewebe (MALT) überexprimiert^{36,64,75-78}. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Expression im Tumorgewebe signifikant höher im Vergleich zu der physiologischen Expression von Claudin-3 und Claudin-4 z.B. im Gastrointestinaltrakt ist^{35,72}. Von allen Claudin-positiven Tumorarten stellen das Mamma- und das Kolonkarzinom zwei der häufigsten Krebserkrankungen bei der Frau und beim Mann in Deutschland dar². Die Neigung zur Rezidiv-Bildung nach operativer Entfernung sowie die Entwicklung von Chemotherapie-Resistenz in diesen soliden Tumoren bestimmen nicht selten eine schlechte Prognose^{79,80}. Das Langzeitüberleben beim Mammakarzinom in Deutschland liegt durchschnittlich für alle Stadien der Erkrankung bei 84% und beim kolorektalen Karzinom bei 63%⁸¹. Das deutet auf eine bedeutende Sterblichkeit trotz prophylaktischer Maßnahmen hin und erklärt zum großen Teil die intensive Suche nach neuen Möglichkeiten bei der Behandlung beider Tumorarten. Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland⁸². Charakteristisch für diese Tumorart ist die geringe, nur 2 bis 3%-ige 5-Jahresüberlebensrate, die somit die geringste aller Krebserkrankungen darstellt⁸³. Als Ursache dafür gelten vor allem die späte Diagnosestellung mit der daraus folgenden geringen kurativen Resektionsrate sowie die ausgesprochen aggressive Neigung zu Metastasierung des Pankreaskarzinoms⁸³. Eine mögliche therapeutische Zielstruktur stellen die Claudine in diesen Tumoren dar. Einige Studien zeigten, dass das Mammakarzinom beide spezifische CPE-Rezeptoren besitzt, wobei andere berichten, dass sie lediglich das Claudin-4 exprimieren^{45,54,84}. In dem Kolonkarzinom wurde sowohl das Claudin-3, als auch das Claudin-4 detektiert⁷⁴. Die Pankreastumoren zeigen im Allgemeinen eine morphologische Vielfalt und verfügen in Abhängigkeit von dem Ursprungsgewebe über unterschiedliche Claudin-Expressionen. Bei Tumoren endokrinen Ursprungs wird hauptsächlich das Claudin-3 nachgewiesen, wohingegen das Pankreas-Adenokarzinom sowie der muzinös-zystische Tumor der Bauchspeicheldrüse das Claudin-4 überexprimieren^{54,65,85}. Die Claudin-Expression sowie die klinische

Relevanz von Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinom machten diese drei Tumorarten zu attraktiven Kandidaten für die CPE-Gentherapie. Die Evaluation der CPE-Wirksamkeit in verschiedenen Zelllinien, die repräsentativ für die Tumorentitäten Kolon-, Mamma- und Pankreaskarzinom stehen, würde als Hinweis des Nutzens der breiten Anwendung des Enterotoxins in der Onkologie gelten. Als Vertreter dieser drei Tumorarten wurden für die *in vitro* Untersuchung der CPE-Aktivität drei humane Tumorzelllinien ausgewählt: MCF-7 (Mammakarzinom), HCT116 (Kolonkarzinom) und Panc-1 (Pankreaskarzinom). Zusätzlich wurde für die *in vitro* CPE-Aktivitätsanalyse die Zelllinie SKMel-5 herangezogen. Sie ist aus dem Melanom etabliert worden, das weder über Claudin-3, noch über Claudin-4 Expression verfügt³⁸. Da in der Abwesenheit der spezifischen Rezeptoren keine CPE-vermittelte Wirkung entfalten sollte, würde sich SKMel-5 gut als Kontrollzelllinie eignen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Claudin-Expression in den selektierten vier Tumorzelllinien mittels *real time* qRT-PCR und Western-Blot analysiert. Diese Expressionsanalyse diente als Grundlage für die Toxin-Aktivität, wobei die Claudin-4 Expression eine wichtigere Rolle für die Zelltoxizität spielt²⁷. Auf mRNA- und auf Proteinebene zeigte sich, dass die MCF-7 und HCT116 Zellen sowohl Claudin-3, als auch Claudin-4 überexprimieren. Der Claudin-4 Expressionslevel zeigte sich in beiden Zelltypen im Vergleich zu dem von Claudin-3 erhöht und bestätigten die Angaben aus der Literatur³⁰. Bei der Panc-1 Zelllinie wurde, wie bereits von einigen Autoren beschrieben, eine Überexpression des Claudin-4 nachgewiesen^{36,65}. Die Analysen dieser Arbeit ergaben in Panc-1 eine viel geringere Claudin-4 Menge, als in den MCF-7 und HCT116 Zellen. Die Kontrolllinie SKMel-5 zeigte weder im Western-Blot noch in der *real time* qRT-PCR Claudin Expression, was mit Befunden anderer Arbeiten übereinstimmt, dass in Melanomen keine Claudin-3 und -4 exprimiert werden³⁸.

Es sind mittlerweile 24 verschiedene Claudine bekannt und möglicherweise fungieren auch andere Sybtypen als Rezeptoren für das CPE wie z.B. das Claudin-1³³. Zudem sind in der Literatur Hinweise auf weitere Membranproteine wie z.B. Occludin in den Säugerzellen beschrieben, welche in der Lage sein sollen, mit dem CPE zu interagieren⁸⁶⁻⁹⁰. Aus diesen Gründen sollte die Aktivität des rekombinanten

CPE auf den ausgewählten Zelllinien überprüft werden. Es existieren zahlreiche Daten über die *in vitro* und Toxizität vom rekombinanten CPE^{76,88}. Alle drei Tumorentitäten Mamma-, Kolon- und Pankreaskarzinom wurden in der Literatur als empfindlich gegenüber dem Toxin beschrieben^{74,75,78}. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich dabei eine Korrelation zwischen dem Claudin-4 Expressionslevel und der Sensitivität der Zellen gegenüber CPE. Des Weiteren ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der CPE-Konzentration und der Ausprägung der Toxin-Aktivität beobachten. Bei den SKMel-5 Zellen konnte keine CPE-Zytotoxizität beobachtet werden. Das bestätigte die Spezifität der Wirkung des rekombinanten CPE in Bezug auf Claudin-3 und Claudin-4 Expression. Somit wurden die Zelllinien MCF-7, HCT116 und Panc-1 für die weiteren Untersuchungen als geeignete Modelle herangezogen. Die Tumorzelllinien MCF-7 und HCT116 stellen ein optimales Zellmodell für die *in vitro* Prüfung der toxischen Wirkung des CPE dar, da sie hohe Mengen an Claudin-4 und Claudin-3 exprimieren. Die Claudin-4 Verfügbarkeit sowie die Erkenntnis der hohen klinischen Relevanz einer potenziell erfolgreichen, CPE-vermittelten Therapie bei dem Pankreaskarzinom waren die Gründe zur Auswahl der Panc-1 Linie für die Untersuchung.

