

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung V
(Schwerpunkte: Kinderchirurgie, Kinderurologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. J. Fuchs**

**Adenovirus vermittelte in vitro Suizidgentherapie
des humanen Hepatoblastoms
mittels Cytosindesaminase/5-Fluorcytosin**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Heike Heigoldt geb. Buck

aus Bad Urach

2009

Dekan: **Professor Dr. I.B. Autenrieth**

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Warmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit!

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

S. W. Warmann, S. Armeanu S, H. Heigoldt, P. Ruck, R. Vonthein, H. Heitmann, G Seitz, ML Lemken, M. Bitzer, J. Fuchs, UM Lauer.

Adenovirus-mediated cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy of human hepatoblastoma in vitro

Pediatr Blood Cancer. 2009 Aug;53(2):145-51.

S. W. Warmann, S. Armeanu, H. Frank, H. Buck, F. Graepler, M-L. Lemken, H. Heitmann, G. Seitz, U. M. Lauer, M. Bitzer, J. Fuchs;

In vitro gene targeting in human hepatoplastoma.

Pediatric Surg Int. 2006 ; 22(1):16-23.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 DAS HEPATOBLASTOM	4
1.1.1 Epidemiologie.....	4
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	5
1.1.3 Subtypen des Hepatoblastoms.....	6
1.1.4 Klinik und Diagnose.....	7
1.1.5 Tumorstagingssysteme.....	8
1.1.6 Therapie und Prognose.....	10
1.1.7 Grundlagenforschung.....	13
1.1.8 Resistenzmechanismen beim Hepatoblastom.....	14
1.2 DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM (HCC)	15
1.2.1 Epidemiologie.....	15
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese.....	16
1.2.3 Hepatozelluläres Karzinom bei Kindern.....	16
1.3 GENTHERAPIE UND GENTRANSFERSYSTEME	18
1.4 SUIZIDGENTHERAPIE	23
1.4.1 Cytosindesaminase.....	25
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
3 METHODEN	28
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	28
3.1.1 Zelllinien.....	28
3.1.1.1 HepT1.....	28
3.1.1.2 HepT3.....	30
3.1.1.3 HUH6.....	31
3.1.1.4 HepG2.....	32
3.1.2 Zellkultur.....	33
3.1.2.1 Allgemeines.....	33
3.1.2.2 Auftauen von Zellen.....	34
3.1.2.3 Kryokonservierung von Zellen.....	34
3.1.2.4 Zellzählung mit Hämocytometer Neubauer.....	34
3.1.3 Zytochemie Hämatoxilin-Eosin- Färbung.....	35

3.2	VIROLOGISCHE METHODEN	36
3.2.1	Adenoviren.....	36
3.2.2	Rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren	39
3.2.3	Transduktion mit replikationsdefizienten Adenoviren.....	41
3.3	VERWENDETE ZYTOSTATIKA	42
3.3.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	44
3.3.2	5-Fluorcytosin (5-FC).....	45
3.4	INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ (NACHWEIS ADENOVIRUSHEXONPROTEIN) ...	46
3.5	TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ MIT ADGFP (FACS)	47
3.6	NACHWEIS SUPERCD-PROTEIN (WESTERN BLOT)	49
3.6.1	Kultivierung der Lysate	49
3.6.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	50
3.6.3	Western Blotting	54
3.6.4	ECL-Detektionssystem	56
3.7	BESTIMMUNG IC 50 5-FU	58
3.7.1	Proliferationstest MTT-Assay	58
3.8	TRANSDUKTION ADVSCD/ADVGFPP MIT 5-FC/5-FU-THERAPIE	61
3.9	PROMOTORASSAY HUH6	65
3.10	STATISTISCHE ANALYSE	66
3.10.1	Rechenmodell der nicht-linearen Regression	66
4	ERGEBNISSE	69
4.1	NACHWEIS DER ADENOVIRUSTRANSDUKTION (IMMUNFLUORESZENZ)	69
4.1.1	AdvGFP – Kontrolle	70
4.1.2	AdSuperCD.....	73
4.1.3	Zusammenfassung Immunfluoreszenz	75
4.2	TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ (FACS)	75
4.3	WESTERN BLOT –NACHWEIS SUPERCD-PROTEIN	77
4.4	QUANTIFIZIERUNG DES SUIZIDGENEFFEKTES	78
4.4.1	Einfluss der adenoviralen Transduktion auf die Zellvitalität	78
4.4.2	Wirkung des Zytostatikum 5-Fluorouracil.....	80
4.4.2.1	Wirkung von 5-FU auf nicht-transduzierte Zellen	80
4.4.2.2	Wirkung von 5-FU auf Zellen nach Transduktion mit AdGFP	81
4.4.2.3	Wirkung von 5-FU auf Zellen nach Transduktion mit AdSuperCD	81
4.4.2.4	Graphische Darstellung 5-FU	82
4.4.2.5	Zusammenfassung - Wirkung von 5-Fluorouracil	83
4.4.3	Wirkung des Prodrug 5-Fluorcytosin.....	84
4.4.3.1	Graphische Darstellung 5-FC	85
4.4.3.2	Zusammenfassung Wirkung 5-Fluorcytosin.....	87
4.5	PROMOTORASSAY HUH6	88

5 DISKUSSION	91
5.1 ALLGEMEINES.....	91
5.2 ADENOVIRUSTRANSDUKTION - QUALITATIV UND QUANTITATIV	93
5.3 NACHWEIS DES SUPERCD-PROTEINS IM WESTERN BLOT	94
5.4 FUNKTIONALITÄT DES SUIZIDGENEFFEKTES	95
5.4.1 Adenoviraler Einfluss	95
5.4.2 Wirkung des Zytostatikum 5-Fluorouracil.....	97
5.4.3 Wirkung des Prodrugs 5-Fluorcytosin.....	99
5.5 PROMOTORASSAY HUH6	102
5.6 AUSBLICK.....	104
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	108
7 LITERATURVERZEICHNIS	110
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
9 ANHANG	127
9.1 MATERIAL	127
9.1.1 Zellkultur	127
9.1.2 HE-Färbung	129
9.1.3 Virustransduktion	130
9.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz.....	131
9.1.5 FACS	132
9.1.6 Western Blotting	133
9.1.7 Proliferationsassay 5-FU.....	136
9.1.8 Proliferationsassay 5-FU/FC.....	138
9.1.9 Promotorassay HUH6.....	139
9.2 ANHANG PROLIFERATIONSTESTS	141
9.2.1 Graphische Darstellung HepT3 5-FU.....	141
9.2.2 IC50 5-FC Einzelwerte Versuche I-III.....	142
9.2.3 Graphische Darstellung HepT3 5-FC.....	142
9.2.4 Rohdaten der MTT-Versuche	143
DANKSAGUNG	159
LEBENS LAUF	160

1 Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

Das Hepatoblastom (HB) gehört zu den am häufigsten im Kindesalter vorkommenden malignen Leberzelltumoren [1]. Vor 110 Jahren wurde der erste Fallbericht eines Hepatoblastoms von Misick als „teratoma hepatis“ veröffentlicht [2]. Misick bezeichnete das HB als Teratoma, da es nach seiner Beurteilung von allen drei Keimblättern Gewebsanteile aufwies. Diese erste Beschreibung zeigte schon damals die Vielfältigkeit dieses Tumortyps. Heute gibt es eine Vielzahl von Klassifikationen und Stagingssystemen zur Charakterisierung und Einteilung des HB. Die Ätiologie des HB ist weitgehend unklar. Anhand zytogenetischer Veränderungen, phänotypischer Merkmale und biologischer Aspekte kann das HB charakterisiert werden und in zunehmendem Maße kann die Pathogenese verstanden und erklärt werden. Zum momentanen Zeitpunkt geht die Grundlagenforschung zum HB von einer Genese aus pluripotenten Stammzellen aus. Bisher konnte ein breites Spektrum epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsmuster beim HB beschrieben werden.

Die Therapie des HB basiert auf kompletter chirurgischer Resektion mit additiver Chemotherapie in Anlehnung an aktuelle Studienprotokolle. Für die Verbesserung der Prognose fortgeschrittener HB und Rezidive werden neue Therapiealternativen in vitro und in vivo untersucht.

1.1.1 Epidemiologie

Unter allen malignen Erkrankungen im frühen Kindesalter haben primäre Lebermalignome einen Anteil von 0,8-1,0%. Die epithelialen Tumoren haben dabei einen Anteil von 90%, mit Überwiegen des HB [1,3], welches mit einer Inzidenz von 0,7-1 pro 1 Million Kinder unter 15 Jahren auftritt. Das HB liegt an vierter Stelle unter den Abdominaltumoren nach dem Neuroblastom, dem Wilmstumor und dem Non-Hodgkin-Lymphom [4].

Die meisten Kinder sind zum Zeitpunkt der Diagnose im Alter zwischen 6 Monaten und 3 Jahren [5] bei einer Prädisposition für Jungen mit 2,5 - 1.5 : 1 [6,20]. In einzelnen Fällen wird ein HB bereits zum Zeitpunkt der Geburt diagnostiziert [7].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das HB tritt in der Regel sporadisch auf. Eine erhöhte Insidenz wird bei Patienten mit Wiedemann-Beckwith-Syndrom und familiärer adenomatöse Polyposis (FAP) beobachtet. Bei Frühgeborenen und bei sehr geringem Geburtsgewicht besteht ebenfalls eine erhöhte Insidenz für das HB [8,9]. Zytokinetische Untersuchungen des HB zeigen häufig genetische Veränderungen auf den Chromosomen 1q, 2q, 8, 17q und 20 sowie Trisomien auf den Chromosomen 2, 8 und 20 [7,10,11,12]. Molekulargenetisch können bei ca. einem Drittel der HB ein „loss of heterozygosity“ (LOH) auf den Chromosomarmen 1p und 1q nachgewiesen werden, bei ca. 25% ein stets maternales LOH bei 11p15.5 [13,[14]. Auf diesen Chromosomenabschnitten werden potentielle Tumorsuppressorgene für das HB vermutet, deren Rolle und prognostische Aussagekraft bis heute noch nicht exakt erklärt ist [15,16].

Beim sporadischen Auftreten des HB wird in bis zu 48% eine Mutation im β -Catenin-Gen gefunden [15], welches eine zentrale Rolle im Wnt Signalweg („wingless pathway“) spielt und Komplexe mit dem Produkt des APC-Tumorsuppressorgen bildet. Es ist möglich, dass diese Alteration bei der Entstehung des HB beteiligt ist [17].

Ebenfalls wird derzeit untersucht, welche Rolle unterschiedliche Stammzelltypen in der Histogenese des Tumors spielen [18,19].

1.1.3 Subtypen des Hepatoblastoms

Das HB wird heutzutage basierend auf der histologischen Klassifikation von Ishak und Glunz [20] eingeteilt, welche zwei morphologische Typen unterscheidet: den rein epithelialen HB-Typ und den mixed HB-Typ.

Der epitheliale Typ wird je nach Ausdifferenzierungsgrad der Zellen in embryonal und fetal unterteilt. In manchen Fällen sind beide Zelltypen, embryonal und fetal, vorhanden. Die embryonalen Anteile stellen hierbei die geringer differenzierten Zellen dar. Es handelt sich hierbei um kleine spindelförmige Zellen, die sich rosetten- und strangförmig anordnen. Sie weisen viele Mitosen auf, und es besteht ein hohes Kern-Plasmaverhältnis [6,20,21].

Der fetale Subtyp besteht aus höher differenzierten Zellen als der embryonale Typ. Sie sind schmaler als normale Hepatocyten und ordnen sich mehrschichtig trabekulär in Platten an. Im Tumorgewebe sind Lebersinusoiden und Gallengänge vorhanden und zwischen den Tumortrabekeln kann es zur extramedullären Blutbildung kommen. Das Kern-Plasmaverhältnis ist klein, der Zellkern ist nur wenig vergrößert und zeigt wenig Pleomorphismen. Das Cytoplasma enthält reichlich Lipide und/oder Glycogen. Die Mitoserate des fetalen Typs ist sehr gering [5,6,21,22,23].

Der mixed HB Typ enthält neben epithelialen Anteilen mesenchymales Stroma wie Osteoid, Kollagenfasern, selten Knorpel- und Skelettmuskelzellen [6,20,21]. Ein weiterer Subtyp ist das kleinzellig-anaplastische HB [24]. Die Zellen dieses Typs sind klein, meist rund und undifferenziert, ohne Ähnlichkeit zu reifen Leberzellen. Dieser Tumor infiltriert häufig in die Gallengänge und in die angrenzenden Hepatocyten und spricht nur sehr schlecht auf Chemotherapie an. Für das kleinzellig-anaplastische HB wird daher eine ungünstige Prognose angenommen [24,21,25].

Zeitweise wurde die Klassifikation von Kasai und Watanabe [26] verwendet. Die Einteilung dieser Klassifikation beruht auf dem Differenzierungsgrad der HB-Zellen. Es werden vier histologische Subtypen unterschieden: der adulte Typ, der anaplastische Typ, der embryonale Typ und der fetale Typ.

Tumorzellen des adulten Typs wurden ausschließlich bei Kindern älter als 6 Jahre gefunden und die Morphologie zeigte keine bedeutenden Unterschiede zu den Tumorzellen eines adulten Hepatozellulären Carcinoms. Die großen zellplasmareichen, gut differenzierten Tumorzellen ordnen sich in trabekulären Mustern an.

Die Tumorzellen des anaplastischen Typs sind sehr kleine, schmale, zytoplasmaarme Zellen mit dicht stehenden Zellkernen von geringem Differenzierungsgrad.

Am wenigsten sind die Zellen des embryonalen Typs differenziert, die sich durch ihre azinäre und pseudorosettenartige Anordnung charakterisieren.

Zellen des fetalen Typs ähneln normalen Hepatocyten und sind hoch differenziert. Sie zeigen nur wenig Mitosen und ordnen sich in zwei oder drei Zellschichten dicken Tumorsträngen an, ohne eine Läppchenstruktur auszubilden.

Von Gonzalez-Crussi et al. [27] wurde der makrotrabekuläre Subtyp hinzugefügt, der Ähnlichkeiten zum adulten HCC aufweist und sich durch seine trabekuläre Anordnung mit einer Dicke von 10-20 Zellschichten charakterisiert.

Eine Aussage zur Prognose hinsichtlich des histologischen Subtyps kann derzeit noch nicht eindeutig gemacht werden. Es wird kontrovers diskutiert, ob der rein histologische fetale Typ mit einer günstigeren Prognose einhergeht und/oder ein HB vom kleinzellig-anaplastischen Typ die schlechteste Prognose unter allen histologischen HB-Subtypen aufweist [5,6,20,21,23,24,26,28,29, 30,31].

1.1.4 Klinik und Diagnose

Die Kinder fallen durch ein stark aufgetriebenes Abdomen verbunden mit einem tastbaren Tumor im Ober-/Mittelbauch auf. Uncharakteristische Symptome wie Blässe, Müdigkeit, Bauchschmerzen, Gewichtsverlust können als Begleitsymptome auftreten. Ein Ikterus tritt nur in sehr seltenen Fällen auf [3,32].

Die Diagnostik gliedert sich in 2 Gruppen: Labor- und die bildgebende Diagnostik. Bei der Labordiagnostik werden die Transaminasen und das α -Fetoprotein

(AFP)¹ als Tumormarker bestimmt, welches in 2/3 der Fälle erhöht ist und auch zur Verlaufsbeobachtung dient [3,32]. Bei der Interpretation des AFP ist darauf zu achten, dass es bei gesunden Neugeborenen bis zum Alter von 6 Monaten in der Regel erhöht ist. Das AFP kann ebenfalls durch andere Tumoren, Lebertraumen oder während Regenerationsvorgängen in der Leber leicht erhöht sein [7].

Das HB ist häufig im rechten Leberlappen lokalisiert und weist meist fokale Herde auf, welche von Nekrosen und einer Pseudokapsel umgeben sind [6]. Diese Tumoren haben eine bessere Prognose als HBs mit multifokalem Wachstumsmuster, die eher dazu neigen, in angrenzende Organe und Gefäße zu infiltrieren und Fernmetastasen auszubilden, vor allem in die Lunge, seltener ins ZNS, Rückenmark und Milz [33].

1.1.5 Tumorstagingssysteme

Derzeit werden verschiedene Stagingssysteme des HB in den einzelnen Studien verwendet. In den Lebertumorstudien der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie wird das postoperative Stagingssystem der GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) verwendet [25]. Dieses System unterteilt die vier Stadien der Tabelle I:

Stadieneinteilung GPOH

Stadium I	Tumor komplett reseziert (auch mikroskopisch)
Stadium II	Tumor reseziert, mikroskopischer Resttumor, A: mikroskopischer Resttumor in der Leber B: extrahepatischer mikroskopischer Resttumor
Stadium III	makroskopischer Resttumor +/- Lymphknotenbefall, +/- Ruptur mit Tumorspilling A: Tumor komplett reseziert, Lymphknotenbefall +/- Ruptur B: makroskopischer Tumorrest +/- Lymphknotenbefall
Stadium IV	Fernmetastasen bei Diagnosestellung

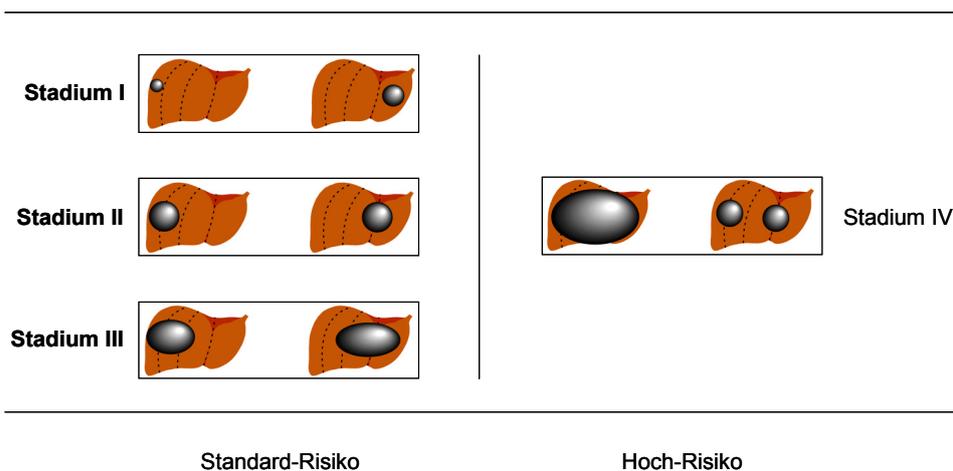
Tabelle I Stadieneinteilung der GPOH [25]

¹ Das AFP ist ein Produkt des embryonalen Entoderm.

Die International Society of Paediatric Oncology (SIOP) hat für ihre Lebertumorstudie SIOPEL 1 das präoperative Stagingssystem PRETEXT (Pre Treatment Extent of Disease) etabliert, dessen Einteilung in die Stadien I – IV sich auf die Leberanatomie bezieht und diese in die vier Sektoren, anterior und posterior im rechten Leberlappen und medial und lateral im linken Leberlappen, unterteilt. Die Stadieneinteilung basiert rein auf radiologischer Bildgebung mittels Abdomensonographie, CT und MRT zum Zeitpunkt der Diagnose und ermöglicht die Erfassung der Tumorausdehnung auf die einzelnen Sektoren vor einer therapeutischen Intervention und auch während der Therapie. Die Anzahl der betroffenen Sektoren ist maßgebend für die Stadieneinteilung I-IV.

Die Abb. 1 veranschaulicht die PRETEXT Stadieneinteilung [41,44,48].

Pre Treatment Extent of Disease



Aronson et al., J Clin Oncol., 2005

Abb. 1 Stadieneinteilung PRETEXT nach Aronson et al. [41]

In der Lebertumorstudie SIOPEL 1 wurde die Genauigkeit und Beobachtungsgleichheit des PRETEXT Stagingystems analysiert und die präoperative Einstufung mit den aktuell verwendeten Stagingssystemen u.a. auch dem Stagingssystem der GPOH verglichen. Dabei ergab sich für das PRETEXT Stagingssystem eine begrenzte Genauigkeit mit der Tendenz zum Overstaging von Patienten. In der Analyse ist die PRETEXT Stadieneinteilung bei voneinander unabhängigen Untersuchern gut reproduzierbar. Im Bezug auf die Vorhersage der

Überlebensrate zeigt PRETEXT gute Resultate und ermöglicht es, den Effekt einer neoadjuvanten Therapie zu überwachen. Aus diesen Gründen der Vergleichbarkeit werden alle HB-Patienten, die im Rahmen von Studien therapiert werden, ebenfalls nach dem PRETEXT Stagingssystem eingestuft [41].

1.1.6 Therapie und Prognose

Vor über 40 Jahren war die Prognose des HB infaust. Ishak und Glunz berichteten 1967 über 3 Therapiekonzepte: symptomatische Behandlung, Bestrahlungstherapie mit oder ohne Zytostatikaeinsatz und chirurgische Resektion [20]. Die längste Lebenserwartung wurde unter der chirurgischen Therapie im Mittel mit 10,8 Monaten (Range: 1- 34 Monate) erreicht. In Exelby's Surgical Survey 1974 werden chirurgische Resektion, Chemotherapie (Kombination aus Vincristin, Actinomycin, Cyclophosphamid) und Radiotherapie in Kombination zur Therapie des HB eingesetzt [32]. Unter chirurgischer Vollresektion des Tumors war die Lebenserwartung am längsten, jedoch starben viele Patienten an den Komplikationen der Operation.

In den 80iger und 90iger Jahren wurden die Überlebenschance für Kinder mit HB auf bis zu 67% aufgrund verbesserter chirurgischer Therapie und des Einsatzes von neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie mit PLADO (Cisplatin und Doxorubicin) verbessert [34].

Seit Ende der 80iger und mit Beginn der 90iger Jahren wurden mehrere Studienprotokolle erstellt. Darunter die beiden amerikanischen Studien CCG 823F und POG 8697, in denen sich die Kombination von Cisplatin und/oder Doxorubicin, Vincristin, 5-Fluorouracil und Etoposid als effektiv erwies [35,36,37,38].

In der multizentrischen Lebertumorstudie HB89 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie wurden zunächst alle Patienten laparotomiert, ausgenommen Säuglinge und Patienten mit bereits sehr stark erhöhtem Serum-AFP. Dabei wurden die Tumore gemäß dem postoperativen Stagingssystem der GPOH (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) in die Stadien I –IV eingeteilt (vgl. 1.1.5) [25].

In der Lebertumorstudie HB89 wurden Tumore reseziert, die sich nur auf einen Leberlappen beschränkten, ausgedehntere HB wurden biopsiert. Anschließend erhielten die Patienten eine Chemotherapie mit IPA (Ifosfamid, Cisplatin und Doxorubicin), um entweder einem Rezidiv vorzubeugen bzw. die Zellvitalität zu verringern. In einigen Fällen konnte mit mehr als 4 Zyklen der IPA keine Reduktion des Tumors und des AFP - Serumwertes erreicht werden. Dies wurde als Entwicklung einer Therapieresistenz gewertet [22,39].

In der nachfolgenden Lebertumorstudie HB94 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie wurde die Anzahl der IPA-Zyklen auf maximal drei reduziert. Bei Auftreten eines Rezidiv wurde Etoposid und Carboplatin als Chemotherapeutikum eingesetzt [33]. Für Tumoren im Stadium II und IV verbesserte sich die Prognose für das DFS (engl.: disease free survival, dt.: Wahrscheinlichkeit für das tumorfreie Überleben) deutlich (vgl. Tabelle II).

Disease free survival HB89 und HB94

Stadium	HB 89	HB94
I	100%	96%
II	50%	100%
III	71%	76%
IV	29%	36%

Tabelle II DFS Werte HB89, HB94 in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium [33,39]

Zur Zeit werden Kinder in Deutschland mit HB und Hepatozellulärem Karzinom (HCC) nach dem Protokoll der Lebertumorstudie HB99 der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie behandelt. Diese Studie hat zum Ziel, das Gesamtüberleben von Kindern im Stadium III und IV zu verbessern. Dies soll durch Kombination von aggressiven Operationsverfahren wie Leberresektion, Lebertransplantation, Resektion von Fernmetastasen und dem primären Einsatz von Etoposid (VP16) und Carboplatin (CARBO) in dafür spezialisierten Zentren erreicht werden. Zusätzlich soll bei Hoch-Risiko-Tumoren durch periphere Stammzellsammlung eine Hochdosistherapie mit diesen beiden Zytostatika möglich sein. Tumoren des Stadium I und II werden anlehnend an die HB94 therapiert.

Die Stadieneinteilung erfolgt in dieser Studie gemäß der GPOH wie in der HB89 und anhand in den US-amerikanischen Studien (SIOPEL) gebräuchliche präoperativen PRETEXT Stadieneinteilung (vgl. 1.1.5) [40,41].

Die bisherigen Ergebnisse aus der HB99 zeigen ein zufriedenstellendes Ansprechen der fortgeschrittenen metastasierten Tumore auf die Hochdosis-Chemotherapie mit Etoposid und Carboplatin [42].

Als Therapieoption für nicht-resektable HB-Tumoren (PRETEXT III und IV) findet die Lebertransplantation in zunehmendem Maße Anwendung. Bei Kombination mit Chemotherapie werden hierbei erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt. Betrug das DFS noch 36% im Stadium IV in der Lebertumorstudie HB94, kann durch primäre Lebertransplantation ein DFS von 80-90% im Stadium IV nach PRETEXT erreicht werden. Als chirurgische Option stellt die Lebertransplantation derzeit einen der wichtigsten Beiträge zur Verbesserung der Ergebnisse des fortgeschrittenen HBs dar [39,43,44,45,46].

Zusammenfassend ist die chirurgische Radikalität, wie bereits vor 40 Jahren Ishak und Glunz [20] berichten, der wichtigste prognostische Faktor in der Behandlung des HB [33,22,39,39,47,48]. Die Rolle der Chemotherapie ist, den Tumor operabel zu machen und Rezidive zu verhindern, wobei zu beachten ist, dass die HB Resistenzmechanismen entwickeln können [22]. Es ist zu erwarten, dass in den folgenden Jahren die Bedeutung der Lebertransplantation in der Behandlung des HB eine immer wichtigere Rolle spielen wird [49].

Im Hinblick auf die Prognose sind folgende Faktoren von Bedeutung: Wachstumsmuster des Tumors, Gefäßinvasion, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen.

Der AFP-Serumwert zeigt zwar keine statistische Korrelation zum Outcome. Es besteht jedoch die Tendenz, dass Patienten mit niedrigen (<100 ng/ml) und sehr hohen AFP-Werten (>1 000 000 ng/ml) eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit intermediären Werten [5,50].

1.1.7 Grundlagenforschung

Die HB werden in der Grundlagenforschung mit dem Ziel untersucht, die Tumoreigenschaften und das biologische Verhalten des HB besser zu verstehen und anhand neuer Kenntnisse die Therapieoptionen zu verbessern. Es wurden bisher zwei kontinuierliche Zelllinien HepT1 (embryonaler HB-Typ) und HUH6 (mixed B-Typ) sowie ein Tiermodell an immundefizienten Nacktmäusen etabliert [51,98,99].

Zur Klärung der Histogenese des HB wurde anhand der Immunhistochemie, der Elektronenmikroskopie und der Immunelektronenmikroskopie das Vorhandensein von Stammzellen im Tumorgewebe untersucht [18,19].

Weitere Untersuchungen beschäftigen sich u.a. mit der Analyse der immunhistochemischen und molekulargenetischen Faktoren sowie mit der Analyse proliferationsfördernder Zytokine des HB [16]. Die zytogenetischen Untersuchungen zeigen genetische Veränderungen häufig auf den Chromosomen 1q, 2q, 8, 17q und 20 (vgl. 1.1.2). Anhand „high-density genome-wide single-nucleotide polymorphism (SNP)“ Microarray-Analysen spezifiziert Suzuki et al. [12] diese Veränderungen und identifiziert weitere chromosomale Veränderungen. Die Chromosomen 1q, 2q, 8, 17q und 20 zeigen häufig Zugewinne an genetischem Material, wohingegen auf den Chromosomen 4q und 11q häufig genetisches Material fehlt. Hochgradige Veränderungen zeigen dagegen die Chromosomenabschnitte 7q43, 11q22.2 und 14q11.2. Des Weiteren finden sich verschiedene Deletionstypen außer der homozygoten Deletion sowie ein „loss of heterozygosity“ (LOH) bei 11p15.5 [11,12].

Bisher gibt es jedoch noch keine Korrelation zwischen dem Grad der genetischen Alteration und klinischen Merkmalen und Prognose des HB.

Des Weiteren wird die Wirksamkeit der in Studien verwendeten Zytostatika in Zellkulturen und im Tiermodell untersucht und das resultierende biologische Verhalten des Tumors analysiert [54,55,57,58].

Neben dem α -Fetoprotein werden als weitere Tumormarker für das HB das „polyclonal anticarcinoembryonic“ (CEA), das „hepatocyte paraffin 1“ (Hep Par 1) und das Glypican 3 (GPC3) diskutiert und immunhistochemisch untersucht [52,53].

1.1.8 Resistenzmechanismen beim Hepatoblastom

Fortgeschrittene HB im Stadium III und IV und rezidivierende HB entwickeln in erhöhtem Maß eine „Multi-Drug-Resistance“ (MDR), welche sich unter anderem in einem Anstieg des Serum - AFP unter Chemotherapie zeigen kann [22,25]. Die Entwicklung der „Multi-Drug-Resistance“ war und ist eines der Hauptprobleme in der Therapie der HB. Bei Untersuchungen am HB in vitro, in vivo an einem Mausmodell sowie an Patientenproben zeigte sich eine gesteigerte Expression des MDR-1-Gens unter Chemotherapie. Das Genprodukt des MDR-1 Gen ist das p-Glykoprotein, ein Tunnelprotein der Membran, welches zur Gruppe der ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporter) gehört und unter ATP-Verbrauch Zytostatika aktiv aus der Zelle transportiert [54,55,56, 57,58].

Der MDR-Modulator PSC 833, der durch Inhibition des p-Glykoproteins die Chemosensitivität des Tumors erhöht, zeigte bei in vitro und in vivo Untersuchungen eine Steigerung der Effizienz der herkömmlichen Chemotherapie. Die differenzierten HB sprachen in vitro am besten auf diese Therapie an [55,56,57,58]. Bisher gab es noch keine klinische Anwendung von p-Glykoproteinmodulatoren in der Therapie des HB. Bei klinischer Anwendung bei anderen Tumoren zeigten sich diskrepante Ergebnisse, die weitere Untersuchungen zum p-Glykoprotein nach sich zogen [59].

Weitere experimentelle Studien konnten zeigen, dass für die Entwicklung einer „Multi-Drug-Resistance“ beim HB unter Chemotherapie außer dem p-Glykoprotein weitere Resistenzmechanismen, wie Topoisomerase II alpha (TOPO II α) und Gluthation-S-Transferase μ (GST μ) eine Rolle spielen [54,59]. Ein weiterer möglicher Mechanismus für die „Multi-Drug-Resistance“ ist das bcl2-Gen, welches unter Chemotherapie bei verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert wird und folgend den Zelltod durch seine antiapoptotische Wirkung verhindert [60]. In einer in vitro Studie konnte durch Ausschalten des bcl2 Gens unter Verwendung von bcl2 siRNA (small interfering RNA) ein verbessertes Ansprechen auf die Zytostatikatherapie gezeigt werden [61]. Bei der siRNA Tech-

nologie wird die Expression eines Gens durch die Zerstörung der zugehörigen mRNA verhindert [62].

Die Resistenzentwicklung beim HB gegenüber den Zytostatika limitiert deren Anwendung aufgrund der potentiellen Nebenwirkungen - Kardiotoxizität, Nephrotoxizität, Ototoxizität und Knochenmarksdepression.

Zur weiteren Verbesserung der Therapie-Ergebnisse fortgeschrittener HB ist daher die Entwicklung weiterer Therapiealternativen für das HB essentiell.

Untersuchungen am HCC in vitro und in vivo zeigten unter der Therapiestrategie „suicide gene therapeutic approach“ vielversprechende Ergebnisse [63,64].

Bei diesem Zweig der Gentherapie wird ein selektives Absterben der Tumorzellen erreicht, indem ein sog. Suizid-Gen durch einen Vektor in die Zelle geschleust wird, welches membranpermeable, nicht toxische Substanzen (sog. Prodrug) in toxische Metabolite (Suizid-Drug) umwandeln kann. Dieser Effekt beschränkt sich allein auf die Tumorzellen, wodurch eine systemische toxische Wirkung ausgeschlossen wird.

1.2 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) hat bei Erwachsenen einen Anteil von 80% bei den primären malignen Lebertumoren. Es ist der fünfthäufigste Tumor sowie weltweit die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache [65,66].

1.2.1 Epidemiologie

Das epidemiologische Vorkommen des HCC weist geographische Unterschiede auf. In Europa und in Nordamerika tritt es relativ selten, vor allem im fünften und sechsten Lebensjahrzehnt, mit einer Prädisposition für Männer mit $m:w = 3:1$, und einer Insidenz von 5:100 000 Einwohner pro Jahr auf. In den Tropen (Afrika, Asien, besonders China) ist das HCC der am häufigsten vorkommende maligne Tumor unter Männern mit einer Insidenz bis zu 150:100 000 pro Jahr und einem Erkrankungsgipfel zwischen dem dritten und vierten Lebensjahrzehnt [67].

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des HCC ist vielfältig. In ca. 80% der Fälle entsteht das HCC bei Patienten mit Leberzirrhose jeglicher Genese. Das größte Risiko besteht für Patienten mit einer Leberzirrhose, die auf dem Boden einer chronischen Hepatitis B, Hepatitis C oder Hämatochromatose entstanden ist. Den Zusammenhang zwischen HBV-Infektion und vermehrtem Auftreten von HCC zeigen epidemiologische Studien [68.] Ebenfalls ein hohes Risiko haben Patienten mit neonataler Hepatitis-B-Virus-Infektion. Ein mittleres Risiko, ein HCC zu entwickeln, besteht für Patienten mit alkoholinduzierter Zirrhose, α_1 -Antitrypsinmangel oder Autoimmunhepatitis. Patienten mit Morbus Wilson, primär biliärer Zirrhose oder primär sklerosierender Cholangitis haben ein geringes Risiko, ein HCC zu entwickeln. Seltener Ursachen sind Aflatoxine des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, der u.a. Nüsse, Weizen, Reis und Sojabohnen befällt, und das früher verwendete radioaktive Röntgenkontrastmittel Thorotrast. Sekundäre Risikofaktoren sind das männliche Geschlecht, Alter und Zigarettenkonsum [67,69].

Die Pathogenese des HCC ist nicht vollständig geklärt, und man geht von einem komplexen mehrstufigen Geschehen („multistep carcinogenesis“) analog zu anderen Tumorentitäten mit epigenetischen, genetischen und zellulären Veränderungen aus. Die einzelnen Schritte der „multistep carcinogenesis“ sind: eine chronische Leberschädigung (HBV, HCV, chronischer Alkoholabusus) mit folgendem chronischen Inflammationsprozess, der zur Destruktion des Leberparenchyms führt. Dadurch werden die Hepatozyten zur Regeneration ange-regt, es kommt zum „Remodeling“ der Lebermatrix mit folgender Fibrose, die in eine Leberzirrhose mündet. Auf dem Boden der Leberzirrhose kommt es zur Hyperplasie und Dysplasie und schließlich zum HCC [70].

1.2.3 Hepatozelluläres Karzinom bei Kindern

Bei Kindern und Jugendlichen ist das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) sehr selten. Es macht nur 0,5% aller pädiatrischen Tumoren aus, jedoch ist es der zweithäufigste Lebertumor bei Kindern nach dem HB mit einer Insidenz von 0,5-1 pro 1 Million Fälle [71]. In den meisten Fällen sind die Kinder älter als 5 Jahre

[6]. Hepatomegalie und damit verbundene abdominelle Schmerzen sind die klassischen Symptome. In den meisten Fällen liegt der fibrolamelläre Typ vor. In nur 40 % der Fälle liegt ein erhöhtes AFP und bei 25% ein erhöhtes Bilirubin vor [32]. Anders als beim HB entsteht das HCC in ca. 33% der Fälle aufgrund einer vorbestehenden Lebererkrankung, wie angeborene Stoffwechselstörung (Tyrosinämie), Hepatitis-B-Infektion, seltener Leberzirrhose [71]. Die Therapie setzt sich wie beim HB aus möglichst kompletter Tumorresektion kombiniert mit neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie zusammen. Die Prognose des HCC bei Kindern verglichen mit der Prognose des HBs ist weitaus schlechter. Bei der SIOPEL 1 Studie war die 5 - Jahresüberlebensrate für HCC bei Kindern 52% versus 92% bei HB [71].

Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, inwiefern sich das HCC des Erwachsenen vom HCC des Kindes unterscheidet bzw. gleicht. Man geht jedoch von Unterschieden hinsichtlich der Tumorbilogie und der Entstehung aus. In der SIOPEL 1 Studie hatten nur 38% der Patienten eine zugrundeliegende Lebererkrankung, wohingegen bei Erwachsenen mit HCC in 70-90% eine Leberzirrhose vorliegt. In Zukunft sollten durch weltweite Zusammenarbeit und international ausgelegte multizentrische Studien neue Erkenntnisse über das HCC bei Kindern gewonnen werden, um dadurch die Therapie-Ergebnisse zu verbessern [72,71].

Die Erfahrungen der letzten 20 Jahren zeigen, dass die Therapieergebnisse für fortgeschrittene HB und HCC stagnieren. Für diese beiden Entitäten sind alternative Therapie-Optionen notwendig. Bei andern Tumoren wurden verschiedene Konzepte verfolgt. Zu diesen alternativen neuen Therapie-Optionen zählen auch die Gentherapie-gerichteten Verfahren.

1.3 Gentherapie und Gentransfersysteme

Die Geburtsstunde der Gentechnologie liegt im Jahr 1973, als es den beiden amerikanischen Wissenschaftlern Stanley Cohen und Herbert Boyer erstmals gelang, mittels eines Plasmids ein Gen von einem Organismus in einen anderen zu übertragen. Damals war noch nicht abzusehen, welchen Verlauf diese Erkenntnis nehmen würde. Heute ist das Schlagwort Gentherapie ein wichtiger Forschungsansatz in der Medizin und Pharmazie.

Die Gentherapie ist definiert als das Einbringen von Genen (Transgene) in Zellen oder Gewebe mit dem Ziel, durch Expression und Funktion einen therapeutischen oder präventiven Nutzen für den Organismus zu erzielen. Das Einbringen dieser Transgene in die Zellen wird als Gentransfer bezeichnet. Dafür müssen die gewünschten Transgene in einen Vehikel (Vektor) verpackt werden.

Man unterscheidet die somatische Gentherapie, bei der Körperzellen, die nicht an der Reproduktion des Individuums beteiligt sind gezielt genetisch verändert werden, von der Keimbahntherapie, bei der gezielt Keimzellen genetisch verändert werden. Die Keimbahntherapie ist in Deutschland gesetzlich verboten.

Bei der somatischen Gentherapie werden zwei Strategien unterschieden: die ex vivo (in vitro) und die in vivo Gentherapie. Bei der ex vivo Gentherapie werden die Zielzellen (Tumorzellen, hämatopoetische Stammzellen) aus dem Organismus isoliert und nach Transduktion mit dem gewünschten Gen in Zellkultur erfolgt die Reimplantation in den Organismus. Bei der in vivo Behandlung wird das gesunde Gen direkt in die von der Krankheit betroffenen Körperzellen (z.B. Leberzelle, Lungenzelle) eingeführt. Dies kann durch systemische Applikation des Vektors oder durch direkte Injektion in die betroffenen Körperzellen erreicht werden [73,74,75,104,86].

Die Vektoren werden in virale Vektoren und nicht-virale Vektoren eingeteilt.

Zu den nicht-viralen Transfermethoden zählen u.a. die Plasmidtransfektion, die Liposomentransfektion, Komplexierung der DNA mit Calciumphosphat, die Elektroporation und die Mikroinjektion. Nachteil dieser nicht-viralen Methoden ist, dass eine stabile Expression nicht gesichert ist. Hierfür wesentlich besser geeignet sind die viralen Vektoren [75,78,79].

Als virale Vektoren verwendet man Retroviren, adenovirale Viren und adenoassoziierte Viren.

Retroviren sind RNA-Viren und integrieren das gewünschte Gen (maximal 7,5kb) an einer zufälligen Stelle in das Genom der Zielzelle mit der Gefahr, dadurch andere Gene zu beschädigen (Insertionsmutagenese). Dadurch haben Retroviren das Potential, zu stabiler Genexpression in Mutter- und Tochterzelle zu führen, sind aber ineffizient in sich selten teilenden Zellen. Die in der Gentherapie verwendeten Retroviren sind replikationsdefizient, da bei der Vektor-konstruktion alle Regionen, die für virale Proteine kodieren, aus dem Retrovirusgenom entfernt und durch andere Sequenzen ersetzt wurden [76].

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit Hüll- und Kapsidproteinen. Durch Deletion von Teilen des Virusgenoms und Insertion der gewünschten Sequenz unter der Regulation eines konstitutiven Viruspromotors wird das Virus zu einem replikationsdefizienten Vektor. Das Adenovirus tritt mit Coxsackie-Adenovirus-Rezeptoren (CAR) auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung, um in die Zielzelle zu gelangen, und wird nach dieser Interaktion von der Zielzelle mittels Endosomen aufgenommen. Aus den Endosomen gelangt es in das Cytosol, von wo aus die Vektor-DNA den Zellkern erreicht, indem diese, ohne in das Wirtsgenom integriert zu werden, zur Expression des therapeutisch wirksamen Fremdgens (bis zu 30kb) führt. Die Genexpression bleibt transient, da eine Integration des Gens in das Genom der Zielzelle ausbleibt. Adenoviren können im Gegensatz zu Retroviren auch nicht-proliferierende Zielzellen effizient transduzieren [79,102]

Die für den Menschen nicht-pathogenen adenoassoziierten Viren mit Einzelstrang-DNA integrieren das Wunsch-Gen an einer definierten Stelle in das Genom der Zielzelle. Nachteil dieser Viren ist die noch sehr schwierige Herstellung und die relativ geringe Aufnahmefähigkeit für exogene DNA von maximal nur 4kb [77,74,78,104,86].

In der Gentherapie werden verschieden Ansätze verfolgt.

Zum einen die Tumorsuppressorgen-Gentherapie, die durch adenovermittelte Transduktion das Tumorsuppressorgen p53 in die Tumorzelle einbringt [79]. Das p53 ist bei fast der Hälfte aller Tumorzellen mutiert und somit u.a. seine Funktion als Regulator der proapoptotischen Faktoren und Initiierung der Apoptose sowie die Kontrolle des Zellzyklus eingeschränkt [80,81]. Durch das Einbringen des p53 in die Tumorzelle in Kombination mit Chemotherapie oder Radiotherapie kommt es z.B. beim Colorektalen Carcinom zu einer signifikanten Suppression des Tumorwachstums im Mausmodell [82].