5.2 In vitro CPE-Gentransfer und Expression

Die Gentherapie wird in der Onkologie aktuell auch als Kombination zur etablierten chirurgischen, Chemo- und Radiotherapie angewendet. Bakterielle Toxine haben eine signifikante Wirksamkeit bei der Bekämpfung von Tumoren gezeigt, wobei sie sowohl als rekombinante Proteine, als auch als therapeutische Gene im Rahmen der Suizidgentherapie Anwendung fanden^{52,53,55-59,91,93,94}. Neben Inhibitoren der Protein-Biosynthese wie Diphtherietoxin und Pseudomonas-Exotoxin, haben auch porenbildende Toxine wie das Streptolysin O und das *Clostridium perfringens* Enterotoxin an Attraktivität für die Gentherapie gewonnen.

Nach Auswahl des Tumorzellmodells (s. 5.1) sollte in dieser Arbeit der biologische Effekt des exprimierten CPE in den Tumorzelllinien HCT116, MCF-7, Panc-1 und SKMel-5 untersucht werden. Hierfür wurden vier verschiedene CPE-cDNA-Varianten in den eukaryotischen Expressionsvektor pCpG-mcs G2 inkloniert und dann in die Tumorzellen transfiziert. Bezüglich der gentherapeutischen Anwendung des CPE

wurden bis zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit keine Daten veröffentlicht und daher mussten durch diesen neuartigen Ansatz einige offene Fragen beantwortet werden. Die wichtigsten davon waren, ob das bakterielle CPE in den eukaryotischen Zellen synthetisiert werden kann und ob das intrazellulär translatierte Enterotoxin seine auf der Außenseite der Zellmembran sitzenden Rezeptoren erreichen würde. Des Weiteren war von Interesse, ob das in den Tumorzellen exprimierte Toxin eine vergleichbare biologische Wirkung und Effizienz, wie das rekombinante CPE erreichen würde.

5.2.1 Optimierung des CPE-Gentherapie-systems

Die *in vitro* Experimente bezüglich der Aktivität des rekombinanten CPE zeigten, dass die Enterotoxin-vermittelte Toxizität auf Claudin-3 und -4 positiven Tumorzellen mit der Höhe der CPE-Konzentration korreliert (s. 4.1.2). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine ausreichende Protein-Expression bei der CPE-Gentherapie von entscheidender Bedeutung für die Entfaltung der Toxin-Aktivität ist. Aus diesem Grund wurde für die Steigerung der CPE-Expression eine Optimierung durch verschiedene Modifizierungen der bakteriellen "wild-typ" CPE-cDNA vorgenommen. Dazu gehören die Einführung von Signalsequenz (SS), die Translationsoptimierung der CPE-Gensequenz durch "Codon Usage" Anpassung sowie die Einführung einer Kozak-Sequenz, welche eine wichtige Rolle bei der Translation von Proteinen in den eukaryotischen Zellen spielt, indem sie die Initiation der Translation erleichtert⁹⁵. Als etablierte SS diente das Signalpeptid der Immunglobulin Kappa-Kette. Dieses ist wichtig für den kotranslationalen Transport der Proteine in das Endoplasmatische Retikulum der Zelle, was für eine nachfolgende Sekretion von Bedeutung ist⁹⁶⁻¹⁰⁰. Die Freisetzung sollte die erwünschte Interaktion zwischen dem Toxin und den extrazellulären Claudin-Rezeptoren ermöglichen. Überraschenderweise wurde bei den SS-tragenden CPE-Konstrukten jedoch eine sehr geringe oder keine Protein-Expression detektiert. Daher wird vermutet, dass die Einführung der Signalsequenz möglicherweise eine Veränderung der CPE-Proteinstruktur zur Folge hat, welche zu schlechter Translation des Proteins führt.

Die "Codon Usage"-Optimierung der "wild-typ" CPE-cDNA hatte das Ziel, die Expression des bakteriellen Gens in den eukaryotischen Tumorzellen zu verbessern. Der Begriff "Codon Usage" bezeichnet, dass Varianten des universellen genetischen

Codes von verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig verwendet werden. Es handelt sich um ein Evolutionsphänomen, welches auf dem Vorkommen synonymmer tRNAs beruht. Die "Codon Usage" ist ein wichtiger Parameter bei der Regulation der Proteinbiosynthese, wobei selten verwendete oder "fremde" Codons die Translation bremsen können¹⁰¹. Das betrifft auch die Protein-Synthese des bakteriellen CPE. Die optimierte CPE-cDNA, ohne den Zusatz der Signalsequenz (optCPE) erwies sich als viel effizienter im Vergleich zu der "wild-tyt" CPE-cDNA und bewirkte unabhängig von der untersuchten Zelllinie die höchste CPE-Expression sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene (s. 5.2.2).

5.2.2 *In vitro* CPE-Expression

Gruber *et al.* und Mizhari *et al.* beschrieben ebenfalls einen gentherapeutischen Ansatz unter Verwendung der bakteriellen Toxine SLO und DT, die als rekombinante Proteine bei Behandlung von Tumoren zuvor bereits genutzt wurden^{54,57}. Die Transfektion des SLO-Gens bei squamösen Hautzellkarzinom und des DT-Gens bei Ovarialkarzinom führte zur *in vitro* Expression der beiden Toxine und bewirkten darüber hinaus einen toxischen Effekt in den Tumorzellen. Diese Experimente weisen darauf hin, dass bakterielle Toxine als therapeutische Gene für die Suizidgentherapie von Tumoren geeignet sind. Ein weiterer Vertreter der therapeutisch nutzbaren Toxine ist das CPE. Es wurden bis zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch keine Daten bezüglich einer CPE-Anwendung in der Gentherapie publiziert. Daher sollte in dieser experimentellen Studie erstmalig CPE für eine Gentherapie eingesetzt werden und eine Prüfung der mRNA- und Protein-Expression in den Tumorzelllinien HCT116, MCF-7, Panc-1 und SKMel-5 nach CPE-Gentransfer erfolgen.

Zur Steigerung der toxischen Aktivität wurde bei der CPE-Gentherapie eine Erhöhung der Protein-Expression erzielt. Neben den Translationsverbesserungen (s. 5.2.1) wurde auch eine Optimierung der Transfektionseffizienz in allen Zelllinien durchgeführt. Diese umfasste eine Auswahl der besten Reagenz für die Transfektion der CPE exprimierenden Konstrukte. Hierfür wurde der CPE-Gentransfer in die HCT116, MCF-7, Panc-1 und SKMel-5 Zellen mittels der Transfektionsreagenzien Metafectene, Metafectene Pro, Fugene, Fugene HD und JetPei durchgeführt. Es

zeigten sich Transfektionsraten von 20% bis 78%, wobei die Zelllinien mit der besten Transfektionseffizienz die MCF-7 und mit der schlechtesten die SKMel-5 waren. Darauf hin wurde die Reagenz, welche die höchste Effizienz bei jeder einzelnen Tumorzelllinie ermöglichte, ausgewählt (s. Tab.8) und somit die optimalen Transfektionsbedingungen für alle Zelllinien etabliert.

Die CPE-tragenden Konstrukte führten, unabhängig von der Transfektionseffizienz, zu unterschiedlicher Expression des toxischen Proteins. Die "Codon Usage" optimierte CPE-cDNA ohne Signalsequenz wurde von allen vier Zelllinien am stärksten exprimiert. Die "wild-typ" CPE-cDNA wurde im Vergleich zu der optimierten Variante viel schwächer (Zelllinie HCT116), sehr gering (Zelllinie Panc-1) oder gar nicht exprimiert. Die SS-tragenden Konstrukte bewirkten dagegen keine Protein-Expression, obwohl die CPE-mRNA nach Gentransfer teilweise detektiert werden konnte. Das ist vermutlich auf ein Translations-Problem im Sinne einer Struktur-Veränderung des exprimierten CPE-Proteins zurückzuführen. In diesem Experiment zeigte das "Codon Usage" optimierte CPE-Gen die mit Abstand beste Expressionseffizienz und erwies sich als das Konstrukt mit dem größten Potential für *in vitro* und Gentherapie Claudin-3 und -4 positiver Tumoren. Dies sollte durch weitere Experimente bezüglich der CPE-Toxizität bestätigt werden.

5.2.3 Intrazelluläre Lokalisation des CPE in transfizierten Tumorzellen

Ein interessanter Punkt für diese Studie war die intrazelluläre Lokalisation des CPE nach dem Gentransfer. Dabei war von Bedeutung, ob bzw. wann und wie das CPE die extrazellulär lokalisierten Claudine erreicht, da ohne eine Interaktion zwischen Rezeptoren und Toxin die Entfaltung der zytotoxischen CPE-Wirkung nicht zu erwarten ist. Diese Frage konnte anhand der publizierten Literatur nicht beantwortet werden. Es gibt jedoch Berichte über den antitumoralen Einsatz des bakteriellen Toxins Streptolysin O als therapeutisches Gen⁵⁶. Das Streptolysin O entfaltet seine toxische Wirkung ebenfalls über Porenbildung. Streptolysin O bindet dabei an Cholesterin-Reste, was zum Tod der Zelle durch Entstehung von Poren in der Membran führt⁵⁶. Die Art und Weise wie das Streptolysin O aus der Zelle herausgeschleust wird, bzw. wie es seine toxische Wirkung nach Gentransfer vermittelt, sind jedoch nicht vollständig geklärt. Es wird nicht ausgeschlossen, dass der Gentransfer durch das Einbringen fremder DNA und die daraus resultierende

übermäßige Protein-Expression, als starker Stressfaktor für die transfizierte Zelle fungiert. Aus diesem Grund versucht sie möglicherweise mit Hilfe verschiedener Mechanismen, wie z.B. der Exozytose, das fremde Produkt herauszutransportieren. Auf diese Weise könnte das SLO freigesetzt werden und die Bindung an den Rezeptor ermöglichen. Andere Arbeitsgruppen vertreten die Hypothese, dass exprimierte Toxinmoleküle innerhalb der Zelle an Vorläuferrezeptoren binden und nach Erreichen der Zellmembran für die Zelle toxisch wirksam werden⁶².

Die intrazelluläre CPE-Lokalisation wurde in der vorliegenden Arbeit mittels spezifischer Immunfluoreszenz in den Tumorzelllinien mit der höchsten CPE-Expression, HCT116 und MCF-7, charakterisiert. Dadurch konnte zu drei verschiedenen Zeiten der zeitliche Verlauf der intrazellulären CPE-Lokalisation verfolgt werden. 12 Stunden nach der optCPE-Transfektion zeigte sich eine zytoplasmatische Akkumulation des Toxins. 24 Stunden post Transfektion präsentierte sich eine Zunahme der intrazellulären Akkumulation, wobei sich auch eine Tendenz zu Verlagerung des exprimierten Toxins in Richtung Zellmembran beobachten ließ. Nach 48 Stunden war CPE nicht nur zytoplasmatisch, sondern auch membrangebunden in den Zellen detektierbar. Der Beginn der Interaktion zwischen CPE und Claudin-3 und -4 könnte daher zwischen 24 und 48 Stunden nach Gentransfer erfolgen.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass auch bei Abwesenheit einer Signalsequenz eine erhebliche CPE-Freisetzung stattfindet. Das Wirkprinzip ist möglicherweise ähnlich wie bei der SLO-Gentherapie: das CPE-Protein wird vermutlich nach dem Gentransfer in den Zellen stark überexprimiert, dann freigesetzt und kann auf andere Zellen einwirken.