Die Antiangiogenese-Gentherapie macht sich wie die Chemotherapie mit VEGF-EGFR-Inhibitoren zu eigen, dass fast alle Tumoren Angiogenesewachstumsfaktoren produzieren und sezernieren, u.a. VEGF (Vascular endothelial growth factor). Ziel dieses Ansatzes ist die spezifische Hemmung dieser Faktoren. Es wurden bereits eine Vielzahl von endogenen Anti-Angiogenese-Faktoren entdeckt, deren Herstellung in großen Mengen aber schwierig ist. Daher ist die in vivo Gentherapie in diesem Falle eine attraktive Alternative. Der VEGF Faktor, der eine Schlüsselrolle in der tumorinduzierten Angiogenese spielt, kann durch Blocken seiner Translation und Transkription inhibiert werden. Dazu wird antisense VEGF-cDNA eingesetzt. Ein antisense VEGF-cDNA tragendes Gen wird mittels eines Adenovirus in die Tumorzelle eingebracht. Außerdem können die Endothelzell-Wachstumshemmer Angiotstatin oder Endostatin durch adenovirale Transduktion in die Tumorzelle eingeschleust werden und VEGF hemmen [79].

Die Stärkung der Immunantwort durch modifizierte Dendritische Zellen, T-Zellen und der Einsatz von Cytokinen ist ein weiterer Ansatz in der Gentherapie [79].

Die weltweit erste Gentherapie wurde im Jahre 1990 von den amerikanischen Ärzten French Anderson und Michael Blaese bei dem vierjährigen Mädchen Aschanit DeSilva, die an der angeborenen Immunschwäche ADA-SCID (Adenosin Desaminase – Sever Combined immunodeficiency) litt, durchgeführt. Aus dem Blut der Patientin wurden Leukozyten isoliert, in vitro mit dem intakten ADA-Gen transduziert und in Kultur expandiert. Die gentechnisch veränderten

Zellen wurden dem Mädchen durch Infusion wieder zurückgegeben. Die Behandlung hatte Erfolg [77,83].

Seit der ersten Gentherapie im Jahre 1990 wurden mehr als 1340 klinische Gentherapiestudien in 28 Ländern vollendet bzw. dauern noch an (vgl. Abb. 2) [105].

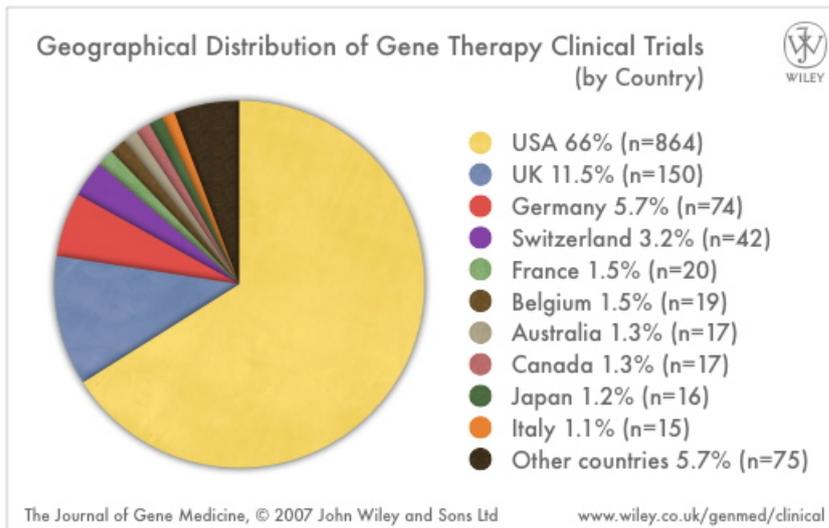


Abb. 2 Geographische Verteilung gentherapeutischer klinischer Studien. Quelle: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. Edelstein M L, et al. J Gene Medicine 2007; 9:833-842 [105].

Die Krebstherapie (z.B. Colon-CA, Lungen-CA, Glioblastom) hat dabei den größten Anteil unter allen klinischen Gentherapiestudien. An zweiter und dritter Stelle folgen klinische Studien an kardiovaskulären Erkrankungen und monogenetischen Erbkrankheiten (z.B. Mukoviszidose, SCID) (vgl. Abb. 3) [105].

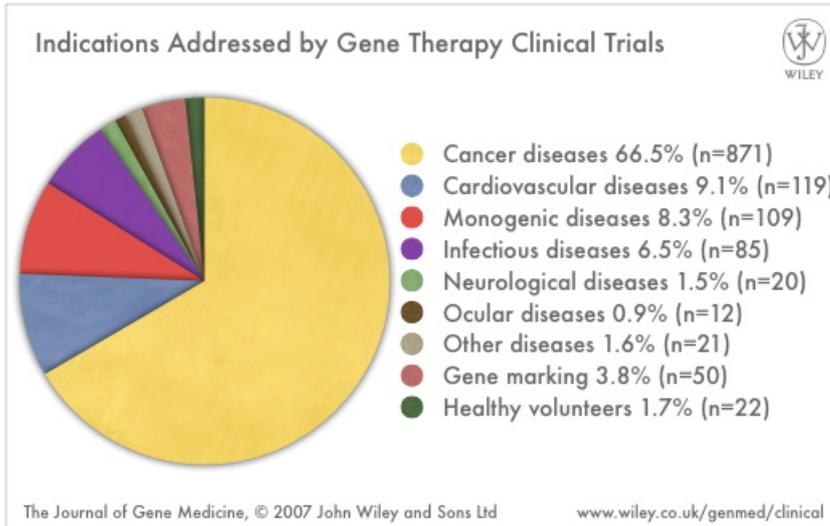


Abb. 3 Indikationen für gentherapeutische klinische Studien. Quelle: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. Edelstein M L, et al. J Gene Medicine 2007; 9:833-842 [105].

In den bisher durchgeführten menschlichen Gentherapiestudien wurden über 220 verschieden Gene verwendet. In mehr als 60% der Studien handelte es sich bei den transduzierten Gene um Antigene zur Stimulation des Immunsystems, Cytokingene und Suizidgene (vgl. Abb. 4) [105].

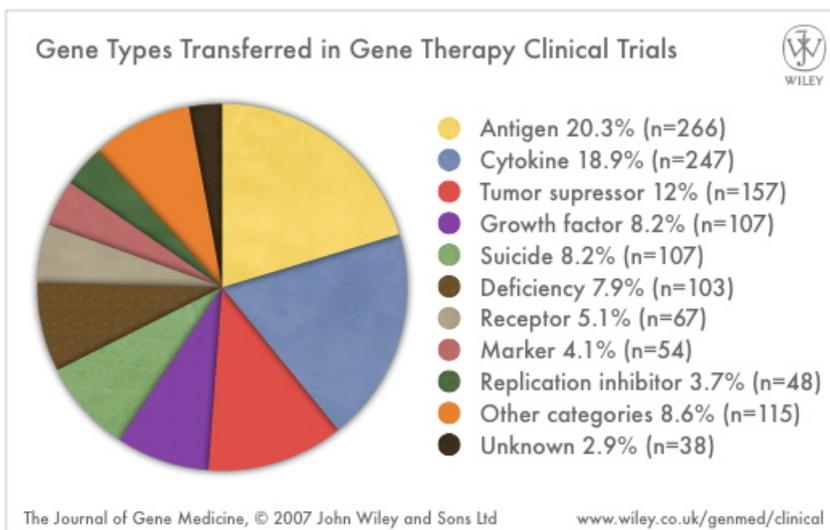


Abb. 4 Transfizierte Gen-Typen in klinischen Studien. Quelle: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. Edelstein M L, et al. J Gene Medicine 2007; 9:833-842 [105]

Die Rolle der Gentherapie nimmt bei schwer behandelbaren und therapieresistenten Krebsformen wie beim HCC immer mehr zu [66,84,86,85].

Die Effektivität der somatischen Gentherapiestrategien ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören: geeigneter Typ der Zielzelle, optimales gewebesspezifisches Vektorsystem, hohe Transfektionsrate, Zellspezifität, optimale Promotorsequenz für anhaltende und optimale Genexpression in der Zielzelle und Sicherheit des Verfahrens [86,87].

1.4 Suizidgentherapie

Die Suizidgentherapie ist eine Form der somatischen Gentherapie, bei der selektiv in Tumorzellen nach erfolgtem Transfer eines Gens (sog. „Suizidgen“) in der Zelle Prozesse aktiviert werden, die den Zelltod auslösen [79,86, 88,105].

Das Suizidgen wird mittels eines viralen oder nicht-viralen Vektors (vgl. 1.3) in die Zielzelle transferiert.

Es kommen dabei unterschiedliche Suizidgene zum Einsatz, die über unterschiedliche Mechanismen den selektiven Zelltod induzieren. So kann unter Kontrolle eines entsprechenden Promotors in der Zielzelle ein Suizidgen, welches für ein zytotoxisches Gen wie z.B. das Diphtherietoxin A kodiert, exprimiert werden. In in vitro Studien beim HCC wurde unter Kontrolle des AFP Promotors das Diphtherietoxin A exprimiert, welches in transfizierten Zellen zum Zelltod führte [66,89].

Ein weiterer Ansatz in der Suizidgentherapie ist die Verwendung eines Suizidgens, welches für den TRAIL-Ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand) kodiert, der ausschließlich in Tumorzellen Apoptose induziert. In vitro induziert die adenovirale Transduktion mit Expression des TRAIL-Ligand in HCC Zellen Apoptose [66,90].

Ein anderes Beispiel für die Suizidgenmechanismen sind Enzym/Prodrug-Systeme. Im englischen Sprachgebrauch werden sie auch als „gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)“ bezeichnet. In diesem Ansatz kodiert das in

die Zelle eingebrachte Suizidgen für ein Enzym, welches in Säugetierzellen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration exprimiert wird. Danach anschließend erfolgt die systemische Applikation des inaktiven Prodrugs, welches ohne Verstoffwechslung pharmakologisch nicht oder nur wenig wirksam ist. Durch die Expression des Enzyms wird das Prodrug in dessen aktive toxische Form metabolisiert. Bei den transduzierten Tumorzellen kommt es zur Einleitung des Zelltods bzw. zum Suizid [86,91].

Als Suizidgene werden u.a. Gene für die Cytosindesaminase, die Thymidinkinase, die Nitroreductase, das Cytochrom P450 und noch viele weitere verwendet [91].

Limitiert wird der Suizidgeneffekt teilweise durch die Unfähigkeit, die gesamte Tumorzellpopulation zu transduzieren. Dies wird durch die Fähigkeit der suizidgentransduzierten Zellen, die Zytotoxizität auf benachbarte Zellen zu übertragen, kompensiert. Dieser Vorgang wird als Bystander-Effekt bezeichnet. Mögliche Mechanismen des Bystander-Effektes sind zum einen ein Transport des toxischen Metabolits über Zell-Zell-Kontakte, Gap-Junctions, durch freie Diffusion des toxischen Metabolits durch die Zellmembran und zum anderen durch die virale Transfektion bedingte ausgelöste Immunantwort mit Produktion von TNF- α , welches hämorrhagische Tumornekrosen induzieren kann [79,86,91].

Entscheidend für die antitumorale Wirkung des Suizidgenes im Zielorgan sind die Transduktionsrate, die Dauer und Höhe der Expression des Suizidgens sowie die Menge an erzeugten toxischen Metaboliten [91].

Die erste klinische Studie mit einem Suizidgen wurde im Jahr 1991 für die Behandlung des Ovarialzellkarzinoms durchgeführt. Die Ovarialkrebszellen wurden ex vivo mit dem Gen für HSV-tk transfiziert und intraperitoneal injiziert [86].

Inzwischen sind einige Suizidgentherapiestudien bereits in Phase 1 und 2, wenige in Phase 3 [92]. Am häufigsten werden die Studien zur Behandlung von Glioblastomen, Prostata-CA und Ovarialzellkarzinome durchgeführt.

1.4.1 Cytosindesaminase

Im Rahmen der Therapie von Tumoren wird die Cytosindesaminase (CD) in Kombination mit dem Prodrug 5-Fluorcytosin (5-FC) als Suizidgen eingesetzt. Die CD kommt in einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen vor, jedoch vermittelt CD aus *Saccharomyces cerevisiae* (YCD = Yeast CD) im Vergleich zur CD aus *Escherichia coli* (BCD = bakterielle CD) einen wesentlich stärkeren Suizidgeneffekt [93]. CD katalysiert die Umwandlung der nicht-toxischen Prodrug 5-Fluorcytosin (5-FC) zu 5-Fluorouracil (5-FU). 5-FU wird nachfolgend in die aktiven cytotoxischen Metaboliten 5-Fluorouraciltriphosphat (5-FUTP) oder 5-Fluor-desoxymonophosphat (5-FdUMP) umgewandelt. Diese Reaktion ist in Abb. 5 dargestellt.

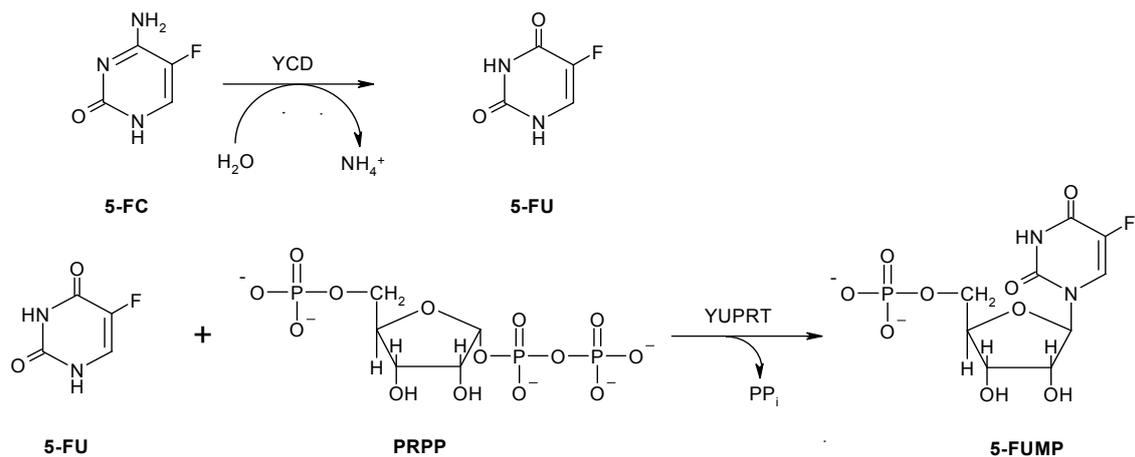


Abb. 5 Enzymatische Reaktionen von YCD und YUPRT. YCD katalysiert die Desaminierung des 5-FC. Der entstandene Metabolit 5-FU wird von YUPRT unter Verwendung des Cosubstrats PRPP zu 5-FUMP umgesetzt.[94]

Ein Fusionsgen aus dem YCD Suizidgen und dem Yeast Uracilphosphoribosyltransferase Gen (YUPRT) sorgt für eine Weiterverstoffwechslung von 5-FU in 5-FUMP. Somit führt es zu einer weiteren Verstärkung des Suizidgeneffektes [95,96]. Dieses Fusionsgen wird als Super-Cytosindesaminase (SuperCD = SCD) bezeichnet.

Die Toxizität von 5-FU kommt dabei in zweierlei Hinsicht zum Tragen. Durch die Umwandlung des 5-FU zu 5-FUMP und 5-FUTP steht der zellulären RNA-

Synthese anstelle von Uridinphosphat ein falscher Baustein zur Verfügung und führt so zum Kettenabbruch. Andererseits wird 5-FU in der Zelle zum Fluorodesoxy-monophosphat (FdUMP) umgebaut, das eine irreversible Hemmung der Thymidylatsynthase bewirkt. Die Thymidylatsynthase katalysiert die Konversion von Desoxy-Uracilmonophosphat (dUMP) zu Desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) und stellt damit sicher, dass für die DNA-Synthese genug Desoxyribonukleinsäuren zur Verfügung stehen [78]. FdUMP wird von der Thymidylatsynthase als Substrat erkannt und dauerhaft gebunden, so dass das Enzym für eine Neusynthese von dTMP nicht mehr zur Verfügung steht [97]. Tumorzellen, die ein solches Suizidgen tragen, können auf diese Weise gezielt und hoch-effizient abgetötet werden.

Der Wirkung des Suizidgens wird durch den Bystander – Effekt von 5-FU noch verstärkt. 5-FU diffundiert passiv durch die Zellmembran, und somit werden auch nicht-transduzierte Tumorzellen erreicht. 5-FU ist ein regelmäßig eingesetztes Zytostatikum in der Therapie solider Tumore, z.B. beim Colon-CA und Mamma-CA. Im Rahmen eines Studienprotokolls der Pediatric Oncology Group (POG) wurde es in Kombination mit Cisplatin und Vincristin auch beim HB eingesetzt.

Bisher existieren keine systematischen Erkenntnisse über die Anwendung von Gentherapie oder Suizid-Gentherapie beim HB. Die Erkenntnisse aus Untersuchungen des HCC sowie die histologischen und molekularen genetische Verwandtschaft einzelner HB-Subtypen zu Hepatozyten lassen die Suizid-Gentherapie unter Verwendung des 5-FC/5-FU-Systems vielversprechend erscheinen.

2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte der 5-FC/SuperCD vermittelten Suizidgentherapie auf HB-Zellen systematisch untersucht werden. Im Vordergrund stehen hierbei die Effizienz der Adenovirus-assoziierten Vektortransduktion, die Analyse der alleinigen Therapie mit 5-FC und 5-FU sowie die Untersuchung der 5-FC induzierten Zytotoxizität nach Transduktion von SuperCD in die HB-Zellen.

Die Untersuchungen sollen analysiert werden hinsichtlich ihrer Eignung als Basis für weitere präklinische Studien und als möglicher Beitrag für einen klinischen Einsatz.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien

Zelllinien sind genetisch identische Zellen, die aus einer Zelle entstanden sind und unbegrenzte Lebensfähigkeit erlangt haben. Sie werden in der Grundlagenforschung sowie in der klinisch-orientierten Forschung in großer Bandbreite eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente mit drei Hepatoblastomzelllinien (HepT1, HepT3, HUH6) durchgeführt. Zur Einordnung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde auch die HCC-Linie HepG2 mit untersucht.

3.1.1.1 HepT1

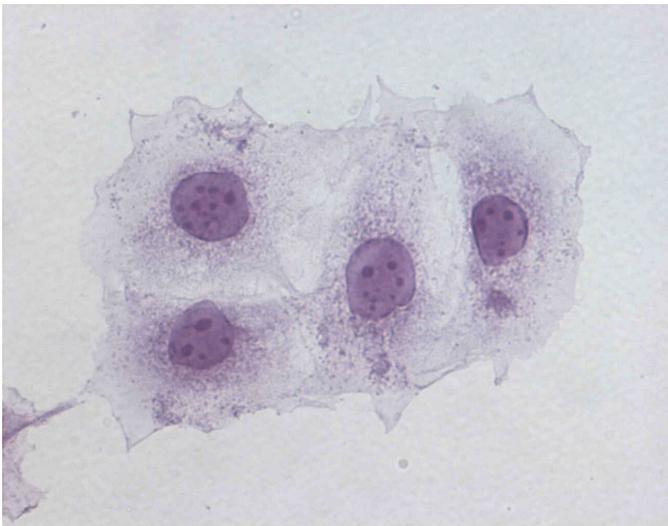


Abb. 6 HepT1, HE-Färbung, 40-fach vergrößert

Die Zelllinie HepT1 wurde 1996 in Hannover von Pietsch et al. [98] etabliert und charakterisiert. Die Zellen entstammen der Leber eines 34 Monate alten Mädchens. Das Wiedemann-Beckwith-Syndrom und die familiäre Form der adenomatösen Poliposis coli konnten als Ursache für das HB ausgeschlossen werden. Das HB wuchs multinodulär und infiltrierend in das angrenzende Leberge-

webe. Der Tumor bestand aus festen und trabekulären Anteilen, die embryonalen Hepatocyten ähnelten. Deshalb wurde das HB histologisch dem embryonalen Subtyp zugeordnet.

Morphologisch zeigen die HepT1 Zellen granulär-eosinophiles Zytoplasma mit pleomorphen Kernen, die zum Teil gespalten sind und zwei bis drei Nukleoli mit irregulär kondensiertem Chromatin aufweisen.

Die Zellpopulation verdoppelt sich ungefähr alle 1-2 Tage. Die Zellen wachsen in epithelialen, einschichtigen Clustern mit flachen, polygonalen Zellen. In einer konfluenten Kulturflasche befinden sich etwa $1,1 \times 10^4$ Zellen/cm².

Sofern die HepT1-Zellen subkutan in Nacktmäuse transplantiert werden, wachsen Tumoren mit denselben zytologischen Eigenschaften wie der Ausgangstumor heran. Es lassen sich des weiteren im Xenotransplantat ein Zellkernpleomorphismus, Mitosen und extramedulläre Hämatopoese nachweisen.

Observiert man die HepT1-Zellen elektronenmikroskopisch, erkennt man zahlreiche Desmosomen-Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen; außerdem findet man einen gut ausgebildeten und entwickelten Golgi-Apparat vor.

Die Zelllinie exprimiert, wie auch der Tumor, die folgenden Polypeptide: Zytokeratin 18, 19, Vimetin, alpha-Fetoprotein, Erythropoetin und den Stammzellfaktor SCF.