5.3 CPE-vermittelte *in vitro* Zytotoxizität nach Gentransfer

Die Spezifität des CPE für die Rezeptoren Claudin-3 und Claudin-4, sowie die geringen Nebenwirkungen seiner Aktivität machen das Enterotoxin zu einem attraktiven Kandidaten für die Therapie von Tumoren⁴². Das CPE wurde bisher vor allem als rekombinantes Protein eingesetzt^{56,59}. Dabei stellte sich heraus, dass die zytotoxische Wirkung durch Ausschöpfung der therapeutischen Dosis und die Notwendigkeit der wiederholten CPE-Applikation limitiert wird. Darüber hinaus wurde

CPE für die Konstruktion von Fusionsproteinen mit anderen Toxinen (PE und TNF- α) für das spezifische Tumortargeting verwendet^{45,93}. Das DT und das PE wurden bereits in der Suizidtherapie eingesetzt (s. 5.2.2). Die vorliegende Arbeit versuchte dieses Behandlungsprinzip mit Hilfe des *Clostridium perfringens* Enterotoxin umzusetzen. Das optCPE wurde nach Transfektion in den humanen Tumorzelllinien HCT116, MCF-7, Panc-1 und der Kontrollzelllinie SKMel-5 auf mRNA- und Proteinebene erfolgreich exprimiert (s. 4.2.2). Das exprimierte optCPE wirkte in den Claudin-3 und -4 hoch positiven HCT116 und MCF-7 Zelllinien stark zytotoxisch, so dass nach 72 Stunden 85-100% der Tumorzellen abgestorben waren. Die Claudin-4 schwach positive Panc-1 Zelllinie zeigte jedoch eine niedrigere Sensitivität gegenüber optCPE-Gentransfer. Die Claudin negative Kontrolllinie SKMel-5 präsentierte sich gegenüber der Toxin-Aktivität wie erwartet resistent. Durch die bisher durchgeführten *in vitro* Experimente konnten einige offene Fragen bezüglich des Gentherapie-Ansatzes von CPE beantwortet werden. Es konnte erstens gezeigt werden, dass die "Codon-Usage" optimierte CPE-Variante (optCPE) in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wird. Zweitens wurde überraschenderweise festgestellt, dass die Signalsequenz keine entscheidende Bedeutung für die Interaktion zwischen CPE und seinen Rezeptoren spielt. Drittens wurde nachgewiesen, dass die Bindung des CPE an die Claudine zum Absterben der Zellen führt, wobei die Höhe des Claudin-Expressionsniveaus proportional zu der CPE-vermittelten Zytotoxizität ist.

5.3.1 "Bystander-Effekt" des CPE-Gentransfers

Eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht die gute Expression eines therapeutischen Gens, was entscheidend in der Suizidtherapie ist. Dabei kann ein "Bystander-Effekt" für ihre Wirksamkeit vorteilhaft sein. Der "Bystander-Effekt" ist ein Phänomen in der Gentherapie, bei dem das Absterben nicht transfizierter Zellen durch Metaboliten der transfizierten Zellen hervorgerufen wird^{11,101,102}. Einige Studien, die sich mit der Cytosindeaminase und dem HSV-*tk*-System der "Gene-Directed Enzyme Prodrug" (GDEP)-Suizidtherapie beschäftigten, konnten den "Bystander-Effekt" *in vitro* demonstrieren¹⁰⁴.

In dieser Arbeit zeigte sich in dem *in vitro* Experiment mit Claudin-exprimierenden Zellen eine Zytotoxizitätsrate 72 Stunden nach CPE-Gentransfer, die deutlich höher

als die Transfektionsrate der jeweiligen Zelllinien war (s. Tab.8 und 4.3.1) Das ist ein Hinweis darauf, dass mehr Tumorzellen absterben, als transfiziert wurden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das CPE, welches von den transfizierten oder möglicherweise sterbenden Zellen in den Extrazellularraum freigesetzt wird, noch zytotoxisch aktiv ist. Diese Hypothese wurde mittels weiterer Experimente überprüft. Die Zelllinien HCT116 und MCF-7, welche Claudin-3 und Claudin-4 exprimieren, zeigten die höchsten Transfektionseffizienzen (s. Tab.8). Bei diesen zwei für die Prüfung der Toxin-Aktivität geeignetsten Tumorzelllinien wurde die *in vitro* Expression sowie die biologische Wirksamkeit des sezernierten CPE untersucht (s. 4.3.2). Es zeigten sich dabei nicht nur eine hohe Konzentration des CPE im Kulturmedium ab 24 Stunden nach dem Gentransfer, sondern auch eine starke Zytotoxizität des sezernierten CPE.

Der in der Arbeit gezeigte *“Bystander-Effekt”* spielt eine bedeutende Rolle bei der Gentherapie. Die tierexperimentellen Untersuchungen dieser Arbeit konnten daher ebenso größere Areale der Tumornekrose zeigen, als durch die gentransfizierten Tumoreale zu erwarten war (s. Abb.19). Da Gentransferraten von 100% der Tumorzellen derzeit nicht erreichbar sind, stellt der *“Bystander-Effekt”* einen wichtigen Faktor für den Erfolg bei einer effektiven Tumorgentherapie dar.

5.3.2 Zellulärer Mechanismus der zytotoxischen CPE-Wirkung nach *in vitro*

Gentransfer

Neben der Zytotoxizität-Untersuchung in Folge des CPE-Gentransfers bei Claudin-3 und -4 exprimierenden Tumorzellen sollte diese Arbeit zur Verbesserung des Verständnis des zellulären Toxin-Wirkmechanismus beitragen. Viele Autoren beschrieben die hochspezifische Interaktion zwischen dem CPE und Claudin-3 und -4, die zum Tod der betroffenen Zellen durch Porenbildung in der Membran führt^{88,104}. Aus therapeutischer Sicht ist es jedoch bedeutsam, den genauen Mechanismus der CPE-vermittelten Toxizität zu analysieren. Dabei ist die Abgrenzung zwischen der Nekrose- und der Apoptose-Form des Zelltodes von besonderem Interesse. Chakrabarti *et al.* untersuchten die zytotoxische Wirkung des rekombinanten CPE. Sie berichten, dass eine niedrige CPE-Dosis Apoptose induziert, wohingegen eine hohe CPE-Dosis die betroffenen Zellen in Nekrose treibt¹⁰⁶. In der vorliegenden Arbeit wurden nach CPE-Transfektion verschiedene Apoptose- und Nekrose-

spezifischen Parameter, wie PI-/Annexin-V-Markierung, Caspase-Aktivierung, LDH-Freisetzung, charakterisiert. Die fehlende Aktivitätserhöhung der Apoptose-Marker Caspase-3 und Caspase-7 bei deutlichem Zelluntergang nach optCPE-Gentransfer in die Zelllinien HCT116 (24h) und MCF-7 (24 und 48h) spricht gegen den apoptotischen Zelltodmechanismus. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einer Gentherapie-Studie mit dem SLO-Gen publiziert, in der keine Apoptose nachweisbar war⁵⁴. Ein Caspase-3 und -7 Anstieg wurde jedoch bei der Zelllinie HCT116 48 Stunden nach der Transfektion ermittelt, welcher möglicherweise mit einem „Bystander-Effekt“-vermittelten Tod der nicht CPE-exprimierenden Kolonkarzinomzellen zu erklären wäre. Diese Ergebnisse weisen auf die Nekrose als wahrscheinliche Zelltod-Form, ausgelöst durch das exprimierte CPE. Diese Vermutung bestätigte sich durch Nachweis der LDH-Freisetzung im Kulturmedium und korreliert gut mit der Schädigung der CPE-transfizierten Tumorzellen durch Porenbildung. Darüber hinaus ließen sich die Tumorzellen nur mittels Propidiumiodid (PI), nicht jedoch mit Annexin-V anfärben und sie zeigten in HE-Präparaten typische Nekrose-assoziierte Veränderungen, wie pyknotische Kerne und entleertes Zytoplasma (s. Abb.16B). Das Fehlen eines Caspase-1 Anstiegs in den transfizierten Zellen schließt die Pyroptose als Zelltodmechanismus bei CPE-transfizierten Zellen aus^{105,106}. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Nekrose die wahrscheinliche Zelltod-Form nach *in vitro* CPE-Gentransfer ist. Das wird auch durch Experimente mit dem rekombinanten CPE anderer Arbeitsgruppen bestätigt^{43,63,64}. Für den klinischen Einsatz der CPE-Gentherapie wäre sicherlich die Nekrose als Sterbemechanismus zu bevorzugen, da es gezeigt worden ist, dass Tumorzellen der Apoptose entgehen können. Die Zellen können antiapoptotische Resistenz entwickeln indem sie verschiedene antiapoptotische Moleküle exprimieren⁵⁵. Aus diesem Grund wäre die Nekrose vorteilhaft, da sie die Chance der antiapoptotischen Resistenzentstehung verringert. Darüber hinaus könnten bei der Nekrose freigesetzte Entzündungs-Mediatoren zur Tumor-Erkennung von Immunzellen beitragen und somit auch die CPE-Gentherapie unterstützen¹⁰⁷.

5.4 CPE-Gentherapie

Die ersten *in vitro* Experimente mit dem CPE-Gen bei Claudin-3 und -4 exprimierenden Tumorzelllinien zeigten die effiziente und selektive Toxizität der CPE-Gentherapie, so dass sie für Studien verwendet werden konnte. Die Effektivität des Prinzips des lokalen gentherapeutischen Einsatzes eines bakteriellen Toxins wurde bereits mit dem Diphtherietoxin erfolgreich getestet⁵⁸.

Der optCPE exprimierende Vektor, der die stärkste *in vitro* Expression und Zytotoxizität zeigte, wurde mittels lokalen nicht-viralen Gentransfers in MCF-7 Xenotransplantat-Tumoren eingebracht. Die Ergebnisse des Tierversuchs bestätigten die der *in vitro* Experimente. Das optCPE wurde von den Tumorzellen stark, bis zu 5 Tagen exprimiert und zeigte dabei eine inhomogene Verteilung im Tumorgewebe. Das exprimierte optCPE wirkte zytotoxisch und zeigte darüber hinaus einen "Bystander-Effekt". All dies führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens im Tiermodell. Bei dem Einsatz der CPE-Gentherapie wurden keine Nebenwirkungen festgestellt, die mit dem CPE assoziiert sein könnten¹⁰⁸.

Zusammenfassend zeigte die Gentherapie mit *Clostridium perfringens* Enterotoxin bei MCF-7 Xenotransplantat-Tumoren Selektivität und deutliche Zytotoxizität, was eine Reduktion des Tumorwachstums bewirkte. Aus klinischer Sicht zeigt sich dieser neue Ansatz für antitumorale Behandlung viel versprechend, da eine Vielzahl epithelialer Tumore Claudin-3 und -4 überexprimieren und somit ein interessantes Target für die CPE-Gentherapie darstellen³⁰. In Kombination mit chirurgischen Verfahren und/oder Chemotherapie könnte die CPE-Gentherapie bei Therapie-resistenten Tumoren, bei schwierig zu rezidierenden Tumorrezidiven nach Operation des Primärtumors, bei Metastasen (z.B. bei Lebermetastasen) sowie zum Down-Staging von soliden Tumoren verwendet werden. Die CPE-Gentherapie könnte darüber hinaus auch zur Erhöhung der Sensitivität von Chemotherapie-resistenten Tumoren wie Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom und Mammakarzinom bei der Chemotherapie in einer Kombiantionstherapie eingesetzt werden¹⁰⁹.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Krebs ist eine Erkrankung, welche in den Industrieländern an Bedeutung zunimmt. Das bestimmt die Suche nach neuen Behandlungsoptionen, zu denen die Gentherapie gehört. Ein wichtiges Konzept der Gentherapie stellt die Suizidgentherapie dar. Diese beruht auf dem Einbringen therapeutischer Gene in die Tumorzellen, deren Produkte z. B. den Zelltod auslösen. Im Rahmen der Suizidgentherapie werden aufgrund der effizienten Toxizität auch bakterielle Toxine eingesetzt. Diese zeigten in einer Vielzahl von *in vitro* und Untersuchungen hohe antitumorale Aktivität.

Das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) ist ein Vertreter dieser bakteriellen Toxine. Es entfaltet seine hochspezifische Wirkung über die Membranrezeptoren Claudin-3 und Claudin-4, welche in epithelialen Tumoren wie Kolon-, Mamma-, Pankreas-, Prostata-, Ovarialkarzinom überexprimiert sind. Für die selektive Behandlung dieser Tumorentitäten stellt das CPE einen attraktiven Kandidaten dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde das CPE erstmalig als therapeutisches Gen zur Eliminierung von Claudin-positiven Tumorzellen *in vitro* und im Rahmen einer Gentherapie eingesetzt und es wurden Untersuchungen zum zellulären Wirkmechanismus des exprimierten CPE durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene humane Tumorzelllinien bezüglich der Claudin-3 und -4 Expression und der Sensitivität gegenüber rekombinantem CPE geprüft. Darüber hinaus wurden die optimalen Transfektionsbedingungen dieser Zelllinien etabliert. Als geeignete *in vitro* Modelle wurden die Claudin-3 und Claudin-4 positiven Zelllinien HCT116, MCF-7 und Panc-1 sowie die Claudin-negative Melanom-Linie SKMel-5 ausgewählt und in nachfolgenden *in vitro* Experimenten verwendet.