Der Karyotyp ist polyploid mit 65-125 Chromosomen pro Zelle. Zytogenetische Analysen erbrachten strukturelle und numerische Aberrationen der Chromosomen 1p, 6, 9, 11q, 13q, 15p und 20.

Das Chromosom 20 kommt mit einer Häufigkeit von sechs bis acht pro Zelle vor. Des weiteren sind Deletionen an den Chromosomenarmen 1p und 11q zu finden. Chromosom 15 hat teilweise zusätzliches Material des Chromosomenarmes 6q am kurzen Arm. Auch lassen sich zwei Isochromosomen 9p nachweisen.

3.1.1.2 HepT3

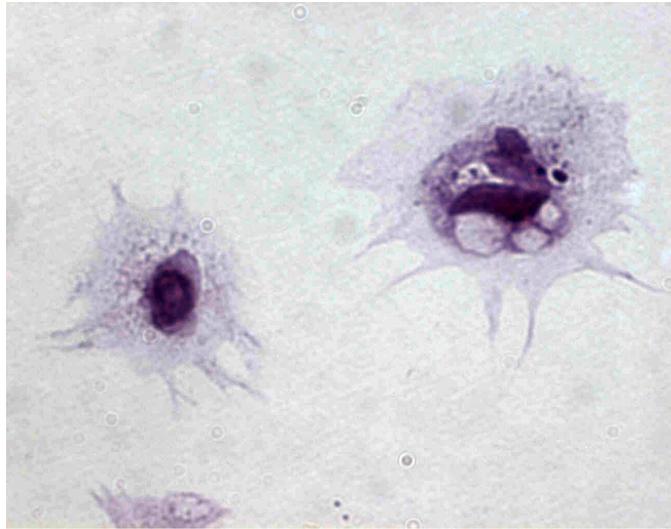


Abb. 7 HepT3, HE- Färbung, 64-fach vergrößert

Die Zelllinie HepT3 wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Fuchs in Hannover etabliert (Tumor D204, Studie HB 94, GPOH).

Die HepT3 Zellen stammen von einem HB mit embryonalen und fetalen Anteilen. Die Tumorzellen exprimieren AFP.

Die Zellen wachsen adhärent in Plastikkulturflaschen und weisen ein extrem langsames Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 4-5 Tagen auf. Daher wurde dem Nährmedium DULBECCO's MEM 15% FCS anstatt 10% FCS zugesetzt, um das Wachstum anzuregen.

In den Kulturflaschen formen HepT3 Zellen Kolonien, wobei die Zellen im Zentrum einer Kolonie pilzartig in den Raum wachsen. Diese Zellen lösen sich von Zeit zu Zeit zum Teil von der Kolonie ab und verbleiben im Medium bzw. wachsen an einer anderen Stelle der Kulturflasche erneut adhärent fest und bilden eine neue Kolonie. Deshalb wurde jeder Mediumwechsel als Zellpassage vermerkt. Bei der Zellpassage mit Trypsin und anschließender Aussaat in 24 Well-Platten wachsen nicht alle Zellen adhärent am Boden des Wells an. Es kann daher nicht angenommen werden, dass die ausgesäte Zellzahl sich in jedem Well befindet. Für die Virusinfektionsversuche wurde die Zellzahl am Tag der Infektion, wie in 3.1.2.4 beschrieben, bestimmt.

3.1.1.3 HUH6

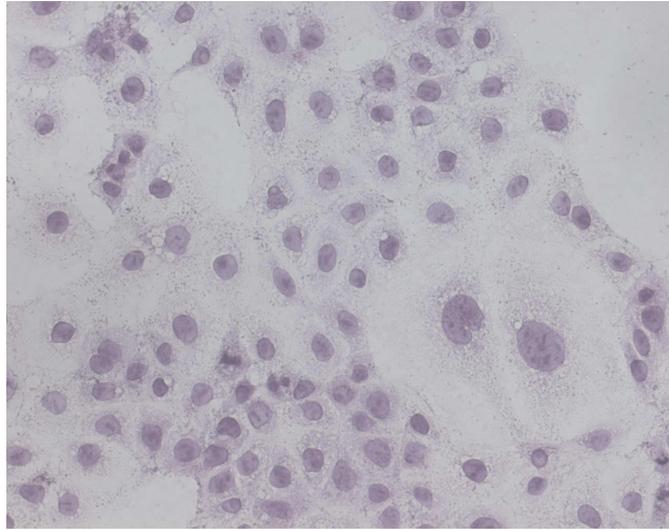


Abb. 8 HUH6, HE- Färbung, 20-fach vergrößert

Die Zelllinie HUH6 wurde 1976 von Doi [99] etabliert. Das Gewebe, aus dem die Zellen gewonnen wurden, entstammt der Biopsie des rechten Leberlappens eines 1-Jahre-alten Jungen. Dieser Junge verstarb aufgrund vorhandener Lungen- und Gehirnmastasen.

Die Histologie des Primärtumors zeigte gut differenzierte, massiv noduläre Strukturen, bestehend aus kleinen HB-Zellen mit einem Kern-Plasmaverhältnis von 1:1 - 1:2 und mit nur wenigen Kernpolymorphismen, vaskulären Anteilen und Zellen der extramedulläre Hämatopoese. Des Weiteren konnten gemischte Areale, bestehend aus Epithelzellen, Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen histologisch nachgewiesen werden. Fokal fanden sich chondro-osteogenetische Gewebeformen, wobei keine zirrhotischen Bereiche gefunden wurden.

Der Tumor wurde aufgrund der histologischen Eigenschaften als HB vom gut differenzierten, gemischten Typ charakterisiert [99].

Die HUH6 Zellen weisen eine langsame Proliferationsrate auf, die mit einer Verdopplungszeit von 1-2 Tagen einhergeht. In der Kultur bilden die Zellen Kolonien in runder Form aus.

Elektronenmikroskopisch kann man epitheliales Gewebe mit zahlreichen Desmosomen und Tonofibrillen sowie glykogenhaltige Granula im Cytoplasma

nachweisen. Im Verhältnis zum kondensierten Chromatin ist der Nukleolus dieser Zelllinie verhältnismäßig groß. Dies weist auf unterschiedlich große Zellkerne hin. In den einzelnen Zellklonen lassen sich 48 Chromosomen nachweisen. HUH6 Zellen können in Hamster und Nacktmäuse transplantiert werden. Histologisch zeigt sich ein gangartiges Wachstum der Zellen. In vitro konnte die Produktion von alpha-Fetoprotein und Albumin über ein Jahr lang nachgewiesen werden [99].

3.1.1.4 HepG2

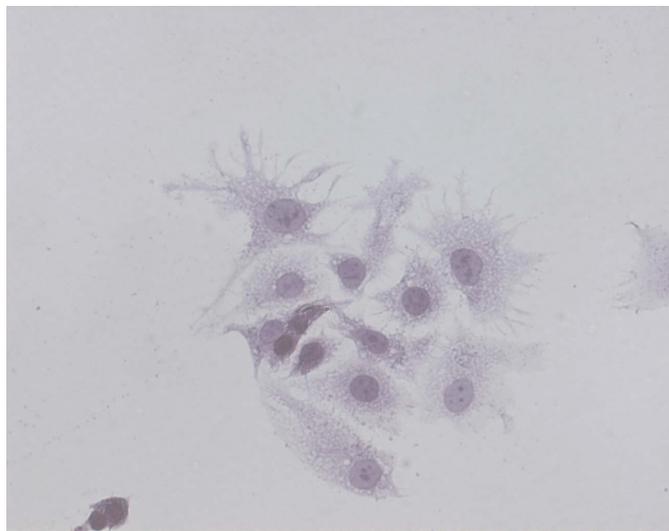


Abb. 9 HepG2, HE- Färbung, 20-fach vergrößert

Die Zelllinie HepG2 wurde 1979 von Aden et al. [100] aus einem Hepatozellulären Karzinom etabliert. Das Gewebe wurde bei einer Lobektomie einem 15 jährigen Jungen mit Lebertumor entnommen.

Die Histologie des Primärtumors zeigte ein differenziertes Hepatozelluläres Karzinom vom trabekulärem Typ.

Morphologisch betrachtet ähneln die HepG2 Zellen Leberparenchymzellen.

Die Zelllinie exprimiert alpha-Fetoprotein und Albumin. Des weiteren finden sich 15 weitere humane Plasmaproteine, wie beispielsweise Transferrin, Plasminogen oder Fibrinogen.

Die Zellen haben einen polyploiden Karyotyp von 50-56 Chromosomen, wobei es mehrere Isoformen des Chromosoms 1 gibt.

Die Zelllinie HepG2 exprimiert das Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen HBsAg.

3.1.2 Zellkultur

3.1.2.1 Allgemeines

Als Grundmedium wird für die Zelllinien HepT1, HepT3, HUH6 und HepG2 DULBECCO`s MEM (500ml-Flaschen) mit einem Zusatz von 10% FCS bzw. 15% FCS für HepT3, 1% Glutamin und 12,5 ml HEPES-Puffer verwendet. Sämtliche verwendeten Materialien sind im Einzelnen im Anhang unter 9.1 aufgelistet.

Die Zellen werden in 75 cm² großen beschichteten Kulturflaschen der Firma COSTAR bei 37°C, 10% CO₂ und 95%rH in einem konventionellen Inkubator der Firma HERAEUS angezüchtet. Die Zellkulturarbeit erfolgte stets unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank (HLB 2472 GS Heraeus Lamin Air).

Die verwendeten sterilen Zellmedien (DULBECCO`s MEM, PBS 1X, Trypsin EDTA-Lösung) wurden stets auf Raumtemperatur angewärmt, um eine Schädigung der Zellen durch Temperaturunterschiede der Medien auszuschließen.

Ein Mediumwechsel erfolgte durchschnittlich zwei Mal pro Woche, indem das alte Medium komplett verworfen und jeweils 10 ml frisches DULBECCO`s MEM-Medium erneut hineinpipettiert wurde.

Bei nahezu konfluentem Zellwachstum wurden die Zellen passagiert. Dabei wird das alte Medium komplett verworfen und die Zellen mit 2 ml sterilem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Dispersion der Zellen mittels 1ml Trypsin-EDETA-Lösung je Flasche. Die Zellablösung wird unter dem Lichtmikroskop der Firma LEITZ beobachtet und die Reaktion mit 3ml DULBECCO`s MEM je Flasche gestoppt, sobald sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen. Zur Vermeidung einer möglichen Schädigung durch Trypsineinwirkung wurde die Ablösung der Zellen nach spätestens fünf Minuten abgebrochen.

Die Medium-Trypsin-Zellsuspension wird zu gleichen Anteilen in zwei Kulturflaschen gegeben und mit 10ml frischem DULBECCO`s MEM aufgefüllt. Das Er-

gebnis wird unter dem Lichtmikroskop evaluiert, und es folgt die Inkubation im Inkubator der Firma HERAEUS. Nach etwa zwei Stunden haften die Zellen wiederum am Boden der Kulturflasche.

Alle Zellen wurden zu Beginn der Experimente und nachfolgend regelmäßig in der Abteilung für Mikrobiologie mit Hilfe eines ELISA-Verfahrens auf Kontamination durch Mykoplasmen oder Bakterien untersucht. Eine Kontamination wurde stets ausgeschlossen.

3.1.2.2 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in Kryoröhrchen werden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 10 ml DULBECCO`s MEM ohne Zusätze versetzt und in 15 ml Falcontubes überführt. Anschließend werden die Zellen für drei Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich), der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 10 ml DULBECCO`s MEM mit Zusätzen resuspendiert und in eine Kulturflasche (75 cm²) überführt.

3.1.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen werden wie in 3.1.2.1 beschrieben trypsinisiert; in 5 ml DULBECCO`s MEM ohne Zusätze aufgenommen, für drei Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich), anschließend wird der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 0,8 ml Einfriermedium (70% DULBECCO`s MEM, 20%FCS, 10%DMSO) resuspendiert, in 1 ml Kryoröhrchen überführt und im Stickstofftank aufbewahrt.

3.1.2.4 Zellzählung mit Hämocytometer Neubauer

Die Zellen werden wie in 3.1.2.1 beschrieben trypsinisiert und in DULBECCO`s MEM mit Zusätzen aufgenommen und in 15 ml Falcontubes für drei Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird mit 2,5 ml DULBECCO`s MEM ohne Zusätze resuspendiert. Anschließend werden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl Trypitanblau versehen

und für zwei Minuten inkubiert (lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann; die Färbung sollte nicht zu lange durchgeführt werden, da sonst auch lebende Zellen beginnen, den Farbstoff aufzunehmen).

Das Deckglas der Neubauer Zählkammer wird leicht befeuchtet und auf die Zählkammer aufgelegt, sodass Newton-Ringe sichtbar werden. Beide Kammern werden mit dem resuspendierten Farbstoff/Zell-Gemisch mittels Kapillarkräften befüllt. Durch Auszählen der vier Eckquadrate jeder Kammer unter dem Lichtmikroskop der Firma LEITZ wird deren Mittelwert berechnet.

Ein Eckquadrat einer Kammer entspricht bei aufgelegtem Deckgläschen $1 \times 10^4 \text{ cm}^3$; bei Einbeziehung der 1:2-Verdünnung mit Trypanblau ergibt sich die Zellzahl/ml nach folgender Formel:

Zellzahl/ml Zellsuspension = durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat $\times 10^4 \times 2$.

3.1.3 Zytochemie Hämatoxilin-Eosin- Färbung

Die HE-Färbung jeder Zelllinie dient zur Veranschaulichung der Zellmorphologie jeder einzelnen Zelllinie.

Durchführung:

Die Zellen HepT1, HepT3, HUH6 und HepG2 werden subkonfluent jeweils separat auf einen Objektträger (Super Frost Plus, Art.-Nr.: 041300, R. Langenbrinck) in einer Petrischale mit 10 ml DULBECCO`SMEM (10%FCS, 1% Glut, 2,5 % HEPES-Puffer) ausgesät.

Nach 24 Stunden Inkubation im Inkubator der Firma Heraeus BBD 6220 (37°C 10%CO₂ 95%rH) und mikroskopischer Evaluation der Zellvitalität unter dem Mikroskops Fluovert FS, LEITZ, wird das Medium aus den Petrischalen vorsichtig abgesaugt. Die Objektträger werden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 4,5% Formalin (Roti[®] Histofix) fixiert. Daraufhin erfolgt erneut ein Waschgang in PBS, bevor die Objektträger für 10 Minuten in Hämalun (1:5 verdünnt mit Aqua dest.) der Firma Merck inkubiert werden. Nach Abspülen der Objektträger mit Aqua dest. werden die Objektträger für 10

Minuten in Leitungswasser inkubiert. Nach dem Farbumschlag erfolgt für eine Minute die Inkubation in Eosin (Certisain[®], Merck). Anschließend werden die Objektträger in mehreren kurzen Waschzyklen 3 mal in 70% Ethanol und 4-5 mal in 96% Ethanol eingetaucht, 2 x 3 Minuten in 99,9% Ethanol und anschließend für 2 x 5 Minuten in Xylol der Firma Merck inkubiert und zum Schluss mit Eindeckmedium DEPEX versehen.

Die Objektträger werden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 (HBO 50/AC, ZEISS) fotografiert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Adenoviren

Adenoviren gehören mit ihrem linear doppelsträngigem DNA-Genom und einer Größe von 36kb zur Familie der Adenoviridae. Die ersten Adenoviren wurden in adenoidem Gewebe (Tonsillen) nachgewiesen, daher ihr Name [101]. Die Viruspartikel sind ikosaedrisch mit einem Durchmesser von 60-90 nm, bestehend aus den Kapsidproteinen Hexon, Penton und Fiber. Die Morphogenese läuft im Kern ab, wo sie auch zu großen Kristallen aggregieren können. Es können bis zu 40 Serotypen unterschieden werden, die noch in weitere Subgruppen A bis E klassifiziert werden. Klinisch verursachen die Adenoviren beim Menschen häufig Infektionen des Respirationstraktes, Augeninfektionen und Infektionen des Intestinaltraktes. In sehr seltenen Fällen Pneumonie, Bronchitis, Hepatitis und Zystitis. Bei immuninkompetenten Patienten können Adenoviren lebensbedrohliche Infektionen auslösen [102,103,104].

In der Gentherapie sind Adenoviren die am häufigsten in klinischen Studien eingesetzten viralen Vektoren (vgl. Abb. 10) [105]. Ihre Vorteile sind unter anderem, sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen zu transduzieren und dabei eine hohe Transduktionseffizienz zu erzielen. Des Weiteren sind Adenoviren nicht onkogen. Für den Gentransfer werden vor allem die beiden Serotypen 2 und 5 (Ad2, Ad5) verwendet, da sie nur mit milden Krankheitsverläufen beim Menschen assoziiert sind und im Gegensatz zu anderen Serotypen keinen

Krebs bei Tieren auslösen [106]. Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser beiden Serotypen ist, dass sie durch die Interaktion mit dem Fiberprotein des Viruskapsids mit dem ubiquitär exprimierten Coxsackie und Adenovirus Rezeptor (CAR) ein breites Spektrum an Säugerzellen infizieren. Die Bindung an den CAR-Rezeptor führt zu einer starken Aktivierung des Immunsystems im Organismus mit der Bildung von inflammatorischen Zytokinen, Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen und antigen-präsentierenden Zellen. Aus diesem Grund werden nur Adenoviren als Vektoren verwendet, denen sämtliche viral kodierende Sequenzen entfernt wurden oder Vektoren, die gleichzeitig das hybride Immunmodulatorprotein (CTLA4-Ig) exprimieren, um die Immunantwort zu unterdrücken [73,102].

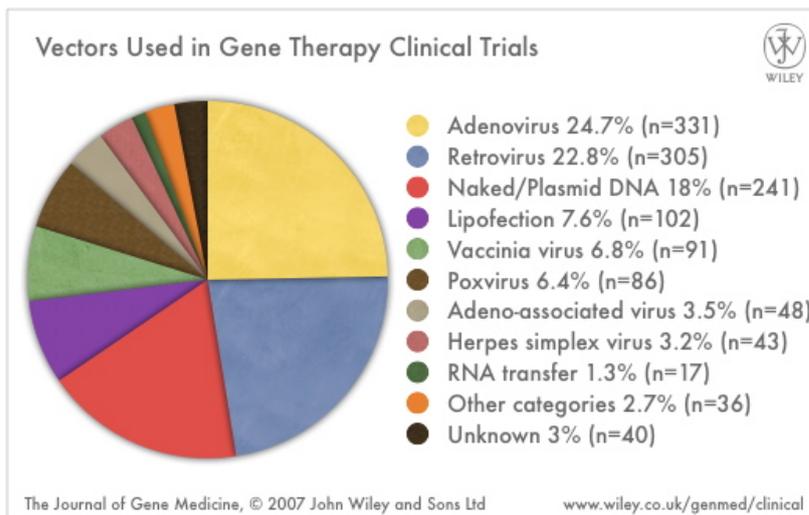


Abb. 10 Verwendete Vektoren der Genthherapie in klinischen Studien.

Quelle: Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. Edelstein M L, et al. J Gene Medicine 2007; 9:833-842 [105]

Adenoviren benötigen 32-36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Nach der Aufnahme des Virus über den CAR und den zellulären Integrinen folgt die Clatherin vermittelte Endocytose. Das Viruspartikel wird in ein Endosom überführt. Durch Ansäuerung im Endosom werden die Viruscoreproteine ins Cytoplasma freigesetzt („uncoating“) und anschließend über „nuclear localization signals“ zum Zellkern transportiert. Dort verläuft die adenovirale Replikation und Transkription in zwei Phasen ab, eine frühe und eine späte (vgl. Abb. 11).

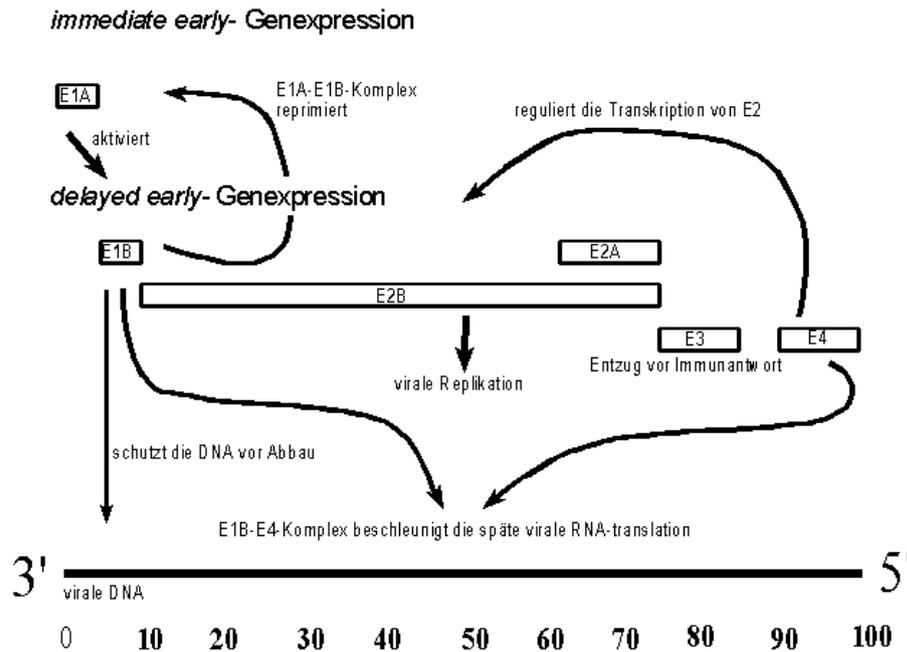


Abb. 11 Sehr frühe adenovirale Genexpression.