Für die CPE-basierte Suizidgentherapie wurde das CPE-Gen (wtCPE) sowie drei weitere CPE-Varianten erfolgreich generiert: das CPE-Gen mit Signalsequenz (wtCPESS), das "Codon Usage" optimierte CPE-Gen (optCPE) sowie das "Codon Usage" optimierte CPE-Gen mit Signalsequenz. Die Genvarianten wurden in den Expressionsvektor pCpG-mcs G2 inkloniert. Die CPE-Expression wurde nach Transfektion der ausgewählten Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene evaluiert. Diese Expressionsanalysen ergaben, dass das optimierte CPE Gen in allen

Tumorzelllinien mit größter Effizienz exprimiert wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass das exprimierte optCPE in der Lage ist, in den Claudin-3 und -4-positiven MCF-7, HCT116 und teilweise in den Claudin-4 positiven Panc-1 Zellen hohe Zytotoxizität auszulösen. Als das am besten exprimierte Konstrukt erwies sich somit das optCPE, welches auch die stärkste zytotoxische Aktivität vermittelte. Der Einbau der Signalsequenz in die CPE-cDNA-Sequenz führte zu keiner bzw. einer sehr schwachen Expression der CPE-Konstrukte und dementsprechend zu keiner signifikanten Zytotoxizität. Es wurde gezeigt, dass die Wirksamkeit des Enterotoxins mit dem Expressionslevel des optCPE korreliert und dass die Höhe der Claudin-3 und vor allem Claudin-4 Expression die Stärke der CPE-Wirksamkeit *in vitro* bestimmt. Dies gilt als Beleg für die selektive Zytotoxizität der CPE-Gentherapie. Die Untersuchungen mit dem optCPE zeigten, dass die CPE-vermittelte Toxizität durch einen *“Bystander-Effekt“* *in vitro* und auch unterstützt wird. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass das exprimierte CPE den nekrotischen Zelltod in den betroffenen Tumorzellen bewirkt.

konnte erfolgreich mittels nicht-viralen Gentransfers die intratumorale Expression des optCPE erreicht werden. Die tierexperimentellen Untersuchungen zeigten aber vor allem die zytotoxische Aktivität des CPE-Gentransfers, die zur signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führte und mit Nekrose der Tumoren assoziiert war. Die *in vitro* Ergebnisse der antitumoralen CPE-Wirkungen ließen sich somit am Tiermodell bestätigen.

In dieser Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die CPE-Suizidgentherapie ein großes Potenzial als neue Strategie zur effektiven und selektiven Therapie von Claudin-3 und Claudin-4 positiven epithelialen Tumoren besitzt. Von großem Wert kann dabei der Einsatz dieser Gentherapie für die lokale Kontrolle von therapieresistenten Tumoren sein, die anderen Therapien schwer oder nicht mehr zugänglich sind.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Cancer: World Health Organization, February 2011. (Accessed May 24, 2011 at www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.)
2. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007. (Accessed May 27, 2011 at <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/globalfactsandfigures2007rev2p.pdf>)
3. Caffarelli E, Filetici P. Epigenetic regulation in cancer development. *Front Biosci.* 2011;17:2682-94.
4. R. Kreienberg, I. Kopp, U. Albert, H. H. Bartsch, M.W. Beckmann, D. Berg, U. Bick *et al.* Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2008; Aktualisierung der 1. Auflage (2004).
5. Gonzalez-Aseguinolaza G, Prieto J. Gene therapy of liver diseases: A 2011 perspective. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011: Epub ahead of print.
6. Anderson LF. Cancer Act anniversary encourages reflection, new visions. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(24):1795-6.
7. Gene types transferes in gene therapy clinical trials and Indications addressed by Gene therapy clinical trials, 2011. (Accessed on 11.03.2004 at <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>)
8. Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U. Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2007;11(2):206-23.
9. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 2002;9(24):1647-52.
10. Walther W, Stein U. Therapeutic genes for cancer gene therapy. *Mol Biotechnol.* 1999;13(1):21-8.
11. Walther W, Stein U, Fichtner I, Schlag PM. Low-volume jet injection for efficient nonviral gene transfer. *Mol Biotechnol.* 2004;28(2):121-8.
12. Alvarez RD, Curiel DT. A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Hum Gene Ther.* 1997;8(5):597-613.
13. Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(1):33-7.

14. Michl P, Gress TM. Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004;4(8):689-702.
15. Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med*. 1997;3(12):1362-8.
16. Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy: from bench to bedside. *J Neurooncol*. 2003;65(1):37-48.
17. Zheng JY, Chen D, Chan J, Yu D, Ko E, Pang S. Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A. *Cancer Gene Ther*. 2003;10(10):764-70.
18. Ayesb B, Matouk I, Ohana P, Sughayer MA, Birman T, Ayesb S, Schneider T, de Groot N, Hochberg A. Inhibition of tumor growth by DT-A expressed under the control of IGF2 P3 and P4 promoter sequences. *Mol Ther*. 2003;7(4):535-41.
19. Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev Microbiol*. 1998;52:333-60.
20. Frieben WR, Duncan CL. Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. *Eur J Biochem*. 1973;39(2):393-401.
21. Wnek AP, McClane BA. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in a 160,000-Mr complex in mammalian membranes. *Infect Immun*. 1989;57(2):574-81.
22. McClane BA, McDonel JL. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochim Biophys Acta*. 1980;600(3):974-85.
23. McClane BA. The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon*. 2001;39(11):1781-91.
24. Singh U, Van Itallie CM, Mitic LL, Anderson JM, McClane BA. CaCo-2 cells treated with *Clostridium perfringens* enterotoxin form multiple large complex species, one of which contains the tight junction protein occludin. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18407-17.
25. Smedley JG 3rd, Uzal FA, McClane BA. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun*. 2007;75(5):2381-90.
26. Eder G, McDonel JL, Dorner F. Hepatitis B vaccine. *Prog Liver Dis*. 1986;8:367-94.

27. Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors. J Biol Chem. 1997;272(42):26652-8.
28. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(2):511-6.
29. Fromm M, Schulzke JD. Molecular structure and function of the tight junction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009;1165:1-346.
30. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. BMC Cancer. 2006;6:186.
31. Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(6):919-28.
32. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. FEBS Lett. 2000;476(3):258-61.
33. Mitchel LA, Koval M. Specificity of Interaction between Clostridium perfringens Enterotoxin and Claudin-Family Tight Junction Proteins. Toxins 2010;2(7):1595-1611.
34. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. Cancer Res. 2000;60(22):6281-7.
35. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. Cancer Res. 2001;61(21):7878-81.
36. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res. 2005;65(21):9603-6.
37. Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, Gregoire L, Schwartz DR, Cho KR, Morin PJ. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. Clin Cancer Res. 2003;9(7):2567-75.
38. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. Hum Pathol. 2004;35(12):1531-6.
39. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology. 2005;46(5):551-60.

40. Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Löhr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology*. 2001;121(3):678-84.
41. Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Kufer P, Itin C, Baeuerle PA, Kohleisen B. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(5):431-45.
42. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1627-33.
43. Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, Smedley JG 3rd, McClane B, Brem H, Sukumar S. *Clostridium perfringens* enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res*. 2007;67(17):7977-82.
44. Santin AD, Zhan F, Cane' S, Bellone S, Palmieri M, Thomas M, Burnett A, Roman JJ, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: identification of novel molecular markers for uterine serous cancer diagnosis and therapy. *Br J Cancer*. 2005;92(8):1561-73.
45. Yuan X, Lin X, Manorek G, Kanatani I, Cheung LH, Rosenblum MG, Howell SB. Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(7):1906-15.
46. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-23.
47. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
49. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6.
50. Sarda-Mantel L, Hervatin F, Michel JB, Louedec L, Martet G, Rouzet F, Lebtahi R, Merlet P, Khaw BA, Le Guludec D. Myocardial uptake of ^{99m}Tc-annexin-V and ¹¹¹In-antimyosin-antibodies after ischemia-reperfusion in rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 ;35(1):158-65.

51. Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther.* 2005;12(18):1360-8.
52. Schmidt M, Gruensfelder P, Roller J, Hagen R. Suicide gene therapy in head and neck carcinoma cells: an in vitro study. *Int J Mol Med.* 2011;27(4):591-7.
53. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Joshi B, Puri RK. Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor alpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):577-86.
54. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y, Yagi K. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol.* 2009;76(4):918-26.
55. Candolfi M, Kroeger KM, Xiong W, Liu C, Puntel M, Yagiz K, Muhammad AK, Mineharu Y, Foulad D, Wibowo M, Assi H, Baker GJ, Lowenstein PR, Castro MG. Targeted Toxins For Glioblastoma Multiforme: Pre-Clinical Studies And Clinical Implementation. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011: Epub ahead of print.
56. Gruber C, Gratz IK, Murauer EM, Mayr E, Koller U, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G, Hintner H, Bauer JW. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing facilitates targeted delivery of suicide genes to cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(2):233-41.
57. Yang WS, Park SO, Yoon AR, Yoo JY, Kim MK, Yun CO, Kim CW. Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(6):1610-9.
58. Goepfert C, Gazdhar A, Frey FJ, Frey BM. Effect of electroporation-mediated diphtheria toxin A expression on PSA positive human prostate xenograft tumors in SCID mice. *Prostate.* 2011;71(8):872-80.
59. Mizrahi A, Czerniak A, Levy T, Amiur S, Gallula J, Matouk I, Abu-lail R, Sorin V, Birman T, de Groot N, Hochberg A, Ohana P. Development of targeted therapy for ovarian cancer mediated by a plasmid expressing diphtheria toxin under the control of H19 regulatory sequences. *J Transl Med.* 2009;7:69.
60. Hanna PC, Wieckowski EU, Mietzner TA, McClane BA. Mapping of functional regions of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect Immun.* 1992;60(5):2110-4.
61. Cocco E, Casagrande F, Bellone S, Richter C, Bellone M, Todeschini S, Santin AD *et al.* *Clostridium perfringens* enterotoxin carboxy-terminal fragment is a novel tumor-homing peptide for human ovarian cancer. *BMC Cancer* 2010;10:349.
62. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol.* 1999;147(1):195-204.

63. Santin AD, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cancer Res.* 2005;65(10):4334-42.
64. Santin AD, Bellone S, Siegel ER, McKenney JK, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Tognon G, Bandiera E, Pecorelli S. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res.* 2007;13(11):3339-46.
65. Borka K. Claudin expression in different pancreatic cancers and its significance in differential diagnostics. *Magy Onkol.* 2009;53(3):273-8.
66. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E, Myal Y. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. 2009;454(6):647-56.
67. Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y. Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS.* 2007;115(7):838-47.
68. Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2007;38(4):564-9.
69. Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(1):233-41.
70. Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, Maitra A, Sheikh S, Amr SS, Yang S, Brock M, Forastiere A, Zhang S, Murphy KM, Berg KD. Overexpression of claudin proteins in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14(1):24-30.
71. Soini Y, Kinnula V, Kahlos K, Pääkkö P. Claudins in differential diagnosis between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma of the pleura. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):250-4.
72. Kojima F, Ishida M, Takikita-Suzuki M, Hotta M, Katsura K, Nagata A, Enoki Y, Kato G, Okabe H. Claudin expression profiles in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep.* 2010;23(4):927-31.
73. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* 2007;98(7):1014-9.

74. Matsuda M, Sentani K, Noguchi T, Hinoi T, Okajima M, Matsusaki K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oue N, Yasui W. Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. *Pathol Int.* 2010;60(10):673-80.
75. Ebihara C, Kondoh M, Hasuike N, Harada M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Fujii M, Watanabe Y. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(1):255-60.
76. Nakanishi K, Ogata S, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T. Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(1):43-9.
77. Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K. Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials.* 2010;31(20):5463-71.
78. Yamaguchi H, Kojima T, Ito T, Kyuno D, Kimura Y, Imamura M, Hirata K, Sawada N. Effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin via claudin-4 on normal human pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16(3):385-97.
79. Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, Busson P, Tursz T, Liu E, Raab-Traub N. Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol.* 1992;66(6):3768-75.
80. Dylla SJ, Beviglia L, Park I-K, Chartier C, Raval J, *et al.* Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy. *PLoS ONE* 3(6): e2428. 2008. Epub ahead of print.
81. Hiripi E, Gondos A, Emrich K, Holleczeck B, Katalinic A, Luttmann S, Sirri E, Brenner H & the GEKID. Cancer Survival Working Group. Survival from common and rare cancers in Germany in the early 21st century. *Annals of Oncology.* 2011.
82. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature.* 2010;467(7319):1109-13.
83. Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg.* 1999;189(1):1-7.
84. Lanigan F *et al.* Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int. J. Cancer.* 2009;124:2088–2097.
85. Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann KH, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Löhr M, Leder G, Iwamura T, Adler G, Gress TM. Claudin-4

expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003;63(19):6265-71.