Quelle: Forschungsinstitut für Virologie und Biomedizin Wien (September 2007), <http://www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/ADENOGEN1.HTML> [107].

Vor Beginn der Virusreplikation werden die Gene E1- E4 exprimiert (1. Phase). Zuerst werden die Gene der E1A-Region exprimiert. Diese Proteine fungieren als Regulatoren der Transkription und sind für die Aktivierung der weiteren Gene E1B, E2A, E2B, E3, E4 verantwortlich. Diese wiederum codieren für Proteine mit essentiellen regulatorischen Funktionen. Das E1B-Protein unterdrückt durch Komplexbildung mit dem E1A-Protein die frühe Genexpression, die sonst kontinuierlich weiterlaufen würde und den Zelltod vor der Fertigstellung neuer Viruspartikel auslösen würde. Gleichzeitig schützt das E1B-Protein die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau. Die zelluläre RNA-Translation wird gehemmt, wohingegen die virale Genexpression durch die Kombination der Genfunktion von E1B- und E4 beschleunigt wird. Die E4-Genprodukte sind an der viralen Replikation und der Fertigstellung der Virionen beteiligt, und eines der Genprodukte fungiert als Regulator in der Transkription der E2-Region, die vor allem eine wichtige Rolle in der viralen Replikation spielt. Eines der Genprodukte der E2-Region kodiert für die DNA-Polymerase, und E2A-Proteine komplexieren bei der Replikation den einzelnen DNA-Strang, um ihn vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen zu schützen.

Die 2. Phase ist die Replikation des viralen Genoms, welche acht Stunden nach der Infektion beginnt und nach 24 Stunden beendet ist. Die Proteine der E3-Region helfen dem Virus, dem Abwehrmechanismus des Immunsystems zu entkommen, indem durch eines der E3-Genprodukte die Lyse der adenovirusinfizierten Zelle durch cytotoxische T-Lymphozyten blockiert wird. In jeder Zelle entstehen 10^4 - 10^5 Adenoviren, die im Zellkern zusammengebaut werden. Während dieses Prozesses blockieren die E1B und E4-Genprodukte die Synthese und Translation der zellulären Proteine. Sie verhindern ebenfalls, dass zelluläre Faktoren die Virusproduktion unterdrücken. Dies hat zur Folge, dass die Zelle nach der adenoviralen Infektion sehr bald unterversorgt ist und folglich innerhalb 30-40 Stunden nach der Infektion verkümmert und anschließend die neu-synthetisierten Virionen freisetzt [107].

3.2.2 Rekombinante replikationsdefiziente Adenoviren

Zur Herstellung eines rekombinanten Adenovirus wird das therapeutische Gen in ein Plasmid eingefügt, welches über ein adenovirales Verpackungssignal und einen starken Promotor zur Expression des Gens verfügt. Anschließend wird das therapeutische Gen tragende Plasmid zusammen mit einem Plasmid, welches partiell adenovirales Genom enthält, ohne die E1- und E4-Region in ein Bakterium eingebracht. Im Bakterium kommt es zur Rekombination der Plasmide. Nach Aufreinigung der DNA wird diese in eine Verpackungszelle HEK 293 E4/5-38-Zelle transfiziert, welche die E1- und E4-Region als trans-Element bereitstellt und somit in der Lage ist, alle E1- und E4-Proteine zu synthetisieren, die für die Virusreplikation nötig sind. Die entstandenen rekombinanten Adenoviren sind im Genom in der Region E1 und E4 deletiert. Durch die Unvollständigkeit des adenoviralen Genoms in diesen Viren ist gewährleistet, dass sich das rekombinante Adenovirus, welches als Genfahre dient, in der Zelle nicht replizieren kann und somit replikationsdefizient ist. Bei einer Infektion mit einem rekombinanten Adenovirus wird das therapeutische Gen transient von der Zelle exprimiert. Es folgt eine Insertion in das Genom der Zelle [73,102,108].

Die in dieser Arbeit eingesetzten Adenoviren sind im Bereich der E1- und E4-Region deletiert um eine in vitro Vermehrung zu verhindern. Anstelle der adenoviralen Gensequenzen enthalten sie eine Expressionskassette mit dem gewünschten Transgen: Beim AdenovirusSuperCD das Reporter-gen für das Suizidgen Super Cytosindesaminase = SCD bzw. beim Adenovirus AdRSV GFP und bei AdCMV GFP (Ad Track) das Transgen GFP (Green fluorescent protein). Das Suizidgen Super Cytosindesaminase (SuperCD) ist ein bifunktionelles Suizidgen, hergestellt aus dem Gen Yeast Cytosine Desaminase (YCD) und Yeast Uracil phosphoribosyltransferase (YUPRT) (Plasmid pTG6600-Super CD) [109].

In dieser Arbeit wurden folgende Adenoviren verwendet:

- Adenovirus SuperCD (AdSCD), CMV Promotor
- Adenovirus GFP (AdGFP), RSV-Promotor
- Adenovirus GFP (AdGFP-Ad Track), CMV-Promotor

3.2.3 Transduktion mit replikationsdefizienten Adenoviren

Sämtliche verwendete Materialien für die virale Transduktion sind im Einzelnen im Anhang unter 9.1 aufgelistet.

Durchführung:

Zur Vorbereitung wird eine definierte Zellzahl, welche in Vorversuchen für jede Zelllinie und Kulturbedingung bestimmt wurde, ausgesät.

Zellzahl für Transduktion

Zelllinie/ Kulturbedingung	Chamber slide (Immunhistochemie)	6-Well (FACS; Western Blot)	24- Well (Proliferationsassay)
HepT1	5 x 10 ⁴ Zellen/Well	2 x 10 ⁵ Zellen/Well	2 x 10 ⁴ Zellen/Well
HepT3	5 x 10 ⁴ Zellen/Well	4 x 10 ⁵ Zellen/Well	7 x 10 ⁴ Zellen/Well
HUH6	4 x 10 ⁴ Zellen/Well	1 x 10 ⁵ Zellen/Well	5 x 10 ³ Zellen/Well
HepG2	5 x 10 ⁴ Zellen/Well	2 x 10 ⁵ Zellen/Well	4 x 10 ⁴ Zellen/Well

Tabelle III Zellzahl für Transduktion mit MOI 50

Die Transduktion von adhärenenten Zellen erfolgt in möglichst geringen Volumina, um eine hohe Transduktionseffizienz zu erreichen.

MOI (Multiplicity of infection) ist ein Maß für die Menge infektiöser Viruspartikel, die erforderlich ist, um eine definierte Anzahl einer Standard-Zielzelle zu infizieren. Die MOI rekombinanter adenoviraler Partikel wird standardisiert an der Zelllinie HEK 293 bestimmt. Dieser Wert gilt als Referenz.

Beispiel: MOI 1 ist gegeben, wenn in einer Adenovirussuspension genau ein infektiöses Viruspartikel für jede zu infizierende Zelle vorliegt.

Da es für die maximale Expression der zu übertragenden Transgene erforderlich ist, ein Vielfaches von einem Viruspartikel in die zu adressierenden Zielzellen einzuschleusen, ist es sinnvoll, Virusmengen mit einer MOI von bis zu 1000 einzusetzen.

Mit Hilfe der definierten Zellzahl und gewünschter MOI wird die Virusmenge pro Well berechnet. Anschließend wird mittels des für jeden Virus eigens ermittelten Titters die Menge Virus, die für die Transduktion gebraucht wird, berechnet.

Nach 24 Stunden Inkubation und mikroskopischer Beurteilung der Zellvitalität anhand des Mikroskops Fluovert FS, LEITZ erfolgt die adenovirale Transduktion.

Nach Reinigung der Zellen mit PBS werden die Viren in DULBECCO`sMEM (serumreduziertes Medium) in entsprechenden Volumina zu den Zellen gegeben (Chamber Slide: 400 µl; 6-Well: 1 ml; 24-Well: 500 µl Viruslösung) und anschließend für eine Stunde im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) inkubiert.

Nach einer Stunde wird das virusenthaltene DULBECCO`sMEM entfernt und durch serumhaltiges Medium (DULBECCO`sMEM; 10%FCS, 1% Glut, 2,5% HEPES-Puffer) ersetzt.

Die Inkubationszeit von einer Stunde reicht für die Adsorption und den Eintritt der Adenoviren in die Wirtszelle aus, da diese Vorgänge sehr effizient und schnell ablaufen [110].

Die Infektion wird durch die grüne Fluoreszenz der mit AdvGFP infizierten Zellen mittels des Fluoreszenzmikroskopes (IX 50-S 8F2, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD) nach 24 Stunden kontrolliert und 48 Stunden nach Virusinfektion als Fluoreszenzbilder dokumentiert.

3.3 Verwendete Zytostatika

Zytostatika (bzw. Cytostatika, gr. Cyto = Zelle ; statik = Stillstand) sind eine chemisch heterogene Gruppe zytotoxischer Substanzen, die das Zellwachstum, insbesondere die Zellteilung, verhindern oder verzögern, bzw. auch Zellstrukturen zerstören. Sie wirken nur auf proliferierende Zellen und nicht auf Zellen, welche sich in der G₀-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus befinden.

Ihr Einsatz erfolgt vorwiegend in der Tumorthherapie, da Tumorzellen nicht der physiologischen Wachstumsregulation unterliegen und höhere Zellteilungsraten aufweisen als normale Körperzellen. Des Weiteren werden Zytostatika auch zur

Immunsuppression bei chronischen Krankheiten (z.B. rheumatoide Arthritis) sowie zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach erfolgter Organtransplantation eingesetzt.

Durch die Therapie mit Zytostatika kommt es auch zur Schädigung des gesunden rasch proliferierenden Gewebes, insbesondere des Gewebes der Erythro-, Leuko-, und Thrombopoese sowie der Epithelien der Schleimhäute (vor allem des Gastrointestinaltraktes), Gonaden (irreversible Störung der Spermatogenese bzw. Anovulation, teratogene Wirkungen), Haut- und Hautanhangsgebilde. Einige Zytostatika sind dabei selbst kanzerogen, mutagen oder teratogen.

Der Einsatz von Zytostatika erfolgt meist in Kombination mehrerer Zytostatika in jeweils geringerer Dosis (Polychemotherapie). Ziel dieses Ansatzes ist, die Wirksamkeit und Effizienz der Therapie zu erhöhen sowie eine Resistenzentwicklung zu verhindern und die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren [111].

Zytostatika kann man zum einen nach der Herkunft der Substanz (pflanzlicher Hemmstoff, Antibiotika, synthetische Substanz) oder nach dem Wirkungsmechanismus bzw. Mechanismus der Wachstumsbeeinflussung von Tumorzellen (Alkylantien, Antimetabolite, Topoisomerase-Hemmstoffe, Mitose-Hemmstoffe, Hormone und Antihormone) einteilen [112].

3.3.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-Fluorouracil gehört zur Wirkstoffgruppe der Antimetabolite bzw. zu deren Untergruppe, den Substrat-Analoga.

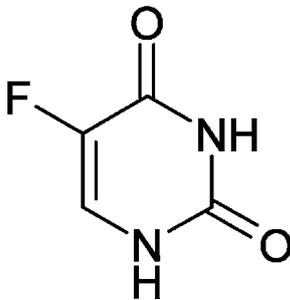


Abb. 12 Strukturformel 5-Fluorouracil, Quelle: Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluorouracil> (September 2007)

Antimetabolite weisen entweder eine strukturelle Ähnlichkeit zu Nukleinsäure-Bestandteilen oder zu Coenzymen, welche an der Biosynthese bzw. Modifikation der Nukleinsäure-Bausteine beteiligt sind, auf.

Das Pyrimidinanlogon 5-Fluorouracil beeinflusst die Umwandlung der Uracil-Vorstufe (FdUMP = Fluor-desoxyuridin-monophosphat) in Thymidin, da die reagierende 5-Position durch ein Fluoratom blockiert ist und somit keine Substratumsatzung durch die Thymidylat-Synthetase möglich ist. Des Weiteren ist die Bindungsaffinität des FdUMP um ein Vielfaches höher zur Thymidylat-Synthetase als zum hierfür vorgesehene Substrat dUMP. Die Synthese von Thymidinnukleotiden ist dadurch sehr stark beeinträchtigt. 5-Fluorouracil wirkt zyklusspezifisch in der S-Phase [112]. Es führt zu einer Hemmung der DNA-Synthese und der RNA-Synthese. Das FdUMP wird als falscher Baustein in die RNA eingebaut [113].

Zum Einsatz kommt 5-Fluorouracil vor allem in der Therapie des Colon-CA und des Mamma-CA. Beim HB ist es nicht Teil der Standardtherapieprotokolle. Im Rahmen eines Studienprotokolls der Pediatric Oncology Group (POG) wurde es in Kombination mit Cisplatin und Vincristin eingesetzt [38, 114].

Zu den unerwünschten Nebenwirkungen gehören Knochenmarksdepression, Schädigung der Schleimhäute (Verdauungstrakt; Stomatitis, Mucositis, Diarrhö),

Dermatitis, Haarverluste, neurotoxische Wirkungen, selten kommt es zu Koronarspasmen, und bei Langzeitinfusionen kann es zur Ablösung der Haut an Hand- und Fußinnenflächen kommen.

Das für diese Arbeit verwendet 5-Fluorouracil wurde von der Apotheke der Kinderklinik des Universitätsklinikums Tübingen bezogen.

Wirkstoff:	5-Fluorouracil
Konzentration:	50 mg/ml
MG:	130 g/mol
Hersteller:	medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Hamburg

3.3.2 5-Fluorcytosin (5-FC)

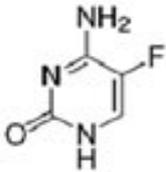


Abb. 13 Strukturformel 5-Fluorcytosin,
Quelle: Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, S 836

Fluorcytosin (5-FC), auch Flucytosin genannt, ist ein systemisch anwendbares Antimykotikum. Es ist ausschließlich bei Pilzen wirksam, die das Enzym Cytosindesaminase bilden, durch die 5-FC zu 5-FU metabolisiert wird. 5-FC besitzt daher nur ein sehr schmales Wirkungsspektrum, welches Hefen, insbesondere *Cryptococcus neoformans* und *Candida* – Spezies, sowie einige Schimmelpilze umfasst. Menschliche Gewebe enthalten allenfalls nur sehr geringe Mengen an Cytosindesaminase. 5-FC wird oral appliziert und gut resorbiert. Es ist bei Kandidosen, Kryptokokkosen und Chromomykosen indiziert. 5-FC ist im allgemeinen gut verträglich. Es können Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diar-

rhö und Ekzeme auftreten. In seltenen Fällen ist 5-FC hepatotoxisch und es kann zu Knochenmarksdepression führen [115,116].

In der Suizidgentherapie wird 5-FC als Prodrug in Kombination mit dem Suizidgen Cytosindesaminase eingesetzt und zu 5-FU metabolisiert (vgl.1.4).

3.4 Indirekte Immunfluoreszenz (Nachweis Adenovirushexonprotein)

Die indirekte Immunfluoreszenz dient als immunologische Methode zum mikroskopischen Nachweis von Antigenen oder Antikörpern in histologischen oder zytologischen Präparaten, zur Differenzierung von Zellen und verschiedenen Gruppen von Immunglobulinen oder findet Anwendung in der immunologischen Diagnostik von Autoimmunkrankheiten.

In der vorliegenden Arbeit wird mittels dieser Methode der Nachweis des Adenovirus - Hexonproteins erbracht. Unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers, der sich direkt an das homologe „Antigen“ bindet, wird die Aufnahme des Adenovirus mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen.

Durchführung:

Für dieses Experiment werden die vier Zelllinien in Chamber Slides der Firma BD BIOSCIENCES kultiviert. Die Infektion erfolgt nach 24 Stunden mit AdSuperCD und AdGFP (RSV Promotor) mit einer MOI 50 nach dem in 3.2.3 beschriebenen Protokoll.

Nach 48 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) wird die Zellvitalität unter dem Mikroskop (CK 40 – F 200 der Firma OLYMPUS OPTICAL CO. LT) beurteilt. Anschließend wird das Medium vollständig mit einer Stabpipette abgenommen, jedes Well wird mit 500 µl PBS (37°C) gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 200 µl Formalin (Roti[®] Histofix, Formaldehydlösung 4,5%, Carl Roth GmbH & Co.) fixiert.

Nach 3 Waschzyklen mit PBS (37°) wird jedem Well für 30 Minuten 200 µl der Blocking – Solution (Goat Serum 1,5%, DakoCytomation) zugesetzt. Dieses

Serum wird verworfen und durch 200 µl des 1. Antikörpers Mouse Anti-Adenovirus Monoclonal Antibody, Chemicon International in einer Verdünnung von 1:200 ersetzt. Für jede Kombination (Zelllinie + AdSCD/AdGFP bzw. Kontrolle) wird ebenfalls eine Negativkontrolle mit 200 µl PBS mitgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Der 1. Antikörper wird über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wird jedes Well 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper Cy3TM-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse-IgG, Jackson ImmunoResearch, LABORATORIES, INC. in einer Verdünnung von 1:300 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird jedes Well 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor für 1 Minute mit DAPI (SIGMA; 1:10 000) die Kern-Gegenfärbung erfolgt. Nach 3 Waschzyklen PBS für jeweils 5 Minuten werden die Objektträger mit DAKO Fluorescent Mounting Medium, DAKOCYTOMATION eingedeckt und anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die Objektträger werden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 (HBO 50/AC, ZEISS) unter gleichen Bedingungen fotografiert.

3.5 Transduktionseffizienz mit AdGFP (FACS)

Bei der Durchflusscytometrie (Fluorescence activated cell sorting analysis; FACS-Analyse) werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom analysiert. Obwohl die Messrate bei einigen tausend Zellen pro Sekunde liegt, wird jede Zelle einzeln analysiert. Mit Hilfe dieser Methode können verschiedene Parameter einer Zelle gleichzeitig bestimmt werden, so dass es möglich ist, verschiedene Zelltypen aus einem Gemisch von Zellen zu quantifizieren und zu isolieren. Dazu wird aus lebenden oder fixierten Zellen eine Einzelzellsuspension hergestellt. Im FACS-Gerät passiert die Suspension als Tropfenstrom einen Laserstrahl. Jede Zelle streut das Laserlicht und emittiert durch die Anregung Fluoreszenzlicht. Gleichzeitig werden dabei folgende Parameter bestimmt:

- Vorwärts-Streuung (forward-scatter): liefert Informationen über die Zell-Größe

- seitliche Streuung (side-scatter, 90°): liefert Informationen zur Granularität zellulärer Strukturen
- Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen.

Mit Hilfe der Lichtstreuung können Zelltod, Zellaggregationen und Zelleigenfluoreszenz vom Fluoreszenzlicht unterschieden werden. Die Streuung reicht beispielsweise aus, um Leukozyten, Monozyten und Granulozyten aus Gesamtblut-Leukozytenproben zu isolieren. Ebenso können Zellen, die mit verschiedenen Antikörpern und dadurch gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, quantifiziert und getrennt werden, womit z.B. Rückschlüsse auf die Dichte von Oberflächenproteinen gezogen werden können. Ebenso ist die Detektion von verschiedenen fluoreszierenden Proteinen (GFP, CyanFP, RFP) oder Gesamtzell-DNA (Zellzyklus-Abhängigkeiten; Apoptose-Analyse) möglich.

Durchführung:

Dieses Experiment dient zur Bestimmung der Transduktionseffizienz auf Adenovirus.

Die vier Zelllinien (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2) werden 24 Stunden vor Infektion in 6-Wells ausgesät und nach dem in 3.2.3 beschriebenen Infektionsprotokoll mit AdGFP (MOI 50) infiziert.

Für jede Zelllinie werden drei Wells mit AdGFP infiziert und drei Wells als Kontrolle mitgeführt (vgl. Abb. 14).

Zelllinie	Zelllinie	Zelllinie
Zelllinie + AdvGFP	Zelllinie + AdvGFP	Zelllinie + AdvGFP

Abb. 14 Exemplarische Anordnung der 6-Wells für FACS-Proben

Nach 48 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) wird die Zellvitalität unter dem Mikroskop (CK 40 – F 200 der Firma OLYMPUS OPTICAL CO. LT) beurteilt. Anschließend wird das Medium vollständig mit einer Stabpipette abgenommen, mit 1 ml PBS (37°) ge-

waschen und zur Zellablösung werden 500 µl Trypsin EDTA (37°C) zugegeben. Diese wird unter dem Mikroskop (CK 40 – F 200, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD) beobachtet. Nach vollständiger Ablösung werden die abgelösten Zellen jeweils in 5 ml Falcontubes (Polystyrene Round-Bottom Tube) überführt, 10 Minuten mit 500 µl Formalin fixiert und 5 Minuten bei 1200r zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 400 µl PBS aufgenommen. Die Zellen werden auf Eis gelagert und innerhalb einer halben Stunde gemessen. Durch den Vergleich von Positiv- und Negativkontrollen wurden die Detektionskanäle optimiert und es folgte die Messung mittels des FACS-Calibur-Gerät BD FACSTTM 7-Color Setup Beads der Firma BD BIOSCIENCES.

Die Detektion des GFP-Fluoreszenz erfolgte im FL1-H-Fluoreszenzkanals bei einer Anregungswellenlänge von 488nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der BD FACSDiva Software.

3.6 Nachweis SuperCD-Protein (Western Blot)

Der Nachweis des transduzierten SuperCD Proteins erfolgte mittels Western Blot.