86. Singh U, Mitic LL, Wieckowski EU, Anderson JM, McClane BA. Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33402-12.

87. McClane BA, Chakrabarti G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe.* 2004;10(2):107-14.

88. Smedley JG 3rd, Uzal FA, McClane BA. Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* 2007;75(5):2381-90.

89. Robertson SL, McClane BA. Interactions Between *Clostridium perfringens* Enterotoxin and Claudins. *Methods Mol Biol.* 2011;762:63-75.

90. Caserta JA, Hale ML, Popoff MR, Stiles BG, McClane BA. Evidence that membrane rafts are not required for the action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun.* 2008;76(12):5677-85.

92. Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *Prostate.* 2011. Epub ahead of print.

93. Mizrahi A, Hochberg A, Amiur S, Gallula J, Matouk I, Birman T, Levy T, Ladimir S, Ohana P. Targeting diphtheria toxin and TNF alpha expression in ovarian tumors using the H19 regulatory sequences. *Int J Clin Exp Med.* 2010;3(4):270-82.

94. Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, Yagi K. Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;75(2):213-7.

95. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol.* 1987;196(4):947-50.

96. Meazza R, Gaggero A, Neglia F, Basso S, Sforzini S, Pereno R, Azzarone B, Ferrini S. Expression of two interleukin-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides. *Eur J Immunol.* 1997;27(5):1049-54.

97. Abdel-Salam HA, El-Khamissy T, Enan GA, Hollenberg CP. Expression of mouse antiretin kinase (MAK33) monoclonal antibody in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56(1-2):157-64.

98. Hein MB, Tang Y, McLeod DA, Janda KD, Hiatt A. Evaluation of immunoglobulins from plant cells. *Biotechnol Prog.* 1991;7(5):455-61.

99. Zemel-Dreasen O, Zamir A. Secretion and processing of an immunoglobulin light chain in *Escherichia coli*. *Gene*. 1984;27(3):315-22.
100. Menzella HG. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2011;10:15
101. Rocha EP. Codon usage bias from tRNA's point of view: redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization. *Genome Res*. 2004;14(11):2279-86. Epub 2004 Oct 12.
102. Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, Nakatani T, Kikukawa M, Tsujinoue H, Mitoro A, Yamazaki M, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine in vitro is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res*. 1998;18(5A):3399-406.
103. Ishii-Morita H, Agbaria R, Mullen CA, Hirano H, Koeplin DA, Ram Z, Oldfield EH, Johns DG, Blaese RM. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther*. 1997;4(3):244-51.
104. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res*. 1991;51(6):1744-8.
105. Chakrabarti G, McClane BA. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiol*. 2005;7(1):129-46.
106. Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun*. 2003;71(8):4260-70.
105. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-16.
107. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99-109.
108. Wallace FM, Mach AS, Keller AM, Lindsay JA. Evidence for *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) inducing a mitogenic and cytokine response in vitro and a cytokine response. *Curr Microbiol* 1999;38(2): 96-100.
109. Gao Z, Xu X, McClane B, Zeng Q, Litkouhi B, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, Garner EI. C terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):1065-74.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

1. Publikation

Walther W, **Petkov S**, Kuvardina ON, Aumann J, Kobelt D, Fichtner I, Lemm M, Piontek J, Stein U, Schlag PM.
Novel *Clostridium perfringens* enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3 and -4 overexpressing tumors.
Gene Ther. in revision, 2011.

2. Kongressteilnahmen (Posterbeiträge)

Petkov S, Bölling O, Aumann J, Kobelt D, Stein U, Schlag PM, Walther W.
Tumor-specific suicide gene therapy using the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE).
18. European Student's Conference
Berlin, Germany 04. – 06. 10. 2009.
Eur. J. Med. Res. 14, Suppl. II: 139, 2009.

Petkov S, Bölling O, Aumann J, Kobelt D, Stein U, Schlag PM, Walther W.
Targeted cancer gene therapy by *clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) gene transfer.
XVII. Annual Meeting of the ESGCT
Hannover, Germany 21. – 25. 11. 2009
Human Gene Ther. 20: 1542-1543, 2009.

Petkov S, Bölling O, Kobelt D, Aumann J, Stein U, Schlag PM, Walther W.
Novel tumor-targeted suicide gene therapy employing the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE).
29. Deutscher Krebskongress
Berlin, Germany 24. – 27. 2. 2010
Onkologie 33, Suppl. 2: 148, 2010

Walther W, **Petkov S**, Bölling O, Kobelt D, Aumann J, Stein U, Schlag PM.
Novel approach for targeted cancer gene therapy using the *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE).
15th World Congress on Advances in Oncology & 13th International Symposium on Molecular Medicine
Loutraki, Greece 7. – 9. 10. 2010
Int. J. Mol. Med. 26, Suppl. 1: S40, 2010

ERKLÄRUNG

„Ich, Stoyan Petkov, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
“Der Einsatz des *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) für eine neuartige und selektive Suizidgentherapie Claudin-3 und -4 überexprimierender Tumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 15.08.2011

Unterschrift

DANKSAGUNG

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit durch ihre Begleitung und vielseitige Unterstützung beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. Wolfgang Walther und Frau Prof. Dr. Stein, die mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben und dadurch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. PD Wolfgang Walther für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojektes sowie für das Korrekturlesen und die Verbesserungsvorschläge.

Ich würde mich auch bei allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe bedanken, die mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich unterstützt haben, insbesondere gilt das für Jutta Aumann, Dennis Kobelt, Ulrike Sack, Andreas Pichorner, Mathias Dahlmann, Janice Smith, Pia Hermann, Felicitas Schmid, Andri Lederer, Katharina Ilm, Janine Radtke, Manisha Jeneja und Synthia Voss. Die vier Jahre Zusammenarbeit waren für mich eindeutig eine glückliche Zeit- nicht zuletzt aufgrund der angenehmen und kollegialen Atmosphäre.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern, meiner Freundin sowie allen meinen Verwandte und Freunde in Berlin danken. Sie haben mich grenzenlos unterstützt und auch in den schwierigen Zeiten motiviert.