3.6.1 Kultivierung der Lysate

Die Zellen werden 24 Stunden vor Infektion in 6-Well ausgesät und nach dem in 3.2.3 beschriebenen Transduktionsprotokoll mit AdSuperCD und AdGFP (RSV Promotor) jeweils mit einer MOI 50 transduziert (vgl. Abb. 15, Abb. 16.).

HUH6	HUH6 +AdvSCD	HUH6 + AdvGFP
HepT1	HepT1 +AdvSCD	HepT1 + AdvGFP

Abb. 15 Western Blot Proben HUH6 + HepT1

HepT3	HepT3 +AdvSCD	HepT3 + AdvGFP
Hep G2	Hep G2 +AdvSCD	Hep G2 + AdvGFP

Abb. 16 Western Blot Proben HepT3 + HepG2

Nach 48 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) wird die Zellvitalität unter dem Mikroskop (CK 40 – F 200, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD) beurteilt.

Zellaufschluss von adhärennten Zellen:

Die Zellen werden mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber vom Boden der 6-Well abgelöst, in PBS in 1,5 ml Eppis überführt und für 5 Minuten bei 10 000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellsediment in 120 µl Lysepuffer (vgl. Tabelle IV) aufgenommen und jeweils für 3 x 20 Sekunden mit Ultraschallwellen im Ultraschallbad (4°C) behandelt. Die Proben werden bei -80°C gelagert.

Lysepuffer Western Blot

Stammlösung	Lysepuffer (10ml)
Tris (1 M ph 7,6)	500 µl (=50 mM)
NaCl (5 M)	300 µl (= 150 mM)
H ₂ O dest.	8,2 ml
NP 40 (10 %)	1 ml (= 1 %)
Apoprotinin	10 µl/1ml Lysepuffer
PMSF [100mM]	10 µl/ 1ml Lysepuffer

Tabelle IV Lysepuffer Western Blot

3.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bei dem verwendeten elektrophoretischen Verfahren [117] erfolgt die Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen (Anwesenheit von SDS und β-Mercaptoethanol), wobei eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wird: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden, zum anderen ein darunter liegendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt werden. Als Gelmaterial kommt Polyacrylamid zum Einsatz. Das Trennvermögen dieser diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsiebeffekts mit einem Konzentrierungseffekt. Letzte-

rer wird dadurch verursacht, dass sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitionen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat²) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger als im Elektrodenpuffer und im Trenngel ist. Die effektive Beweglichkeit aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhält sich dabei wie folgt: Leitionen > Proteine > Folgeionen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Leitionen infolge ihrer hohen Beweglichkeit den Proteinen und Folgeionen im Sammelgel voran und hinterlassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit. Dadurch steigt die Feldstärke, was wiederum eine Beschleunigung der Proteine und Folgeionen hervorruft. Da die Proteine nicht schneller wandern als die Leitionen, andererseits von den Folgeionen nicht überholt werden können, entsteht eine schmale, konzentrierte Proteinschicht. Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel nimmt – infolge des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel – die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht die Beweglichkeit der Leitionen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus. Die Trennung der Proteine erfolgt in Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol, also unter denaturierenden Bedingungen, hauptsächlich nach der Größe der Proteine. SDS als starkes Detergens zerstört alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, während mit Hilfe von β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert werden.

Weiterhin binden die SDS-Anionen an die Proteinkette und zwar ein SDS-Anion je zwei Aminosäure-Reste, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Zahl der Aminosäure-Reste und damit dem Molekulargewicht ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS hervorgerufene negative Ladung „überdeckt“ im Regelfall die ursprüngliche Nettoladung des Proteins bei weitem, so dass diese bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Gießen des Gels:

Vorarbeiten

Für 16 × 18 cm Gele (1,5 mm dick) werden die entsprechenden Glasplatten mit Seife gereinigt und unter fließendem Wasser abgewaschen, um sie anschlie-

² Glycin ist ein Zwitterion und der Ladungszustand demzufolge stark pH-abhängig

ßend mit destilliertem Wasser von Salzen und weiteren Rückständen zu befreien. Anschließend werden die Platten zweimal mit 70% Ethanol abgespült, mit fusselfreiem Tuch abgewischt und die Gelelektrophoreseapparatur wird zusammengebaut.

Gießen des Trenngels (10%)

Zur Herstellung des Trenngels (10%) werden die in Tabelle V aufgeführten Lösungen verwendet.

Trenngel

	Trenngel (10%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0,8 %)	10 ml
bidest. Wasser	11,9 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,7),	7,5 ml
SDS (10 %),	300 µl
APS (10 %)	300 µl
TEMED	12 µl

Tabelle V Zusammensetzung Trenngel 10%

Nach Zugabe der beiden letzten Komponenten APS und TEMED wird die Lösung jeweils kurz gemischt und das Gel sofort mit Hilfe einer 5 ml Stabpipette gegossen. Direkt nach dem Gießen wird die Flüssigkeit mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um einen geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 2 Stunden wird n-Butanol vom polymerisierten Trenngel abgegossen und mit 2-3ml bidestiliertem Wasser gespült. Die verbliebenen Flüssigkeitsreste werden mit Whatman 3MM Filterpapier abgesaugt.

Gießen des Sammelgels (5%)

Das Sammelgel (5%) wird aus Lösungen der Tabelle VI hergestellt. Die Polymerisationsreaktion wird wiederum durch Zugabe von APS und TEMED gestar-

tet und das polymerisierten Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet. Direkt nach dem Gießen wird der Probenkamm eingesetzt. Nach ca. 1–2 h ist die Polymerisierungsreaktion vollständig abgelaufen und die Gele können mit den Proben beladen werden.

Sammelgel

Sammelgel (5%)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0,8 %)	2,5 ml
bidest. Wasser	10,2 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,7),	1,8 ml
SDS (10 %),	150 µl
APS (10 %)	150 µl
TEMED	15 µl

Tabelle VI Zusammensetzung Sammelgel 5%

Vorarbeiten für den Gellauf:

Nach vollständiger Polymerisation wird das Gel in die Gelelektrophoreseapparatur, Pharmacia Biotech, eingebaut und die Behälter mit Laufpuffer (vgl. Tabelle VII) gefüllt. Anschließend wird der Probenkamm entnommen und zweimal mit Laufpuffer (Elektrophoresepuffer) gewaschen.

Elektrophoresepuffer/Laufpuffer

Elektrophoresepuffer (5x):

Tris Base	15,1 g
Glycin,	94 g
SDS	10 g
→ in 900ml Aqua bidest. lösen und auf pH 8,3 einstellen und auf 1000ml auffüllen	

Tabelle VII Zusammensetzung Elektrophoresepuffer/Laufpuffer

Probenvorbereitung für den Gellauf:

In 1,5 ml Eppendorf-Cups werden jeweils 60 µl Probe und 20 µl Probenauftragungspuffer (Roti[®]Load1,4x-Konz., Roth) pipettiert und für 10 Minuten bei 99°C im Thermomixer comfort, Eppendorf, inkubiert. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

In jede Tasche werden 80 µl Probe aufgetragen. In eine Geltasche wird der Standardmarker Full Range Rainbow[™], Recombinant Protein Molecular Weight Marker, Amersham BIOSCIENCES UK limited, mit Probenauftragungspuffer auf das Gel aufgetragen.

Der Probeneinlauf erfolgt mit konstanter Spannung (100 V) für 1 Stunde und die Auftrennung der Proben bei 60 Volt über Nacht.

Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hat.

3.6.3 Western Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA Nachweisverfahren Southern- und Northern-Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird [118,119]. Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen (das eigentliche Blotting). Die immobilisierten Proteine werden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durchgesetzt haben sich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper – der gegen den F_c-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist – verwendet wird, der mit einem Enzym gekoppelt ist, das eine leicht detektierbare Reaktion katalysiert.

Vorbereitung der PVDF-Membran (Hybond P, Amersham):

Die Membran wird vollständig mit Methanol benetzt, dann 5 Minuten in bidestilliertem Wasser zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln eingeweicht (Wasser 2–3 mal wechseln) und abschließend für 15 Minuten in Blotpuf-

fer (vgl. Tabelle VIII) eingeweicht, wobei darauf geachtet werden muss, dass die relativ hydrophobe PVDF-Membran immer vollständig benetzt ist.

Blotpuffer

		Endkonzentration
Tris	2,42g	48 mM
Glycin	11,26 g	39 mM
ddH ₂ O	700ml	
	→ pH auf 8,3 einstellen	
Methanol	200ml	20%(v/v)
	→ Mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen	

Tabelle VIII Zusammensetzung Blotpuffer

Zusammenbau des Blot-Sandwichs:

Vier Whatman 3MM Filterpapiere werden auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer (vgl. Tabelle VIII) eingeweicht. Ein Schwamm und zwei mit Blotpuffer getränkte Whatman Papiere werden luftblasenfrei auf den Kathodendeckel der passenden Mylarmaske (abhängig von der Gelgröße) der Semi-Dry Blottapparat (Semiphor, Hoefer) aufgelegt, dann das Trenngel. Die vorbereitete Membran wird auf das Gel gelegt (luftblasenfrei). Wegen der einsetzenden Bindung der Proteine an die Membran sollte die Membran nach Möglichkeit nicht mehr nachträglich gegen das Gel verschoben werden. Abschließend werden die restlichen zwei Whatman Papiere und ein Schwamm aufgelegt.

Proteintransfer (Blotting):

Die Semi-Dry-Apparatur wird mit dem Anodendeckel geschlossen, in die Blotkammer eingesetzt und die Proteinproben mit einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 90 Minuten bei Raumtemperatur geblottet.

3.6.4 ECL-Detektionssystem

Das enhanced-chemiluminescence (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper markiert werden. Die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oxidiert ein geeignetes organisches Substrat – das Diacylhydrazid Luminol – unter Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O . Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand, aus dem es unter Lichtemission, die mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird, wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Reaktion erreicht ca. fünf Minuten nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. In Abb. 17 ist das Funktionsprinzip des ECL-Systems schematisch dargestellt.

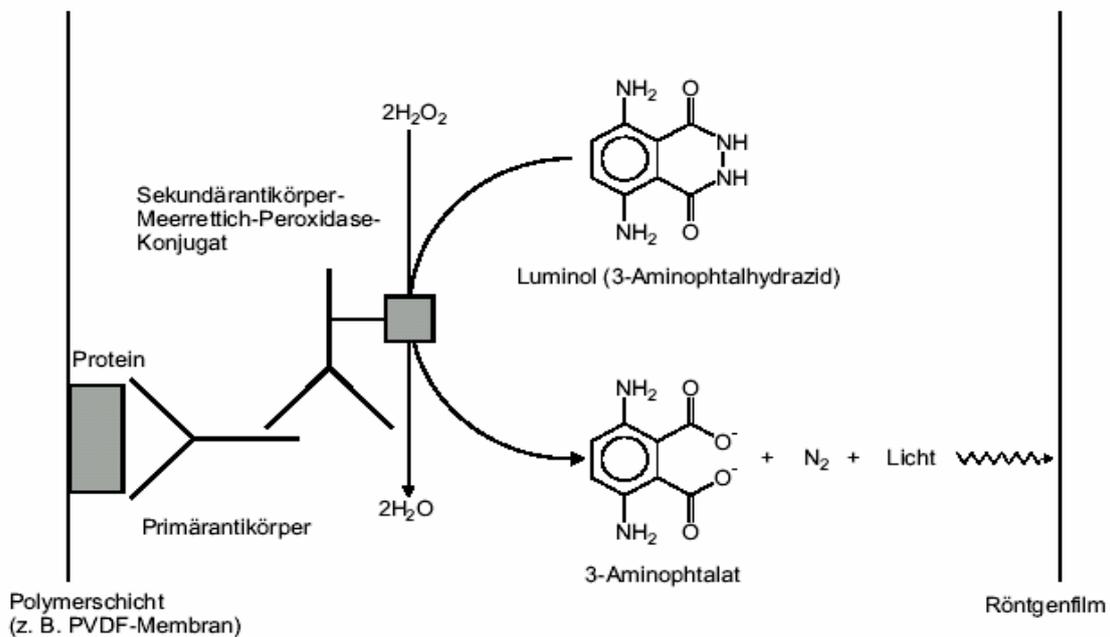


Abb. 17 Prinzip der ECL-Detektion. An das immobilisierte Protein bindet der Primärantikörper, welcher für das zu detektierende Protein spezifisch ist. Dessen Fc-Teil wird vom Sekundärantikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Diese setzt das Substrat Luminol in einer lichterzeugenden Reaktion um. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert.

Durchführung:

Die Membran wird für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln in 50-100ml Block-Lösung inkubiert, um diese zu blocken. Die Block-Lösung wird anschließend verworfen. Die Antikörper-Verdünnung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und auf die geblockte Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-Verdünnung kann mehrfach verwendet werden, und sollte dazu bei 4°C gelagert werden.

Am folgenden Tag wird die Antikörper-Lösung entfernt und die an die Membran nicht gebundenen Immunglobuline durch 3 x 10 Minuten mit je 50 ml TBS-T abgewaschen. Die Antikörper-HRP-Konjugat-Verdünnung (Sekundäantikörper) wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und auf die gewaschene Membran gegeben. Unter Schütteln wird die Membran mit dem Sekundäantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundäantikörperlösung wird entfernt und verworfen und die Membran für 6 x 10 Minuten mit je 50 ml TBS-T gewaschen. Die gewaschene Membran wird auf einen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel überführt, und zur Detektion werden je 7,5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 gemischt und auf die Membran geben und für 3 Minuten inkubiert.

Anschließend wird die Membran in einen neuen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel überführt, ohne dass sich Luftblasen bilden sollten, und folgend in die Filmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wird der ECL-Hyperfilm für 15 - 30 Sekunden Belichtung aufgelegt, die anhand der Intensität der Banden abgeschätzt wird, um ein optimales Ergebnis zu erhalten.

Material und Antikörper für die ECL-Detektion:

Bei der ECL-Detektion wird die TBS-Lösung, wie in Tabelle IX angegeben, verwendet. TBS-T ist eine Lösung aus 1 l TBS versetzt mit 200 µl Triton X-100 und einem pH- Wert von 7,5. Die Block-Lösung (Roti[®] - Block, Roth) wird mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Als Primäantikörper wird für Vinculin der Monoklonale Maus-Antikörper (SIGMA; 1:5000) und für den Nachweis des SuperCD Proteins der Primäantikörper Polyklonales Ratten-Antiserum gegen FCUI (Transgene; 1:2000) verwendet. Als Sekundäantikörper (Antikörper-

HRP-Konjugat) werden anti-Maus-IgG (Biorad, 1:40 000) und anti-Ratte-IgG (Chemicon, 1:10 000) eingesetzt.

TBS:

		Endkonzentration
NaCl	8,76g	150mM
Tris	1,57g	13mM
H ₂ O	900ml	

→ mit HCl auf einen pH von 7,5 einstellen und auf 1l mit H₂O auffüllen

Tabelle IX Zusammensetzung TBS

3.7 Bestimmung IC 50 5-FU

Die Bestimmung der IC 50 für 5-Fluorouracil wurde für jede Zelllinie (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2) zeitlich vor den Virustransduktionsversuchen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Richtwerte für die Wahl der 5-FU – Konzentrationen für die Infektion der Zellen mit AdvSCD und AdvGFP und Inkubation 5-FC bzw. 5-FU verwendet. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde der MTT-Assay EZ4Y für die Anwendung in 24 Well-Platten etabliert. Des Weiteren wurde die optimale Zellzahl für eine 7-Tageskultur in 24 Well jeder Zelllinie bestimmt.

3.7.1 Proliferationstest MTT-Assay

In der Zellbiologie sind Proliferationstests eine häufig angewandte Methode, um Wachstumsfaktoren, Zytokine, Nährstoffe, zytotoxische und chemotherapeutische Substanzen quantitativ zu messen. Es werden verschiedene Verfahren verwendet, um die Anzahl der Zellen zu bestimmen. Die Bestimmung der Zellzahl kann durch direktes Auszählen unter dem Mikroskop, mit Hilfe eines elektronischen Teilchenzählers, durch indirekte Radioaktivitätsmessung, anhand der Bestimmung des Gesamtproteins mit chromogenen Farbstoffen oder aus der Umsatzrate von zellulären Enzyme erfolgen.

Im Jahre 1956 wurde zum ersten Mal eine Publikation über die Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Indikator für die Zellvitalität veröffentlicht [120]. Diese Methode beruhte auf der Entdeckung, dass von lebenden Zellen farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können. Diese Reduktion erfordert intakte Mitochondrien, die innerhalb weniger Minuten nach dem Absterben der Zelle inaktiv werden. Hieraus ergibt sich eine ausgezeichnete Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen [120].

In dieser Arbeit wurde von der Biomedica Gruppe der „EZ4U“ Assay verwendet. Das Assay-Schema für 96 Well (Angabe des Herstellers) [121]:

1. Substrat und Aktivator auf 37°C anwärmen
2. Substrat in 2,5 ml Aktivator lösen
3. 20 µl Substratgemisch in jedes Well pipettieren
4. 2-5 Stunden bei 37°C inkubieren
5. Absorption bei 450 (492)nm mit 620 nm als Referenz im ELISA-Reader messen

Die Zellproliferationsversuche dieser Arbeit wurden nicht in 96 Well, sondern in 24 Well durchgeführt. Daher wurde der MTT-Assay für die Anwendung in 24 Well etabliert.

Assay Schema für 24 Well-Platten

1. Substrat und Aktivator auf 37°C anwärmen
2. Substrat in 2,5 ml Aktivator lösen
3. Substrat-Aktivator-Gemisch 1:10 mit frischem auf Raumtemperatur angewärmten DULBECCO`s MEM mischen (2,5 ml Substrat – Aktivatorgemisch + 22,5 ml DULBECCO`s MEM)
4. Medium vollständig aus jedem 24 Well entfernen
5. Zugabe von 200 µl 1:10 verdünntem Substrat-Aktivator-Gemisch
6. Inkubation für 2-5 Stunden bei 37°C
7. 100 µl pro Well in eine sterile 96-Well-Platte pipettieren

8. 3 X 100 μ l 1:10 verdünnte Substrat-Aktivator-Gemisch als Leerwert pipettieren
9. Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm als Referenz im ELISA-Reader

Auswertung:

Von jeder Probenextinktion wird der Extinktionsmittelwert ($n=3$) des Leerwertes (Substrat-Aktivator-Gemisch 1:10 verdünnt ohne Probe) subtrahiert.

Durchführung:

Für jede Zelllinie wurde die Konzentration von 5-FU bestimmt, die notwendig ist, um 50% der Zellen absterben zu lassen (IC 50 = Inhibition concentration 50%).

In Vorversuchen wurde die entsprechende optimale Konzentration für die Fünftageskultur mit 5-FU für jede Zelllinie in 24-Well-Platten bestimmt.

Für die einzelnen Zelllinien ergaben sich unterschiedliche Zellzahlen pro Well:

HepT1: 1×10^4 Zellen/Well

HepT3: 1×10^5 Zellen/Well

HUH6: 5×10^3 Zellen/Well

HepG2: 4×10^4 Zellen/Well

Die Zellzahl wird mit dem Hämocytometer Neubauer (vgl. 3.1.2.4) bestimmt und in jedes Well werden 400 μ l der Zellsuspension pipettiert.

Ein Mediumwechsel wird nach 24 Stunden Inkubation im Inkubator der Firma Heraeus BBD 6220 (37°C 10%CO₂ 95%rH) durchgeführt und durch Medium mit 5-FU-Konzentrationen im Bereich von 0 – 30 μ g/ml ersetzt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubationszeit im Inkubator der Firma Heraeus BBD 6220 (37°C 10%CO₂ 95%rH) erfolgt erneut ein Mediumwechsel mit den jeweiligen entsprechenden 5-FU-Konzentrationen. Der Proliferationstest erfolgt nach weiteren 72 Stunden Inkubation im Inkubator der Firma Heraeus BBD 6220 (37°C 10%CO₂ 95%rH), wie bereits im vorangegangenen Punkt näher erläutert wurde.

Der Einfluss von 5-FU auf das Wachstum der Zellen wird mit folgender Formel berechnet. Zielgröße war jeweils der IC 50 Wert:

$$\%IC = (\text{Absorption behandelte Zellen} : \text{Absorption unbehandelte Zellen}) \times 100$$

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden alle Versuche nach einigen Tagen wiederholt und darüber hinaus in Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

3.8 Transduktion AdvSCD/AdvGFP mit 5-FC/5-FU-Therapie

Zur Bestimmung der Funktionalität der durch virale Vektoren vermittelte Suizidgenaktivität werden zunächst die Zielzellen mit dem Virus, in dieser Arbeit mit dem AdenovirusSuperCD, transduziert und anschließend mit dem Prodrug 5-FC behandelt. Mittels des MTT-Assay kann die suizidgenvermittelte Abtötung quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden die Zellen zum einen mit dem AdSuperCD und mit dem AdGFP transduziert. Der AdGFP dient als in vitro Transduktionskontrolle, um rein adenoviral vermittelte Effekte auszuschließen.

Nach der Virustransduktion wurden die Zelllinien (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2) zum einen mit dem Prodrug 5-FC sowie mit dem Zytostatikum 5-FU für fünf Tage inkubiert. Folgend die detaillierte Beschreibung des Versuchprotokolls.

Durchführung:

Die Aussaat der Zellen erfolgt für HepT1, HUH6 und HepG2 jeweils 24 Stunden vor Infektion in 24 Well-Platten der Firma Becton Dickinson Labware. Die Zelllinie HepT3 wird aufgrund ihres langsamen Wachstums und schlechter Passagierbarkeit 5 Tage vor der Virustransduktion in 24 Well-Platten Becton Dickinson Labware ausgesät. Am Tag der Virustransduktion wird aus einer zusätzlichen ausgesäten 24-Well-Platte die Zellzahl pro Well bestimmt. Dazu werden 12 Wells jeweils mit 100 µl Trypsin pro Well abtrypsiniert und die Reaktion

durch Zugabe von 300 µl DULBECCO`s MEM gestoppt. Die Bestimmung der Zellzahl pro Well erfolgte nach der beschriebenen Methode im Abschnitt 4.3.1.4.

Für jede Zelllinie wurde die optimale Zellzahl in Vorversuchen ermittelt. Das entscheidende Kriterium war ein konfluentes Zellwachstum der Zellen, welche keine Behandlung noch Infektion erhalten hatten. Es resultierten folgende Zellzahlen für die Zellaussaat:

HUH6 : 5 x 10³ Zellen/Well
HepT1: 2 x 10⁴ Zellen/Well
HepG2 4 x 10⁴ Zellen/Well
HepT3: 7 x 10⁴ Zellen/Well

In jedes Well werden 500 µl Zellsuspension in DULBECCO`s MEM (10% FCS, +1% Glut, 2,5% HEPES-Puffer) ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator der Firma Heraeus BBD 6220 (37°C 10%CO₂ 95%rH) inkubiert. Für jede Zelllinie werden pro Versuch sechs 24 Well-Platten ausgesät.

Nach mikroskopischer Beurteilung der Zellvitalität anhand des Mikroskops Fluovolt FS, LEITZ erfolgt die Virustransduktion und Behandlung der Zellen mit 5-FC und 5-FU.

Für jede Zelllinie werden jeweils zwei 24 Well-Platten mit AdSuperCD (MOI 50) und zwei weitere Platten mit AdGFP (RSV Promotor, MOI 50) transduziert und zusätzlich zwei Kontrollplatten mitgeführt.

Das Medium wird für die Transduktion vollständig mit einer Stabpipette entfernt und jedes Well mit 200 µl PBS gewaschen. Daraufhin erfolgt die Transduktion mit 500 µl AdSuperCD (MOI 50) bzw. AdvGFP (RSV Promoter, MOI 50) in FCS freiem DULBECCO`s MEM und im Anschluss die Inkubation für eine Stunde im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂).

Die Kontrollplatten werden mit 200 µl PBS pro Well gewaschen und ebenfalls für eine Stunde im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) inkubiert.

Nach der Inkubation wird das Medium vollständig mit einer Stabpipette entfernt und durch 500 µl DULBECCO`sMEM (10%FCS, 1 % Glut, 2,5 % HEPES-Puffer) ersetzt.

Die Transduktion wird mittels des AdvGFP (RSV Promotor) anhand des Fluoreszenzmikroskopes (IX 50 – S 8F2, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD) nach 24 Stunden kontrolliert und 72 Stunden nach der Virustransduktion als Fluoreszenzbilder dokumentiert.

Nach 24 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) und Beurteilung der Zellvitalität unter dem Mikroskop CK 40 – F 200 der Firma OLYMPUS OPTICAL CO. LTD wird das Medium vollständig mit einer Stabpipette abgenommen und durch 500 µl DULBECCO`sMEM (10%FCS, 1% Glut, 2,5% HEPES-Puffer) mit ansteigenden Konzentrationen von 5–FC (0-10 mM) bzw. 5-FU (0–1,152 mM) ersetzt (vgl. Abb. 18; Abb. 19).

Zelllinie + Kontrolle/SCD/GFP+ 5 FC [mM]

Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	0,3 mM 5 –FC	0,3 mM 5 –FC	0,3 mM 5 –FC
0,001 mM 5–FC	0,001 mM 5 –FC	0,001m M 5 –FC	1,0 mM 5 –FC	1,0 mM 5 –FC	1,0 mM 5 –FC
0,03 mM 5 –FC	0,03 mM 5 –FC	0,03 mM 5 –FC	3 mM 5 –FC	3 mM 5 –FC	3 mM 5 –FC
0,1 mM 5 –FC	0,1 mM 5 –FC	0,1 mM 5 –FC	10 mM 5 –FC	10 mM 5 –FC	10 mM 5 –FC

Abb. 18 24 Well-Platte, Konzentrationen 5-FC[mM]

Zelllinie +Kontrolle/SCD/GFP+ 5 FU [mM]

Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	0,1152 mM 5-FU	0,1152 mM 5-FU	0,1152 mM 5-FU
0,00384 mM 5-FU	0,00384 mM 5-FU	0,00384 mM 5-FU	0,192 mM 5-FU	0,192 mM 5-FU	0,192 mM 5-FU
0,0192 mM 5-FU	0,0192 mM 5-FU	0,0192 mM 5-FU	0,384 mM 5-FU	0,384 mM 5-FU	0,384 mM 5-FU
0,0384 mM 5-FU	0,0384 mM 5-FU	0,0384 mM 5-FU	1,152 mM 5-FU	1,152 mM 5-FU	1,152 mM 5-FU

Abb. 19 24-Well-Platte, Konzentrationen 5-FU [mM]

Nach 48 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) und mikroskopischen Evaluation der Zellvitalität anhand des Mikroskops CK 40–F 200 der Firma OLYMPUS OPTICAL CO. LTD wird das Medium erneut vollständig mit einer Stabpipette abgenommen und durch frisches DULBECCO`sMEM (10%FCS, 1% Glut, 2,5% HEPES-Puffer) der entsprechenden 5-FC- bzw. 5-FU-Konzentrationen ersetzt. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation im Inkubator Biosafe eco, INTEGRA BIOSCIENCES (37°C, 5,0% CO₂) und erfolgter mikroskopischer Evaluation der Zellvitalität anhand des Mikroskops CK 40 – F 200 der Firma OLYMPUS OPTICAL CO. LTD, wird der MTT-Assay, wie bereits in 4.3.1.2 beschrieben, durchgeführt.

Die Messung der Absorption erfolgt im ELISA-Reader GENIOS Plus der Firma TECAN mithilfe des Programms X-Flour4.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden alle Versuche wiederholt und darüber hinaus in Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

3.9 Promotorassay HUH6

Bei diesem Versuch werden die beiden Zelllinien HUH6 und HepG2 mit zwei Adenoviren infiziert, die das GFP Protein exprimieren. Die Viren unterscheiden sich in ihrem Promotor, AdGFP RSV und AdGFP CMV.

Durch FACS-Analyse wird die Transduktionseffizienz der beiden Viren auf die jeweilige Zelllinie quantifiziert.

Die Zelllinien werden wie bereits unter 3.5 erläutert in 6-Well ausgesetzt und nach dem in 3.2.3 beschriebenen Verfahren mit jeweils 50 MOI transduziert.

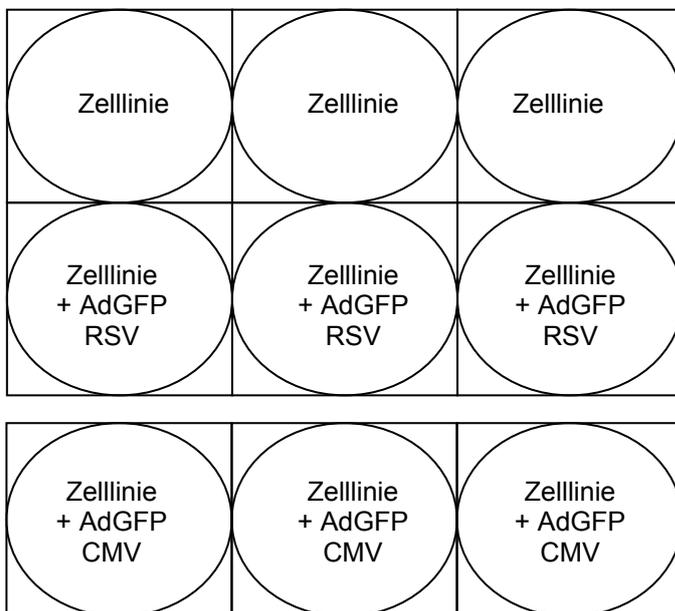


Abb. 20: 6-Well Promotorassay HUH6 und HepG2 mit AdGFP mit CMV Promotor und AdGFP mit RSV Promotor

Nach 48 Stunden Inkubation werden zunächst Fluoreszenzbilder aufgenommen und anschließend jede Probe in dreifach Bestimmung quantitativ durch FACS analysiert. Die Probenisolierung und FACS-Analyse wurden analog wie bei der Bestimmung der Transduktionseffizienz mit FACS durchgeführt (vgl. 3.5).

3.10 Statistische Analyse

Die Auswertung zur Bestimmung des Suizidgeneffektes erfolgte mittels der Software JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) nach der Methode der nicht-linearen Regression von der Extinktion auf die Konzentration.

3.10.1 Rechenmodell der nicht-linearen Regression

Zur Quantifizierung des Suizidgeneffektes wurde der IC 50 Wert jeder Zelllinie bei entsprechender Behandlung (5-FU/5-FC) und entsprechender Gruppe (keine Transduktion/Kontrolle, Transduktion mit AdGFP, Transduktion mit AdSuperCD) anhand der Software JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) nach der Methode der nicht-linearen Regression der Extinktion bezogen auf die Konzentration berechnet.

Eine von einem Maximum m auf ein Minimum a fallende Emax-Kurve wurde so parametrisiert, dass die Interpretation der EC 50, also der Konzentration, die die Hälfte des maximalen Effektes ($m - a$) bewirkt, auf IC 50 verändert wurde, also die Konzentration, die die Extinktion auf die Hälfte der Maximalen Extinktion inhibiert. Die Funktion hat die Form:

$$y_{i,j,k,l}([c]_k) = m \left(1 - a_{i,j} \frac{[c]_k}{m_{i,j} \cdot [c]_k + (2a_{i,j} - m)IC50_{i,j}} \right) + \varepsilon_{i,j,k,l} \text{ mit}$$

$m_{i,j}$ maximale Extinktion, welche bei Konzentration Null erreicht wird bei Behandlung i und Zelllinie j ;

$a_{i,j}$ minimale Extinktion, welche bei unendlicher Konzentration erreicht wird;

$[c]_k$ Konzentration von 5-FU bzw. 5-FC (vgl. Abb. 18, Abb. 19)

IC 50 _{i,j} die Konzentration, bei der die Extinktion die Hälfte der maximalen Extinktion ist;

$\varepsilon_{i,j,k,l}$ die normalverteilten Residuen mit Erwartungswert 0 und Standardabweichung σ ;

$i \in \{\text{Kontrolle, AdGFP, AdSCD}\}$ die Behandlungsgruppe,

$j \in \{\text{HepT1, HepT3, HUH6, HepG2}\}$ die Zelllinie,

k Index der Konzentration,

$l \in \{1, 2, 3\}$ Index der Messwiederholung,

Die Behandlung mit verschiedenen Viren konnte die Modellparameter wie folgt verändern:

$$m_{i,j} = m_{0,j} \begin{cases} 1 & i = \text{Kontrollgruppe} \\ r_{SCD,j} & \text{falls } i = \text{AdSCD} \\ r_{GFP,j} & i = \text{AdGFP} \end{cases} ;$$

$$\ln \frac{a_{i,j}}{1-a_{i,j}} = \ln a_{0,j} + \begin{cases} 0 & i = \text{Kontrollgruppe} \\ l_{SCD,j} & \text{falls } i = \text{AdSCD} \\ l_{GFP,j} & i = \text{AdGFP} \end{cases} ;$$

$$\ln IC50_{i,j} = \ln IC50_{0,j} + \begin{cases} 0 & i = \text{Kontrollgruppe} \\ d_{SCD,j} & \text{falls } i = \text{AdSCD} \\ d_{GFP,j} & i = \text{AdGFP} \end{cases} .$$

Dem liegt die Vorstellung zugrunde, dass a nur zwischen 0 und 1 liegen kann und dass der Logarithmus der IC 50 eher einer Normalverteilung folgt. Die Ergebnisse wurden auf die ursprünglichen Einheiten zurück transformiert, z. B. $\exp(\ln IC50_0 + d_{SCD}) = IC50_{SCD}$, oder $\exp(d_{SCD})$ als Faktor, um den die IC 50 bei der AdSuperCD-Behandlung größer ist als bei der Kontrollbehandlung.

Ebenso ist r_{SCD} bzw. r_{GFP} der Faktor, um den die maximale Extinktion der AdSCD-/AdGFP-Behandlung größer ist als bei der Kontrollbehandlung.

Die Messungen wurden zur Darstellung alle durch m dividiert, also in % der Extinktion bei Konzentration Null angegeben, wovon r unberührt blieb.

Die Parameter wurden aus den dreifach gemessenen Extinktionen nach der Methode der kleinsten Quadrate geschätzt, und zwar für jede Kombination von Versuchsansatz und Zelllinie. Auf diese Weise erhielt man bis zu 33 Schätzwerte für einen Parameter unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Aus diesen Werten wurden in Varianzanalysen mit den Faktoren Gruppe (Niveaus GFP, SCD und manchmal auch Kontrolle) und Zelllinie und deren Wechselwirkung mittlere Werte berechnet. Dabei konnten Konfidenzintervalle für die Parameter oder deren Unterschiede geschätzt werden. Wiederum bedurften einige Ergebnisse der Rücktransformation, etwa weil die Logarithmen der IC 50 die Daten der Varianzanalyse waren. So wurden also geometrische Mittelwerte der IC 50 berechnet. In den Varianzanalysen wurde allein die Varianz durch erneute Versuchsansätze als zufällige Varianz berücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Adenovirustransduktion (Immunfluoreszenz)

Für den Erfolg der Suizidgentherapie mit dem Adenovirus SuperCD ist die Transduktion der Hepatoblastomzellen (HepT1, HUH6, und HepT3) sowie der HCC-Zelllinie HepG2 mit dem Adenovirus essentiell. Deshalb wurde zuerst der Nachweis der Transduktion mit dem Adenovirus erbracht. Die Zellen wurden nach dem in 3.2.3 beschriebenen Vorgehen transduziert. Die direkte Immunfluoreszenz wurde für AdGFP (RSV Promotor) transduzierte Zellen durchgeführt (vgl. 4.1.1). Die indirekte Immunfluoreszenz, wie in 3.4 erläutert, wurde für transduzierte Zellen mit AdGFP (RSV Promotor) und AdSuperCD durchgeführt. Dafür wurden als 1. Antikörper Mouse Anti-Adenovirus Monoclonal Antibody (MAB 8052, Chemicon International) in einer Verdünnung von 1:200 und der Sekundärantikörper Cy3TM-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse-IgG (Jackson ImmunoResearch, LABORATORIES, INC) mit anschließender Kerngegenfärbung mit DAPI (SIGMA; Verdünnung 1:10 000) verwendet. Der 1. Antikörper Mouse Anti-Adenovirus Monoclonal Antibody bindet an das Adenohexonprotein des Adenovirus. Durch die Konjugation mit dem Sekundärantikörper kann durch einen roten Filter eine rote Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40 (HBO 50/AC, ZEISS) in 40-facher Vergrößerung unter selben Aufnahmebedingungen erstellt. Es wurden Bilder mit Durchlicht, blauem Filter, rotem Filter und grünem Filter aufgenommen. Zur Veranschaulichung und Auswertung wurden jeweils die Aufnahmen mit blauem und rotem Filter und die Aufnahmen mit blauem, rotem und grünem Filter übereinandergelegt.

4.1.1 AdvGFP – Kontrolle

Die Transfektion jeder Zelllinie mit Adenovirus GFP (RSV Promotor) diene als in vitro Transduktionskontrolle. Zellen, die mit dem AdGFP (RSV Promotor) transduziert wurden und das grün fluoreszierende Protein GFP (green fluorescent protein) produzieren, leuchten grün. Nach 48 Stunden wurde die direkte Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt, um die Transduktion zu bestätigen (vgl. Abb. 21). Die direkte Immunfluoreszenz hat den Vorteil, dass lebende Zellen ohne durch Zellfixierung eventuell erzeugte Artefakte, zu beobachten sind. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop mit installierter Kamera (Fluoreszenzmikroskop, IX 50 – S 8F2, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD) in drei verschiedenen Einstellungen und Vergrößerungen erstellt: Durchlicht, ohne Filter und grüner Filter.

Bei HepT1, HepT3 und HepG2 zeigte sich eine gute grüne Fluoreszenz mit AdGFP, bei HUH6 ist die Fluoreszenz schwächer ausgeprägt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz konnte die grüne Fluoreszenz des AdGFP (RSV Promotor) dafür verwendet werden, um die Spezifität des Antikörpers für das Adenohexonproteins zu bestätigen. Bei Adenohexonprotein positiven Zellen lässt sich in der indirekten Immunfluoreszenz zusätzlich die GFP-Fluoreszenz detektieren (vgl. Abb. 22), welche bei den Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 gut mit dem Nachweis des Adenohexonproteins korreliert. Bei der Zelllinie HUH6 ist die GFP-Fluoreszenz deutlich weniger ausgeprägt im Vergleich zur Detektion des Adenohexonproteins.

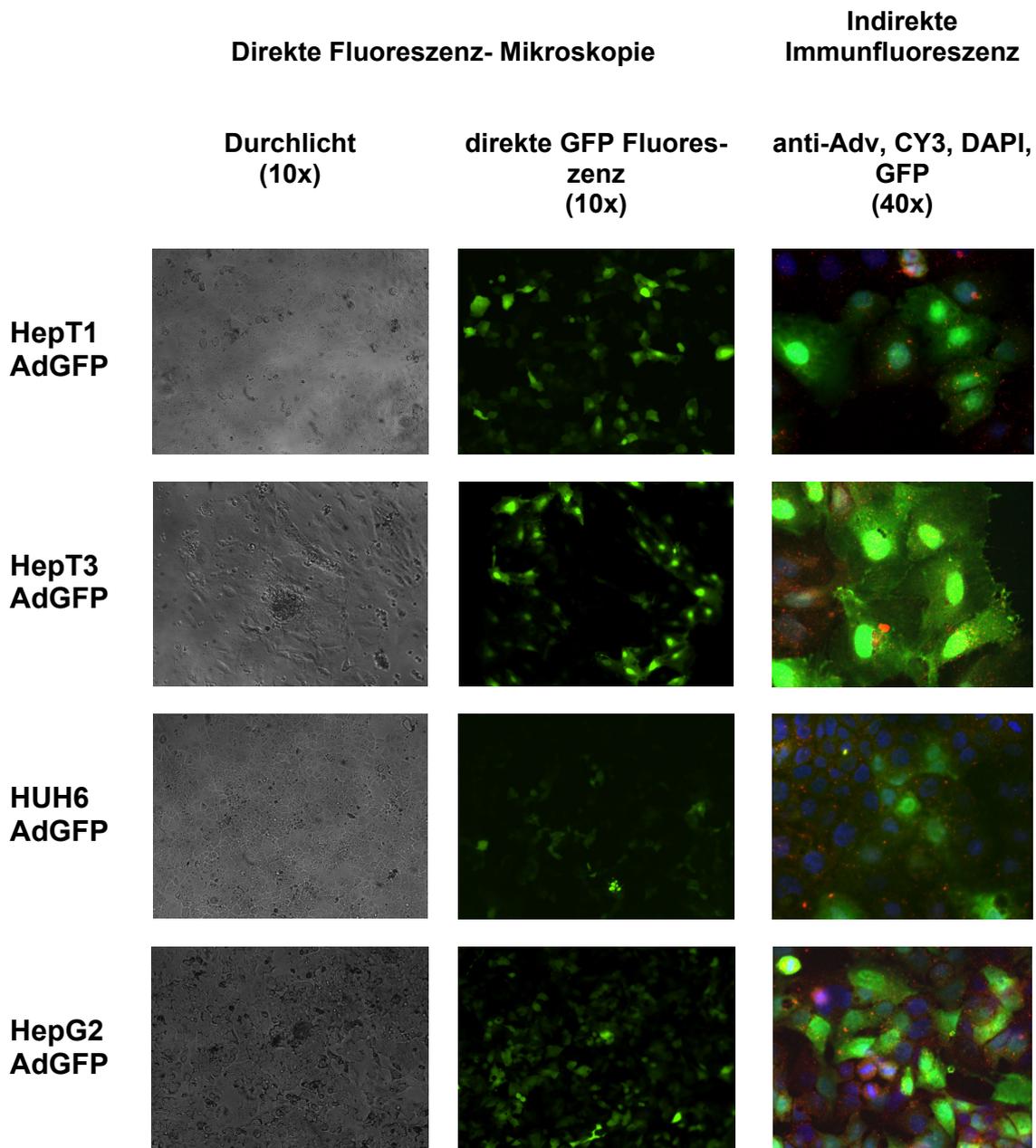


Abb. 21 Transduktion der Zellen mit AdGFP - direkte und indirekte Immunfluoreszenz: Mittlere Spalte (direkte GFP Fluoreszenz): Die grüne Fluoreszenz entspricht AdGFP transduzierten Zellen, die das grün fluoreszierende Protein GFP (green fluorescent protein) produzieren. Rechte Spalte (indirekte Immunfluoreszenz): Die grüne Fluoreszenz, entspricht wie in der mittleren Spalte, AdGFP transduzierten Zellen. Die blaue Fluoreszenz entspricht den Zellkernen und die rote Fluoreszenz dem Adenovirushexonprotein.

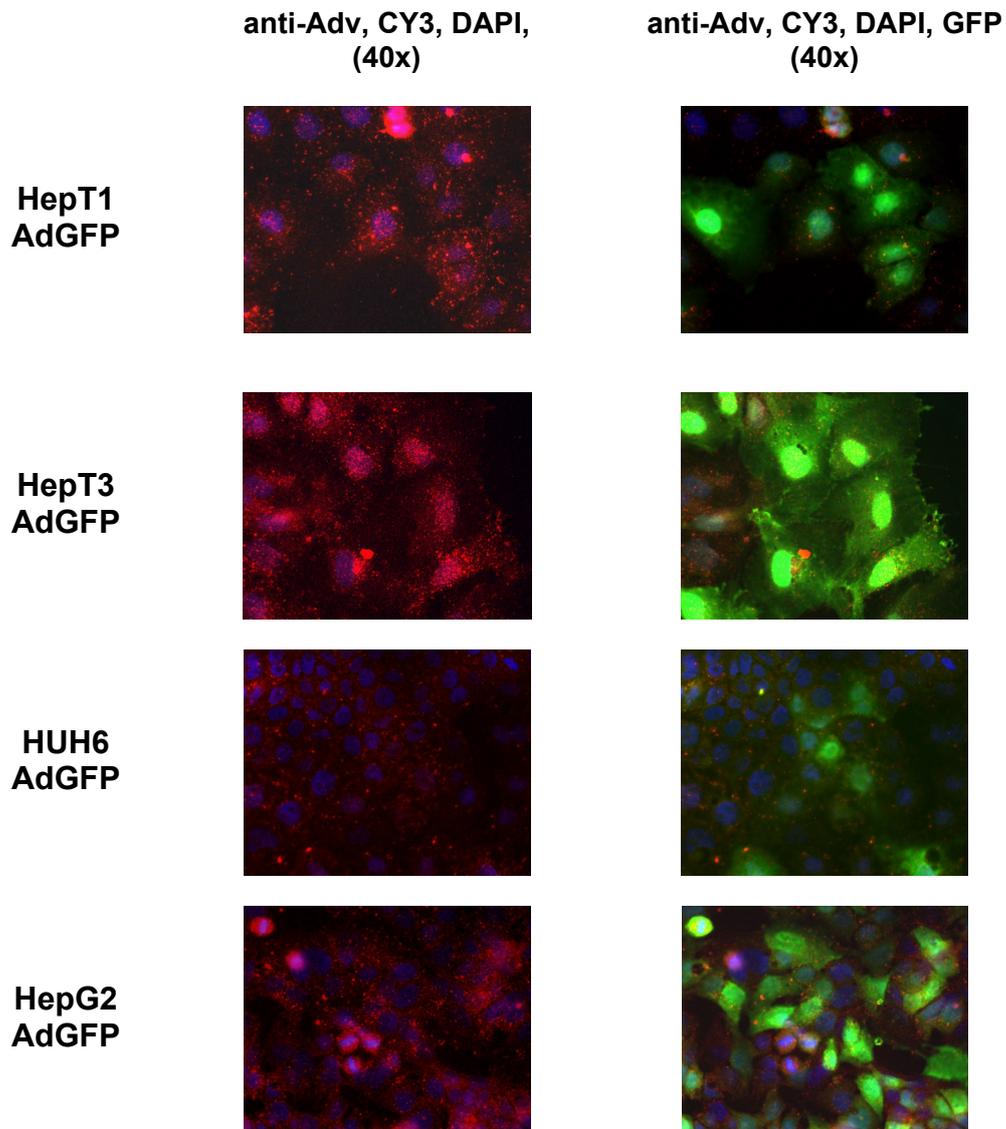


Abb. 22 Transduktion der Zellen mit AdGFP - indirekte Immunfluoreszenz; Gegenüberstellung DAPI+CY3 versus DAPI+CY3+grüne Fluoreszenz. Der Aufnahmeort für die Bilder der linken und rechten Spalte sind für jede Zelllinie identisch. In der linken Spalte (anti-Adv, CY3, DAPI) entspricht die blaue Fluoreszenz den Zellkernen und die rote Fluoreszenz dem Adenohexonprotein. In der rechten Spalten (anti-Adv, CY3, DAPI, GFP) entspricht die blaue Fluoreszenz den Zellkernen, die rote Fluoreszenz dem Adenohexonprotein und die grüne Fluoreszenz AdGFP transduzierten Zellen, die das grün fluoreszierende Protein GFP (green fluorescent protein) produzieren.

4.1.2 AdSuperCD

Die indirekte Immunfluoreszenz auf das adenovirale Hexonprotein AdenovirusSuperCD wurde für jede Zelllinie wie in 3.2.3 und 3.4 beschrieben durchgeführt und mit dem Fluoreszenzmikroskop IX50 –S 8F2, OLYMPUS OPTICAL CO. LTD, detektiert.

Bei allen vier Zelllinien (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2) lässt sich das Adenovirushexonprotein nach erfolgter Transduktion mit AdenovirusSuperCD nachweisen (vgl. Abb. 23). Der Transduktionsnachweis ist bei den Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 ausgeprägter als bei der Zelllinie HUH6.

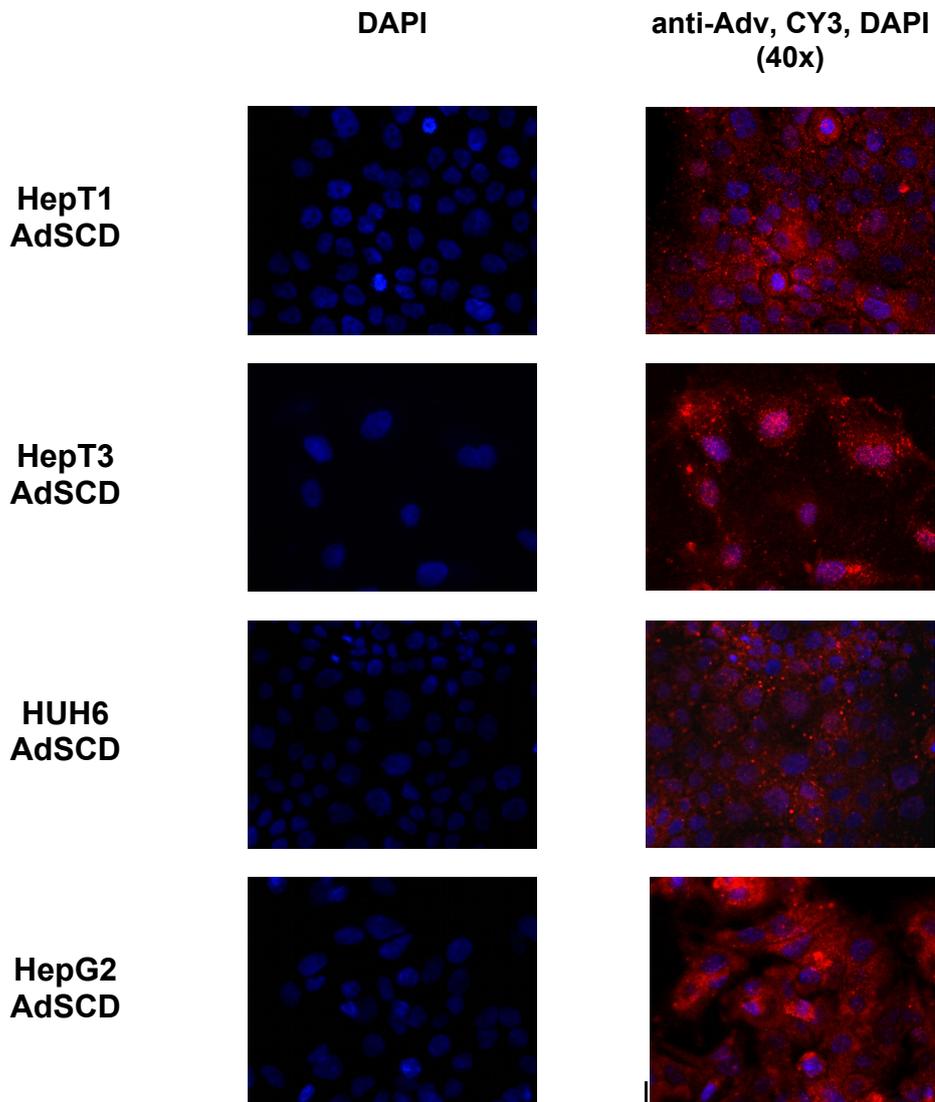


Abb. 23 Transduktion der Zellen mit AdSuperCD - indirekte Immunfluoreszenz
 Der Aufnahmeort für die Bilder der linken und rechten Spalte sind für jede Zelllinie identisch. Die blaue Fluoreszenz der linken Spalte entspricht den Zellkernen. In der rechten Spalte entspricht die rote Fluoreszenz dem Adenohehexonprotein. Hier wurde die rote und blaue Fluoreszenz übereinandergelegt.

4.1.3 Zusammenfassung Immunfluoreszenz

Durch die direkte und indirekte Immunfluoreszenz lässt sich die adenovirale Transduktion bei allen vier Zelllinien HepT1, HepT3, HUH6 und HepG2 mit AdGFP bzw. AdSuperCD nachweisen. Es sind Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu erkennen. Zur Quantifizierung dient im nächsten Schritt die FACS-Analyse.

4.2 Transduktionseffizienz (FACS)

Zur Quantifizierung der Transduktion mit dem Adenovirus AdGFP wurden die Zellen nach dem in Abschnitt 3.5 beschriebenen Protokoll mit AdGFP transduziert und 48 Stunden nach Infektion die GFP Expression mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) bestimmt.

Aus Dreifach-Bestimmungen wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (vgl. Abb. 24 und Tabelle X).

Alle Zelllinien zeigen eine gute Transduktionseffizienz bei geringer Standardabweichung.

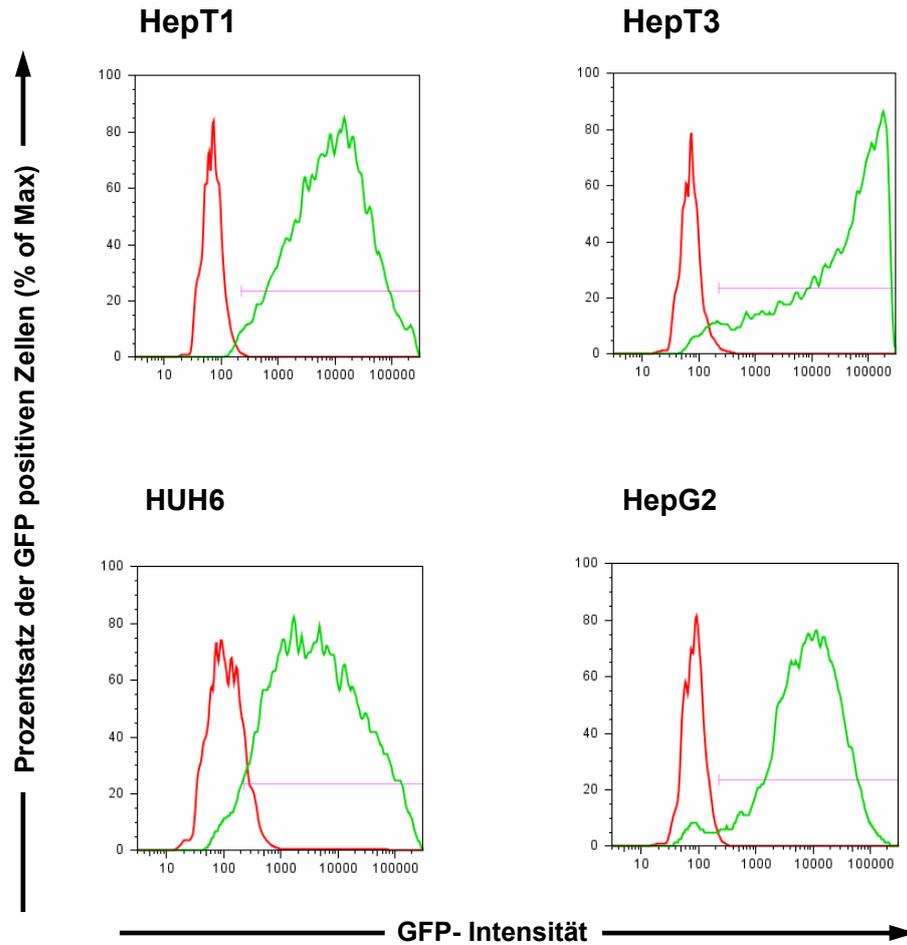


Abb. 24 Quantitative FACS-Analyse der GFP-Expression
 (rote Kurve = nichtinfizierte Zellen; grüne Kurve = Zellen mit AdGFP infiziert)

Tabelle zur Transduktionseffizienz (FACS)

Zelllinie	Kontrolle	AdGFP
HepT1	0,43%(0,2%)	98,67%(0,6%)
HepT3	4,02%(2,0%)	93,62%(1,4%)
HUH6	14,39%(1,7%)	87,79%(6,7%)
HepG2	0,27%(0,47%)	96,87%(0,37%)

Tabelle X Transduktionseffizienz mit AdGFP und Kontrolle
 (Stwd = Standardabweichung)

4.3 Western Blot –Nachweis SuperCD-Protein

Zum Nachweis der Expression des SuperCD-Proteins wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben und dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membran erfolgte der eigentliche Nachweis, wie unter 3.6 beschrieben.

Bei der Westernblotanalyse (vgl. Abb. 25) wurde Vinculin, ein Adhäsionsprotein eukaryonter Zellen, als Expressionsstandard verwendet. Es hat eine Länge von 116 kDa und wird an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran exprimiert. Als Positivkontrolle dienten Lysate der stabilen Zelllinie MH-SCD, welche das Super-Cytosindesaminase (SuperCD = SCD) Suizidgen stabil exprimiert (Spur 9) und dessen Bande seiner Aminosäurenlänge entsprechend bei 42 kDa erschien. Die Negativkontrollen waren Lysate der untransduzierten Zelllinien (Spuren 1-4). Dort waren keine spezifischen Banden erkennbar.

Die Spuren 5-8 zeigen die Lysate der mit Ad SuperCD transduzierten Zellen. Bei HepG2 (Spur 5), HepT1 (Spur 6) und HepT3 (Spur 7) lässt sich jeweils die SuperCD-Bande darstellen. Bei der Zelllinie HUH6 (Spur 8) konnte das SuperCD-Protein nicht nachgewiesen werden.

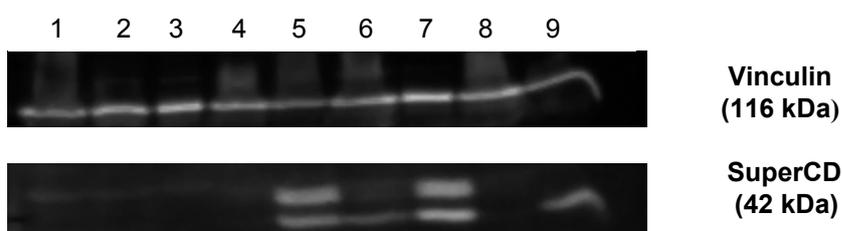


Abb. 25 Nachweis des SuperCD Proteins mittels Western Blotting.

- 1) HepG2 nicht transduziert (negativ Kontrolle)
- 2) HepT1 nicht transduziert (negativ Kontrolle)
- 3) HepT3 nicht transduziert (negativ Kontrolle)
- 4) HUH6 nicht transduziert (negativ Kontrolle)
- 5) HepG2 transduziert mit Ad SuperCD
- 6) HepT1 transduziert mit Ad SuperCD
- 7) HepT3 transduziert mit Ad SuperCD
- 8) HUH6 transduziert mit Ad SuperCD
- 9) stabil SuperCD exprimierende MH-Zelllinie (SuperCD-Positivkontrolle)

4.4 Quantifizierung des Suizidgeneffektes

Nach erfolgter Transduktion der Zellen mit dem suizidtragenden Virus Ad-SuperCD und anschließender Behandlung mit 5-FC bzw. 5-FU (vgl. 3.8) wurde mittels eines Proliferationstestes (MTT-Assay, vgl. 3.7.1) die Funktionalität und Wirkung des Suizidproteins überprüft. Für jede Zelllinie wurden daher Proliferationstests für nichttransduzierte, mit AdGFP und AdSuperCD transduzierte Zellen durchgeführt. Diese Gruppen wurden jeweils mit acht aufsteigenden Konzentrationen des Zytostatikum 5-FU (0 - 1,152 [mM]) bzw. dem Prodrug 5-FC (0 - 10,0 [mM]) über 6 Tage in Dreifach-Bestimmungen behandelt (vgl. 3.8). Die Proliferationsassays wurden für HUH6 zweifach, für HepT1, HepT3 und HepG2 jeweils dreifach zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt.

Die Quantifizierung des Suizidgeneffektes erfolgte anhand des Rechenmodells der nicht-linearen Regression wie in 3.10.1 erläutert. Die gemessenen Extinktionswerte der Proliferationstests sind im Anhang unter 9.2.4 aufgelistet.

4.4.1 Einfluss der adenoviralen Transduktion auf die Zellvitalität

Zum Ausschluss eines alleinigen Effektes des Transduktionsvorganges auf das Überleben der Tumorzellen wurde der Einfluss der adenoviralen Transduktion auf die Zellvitalität für jede Zell-Virus-Kombination bei Konzentration Null zur Kontrolle bei Konzentration Null bestimmt. Die Kontrolle bei Konzentration Null wurde als 100% festgelegt. Die einzelnen Werte der Zell-Virus-Kombinationen sind der Tabelle XI zu entnehmen. Die graphische Darstellung der geometrischen Mittelwerte des adenoviralen Einflusses auf die Zellvitalität ist in Abb. 26 dargestellt.

Einfluss adenoviraler Transduktion auf Zellvitalität

	HepT1		HepT3		HUH6		HepG2	
	AdGFP	AdSCD	AdGFP	AdSCD	AdGFP	AdSCD	AdGFP	AdSCD
gMW in %	71,35	86,64	119,75	78,06	65,08	88,03	86,22	86,09
95%-Konfidenz- interavall [%]	54,71- 93,05	69,75- 107,62	96,41- 148,75	62,84- 96,92	44,70- 94,75	67,50- 114,81	69,41- 107,10	69,31- 106,94

Tabelle XI Einfluss der adenoviralen Transduktion auf die Zellvitalität bei Konzentration Null (gMW =geometrischer Mittelwert für alle Versuche, 95%-Konfidenzintervall - Streuung zwischen den Versuchen)

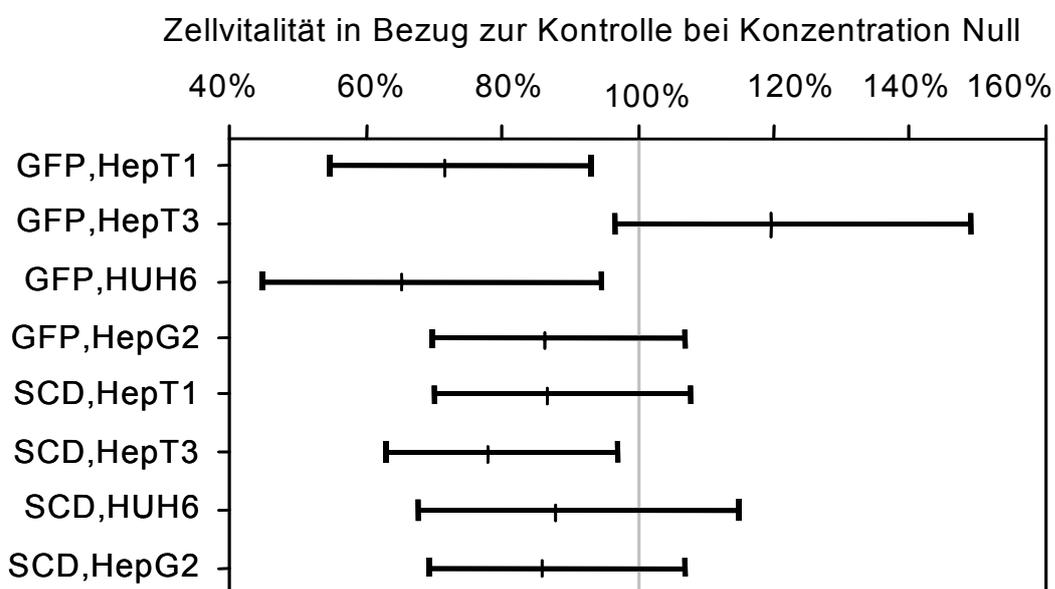


Abb. 26 Einfluss der Adenoviralen Transduktion, Darstellung des geometrischen Mittelwertes aller Versuche in % mit 95%- Konfidenzintervall der Zell-Virus-Kombinationen in % zur Kontrolle (Kontrolle = 100%) bei Konzentration Null

Der Einfluss der adenoviralen Transduktion der beiden Adenoviren AdGFP und AdSCD gemittelt über alle Zelllinien ergab das geometrische Mittel von 83,91% bei einem 95%-Konfidenzintervall von 76,69% bis 91,80%.

Die Zelllinie HepT3 mit AdGFP transduziert zeigte überdurchschnittliche Werte, welches auf das kumulative Wachstum der Zelllinie HepT3 zurückzuführen sind. Diese MTT-Assay-Werte bei HepT3 AdGFP waren nicht mit den mikroskopischen Beobachtungen vereinbar.

Insgesamt ist also der adenovirale Einfluss auf die Zellvitalität bei allen Zelllinien gering, so dass man bei der Beurteilung der MTT-Assays unter Behandlung mit 5-FU und 5-FC den rein adenoviralen Einfluss vernachlässigen kann.

4.4.2 Wirkung des Zytostatikum 5-Fluorouracil

Die untersuchten HB-Zelllinien und die HCC-Zelllinien zeigen eine Sensibilität gegenüber dem Zytostatikum 5-FU. Folgend sind die IC 50 Werte und die 95%-Konfidenzintervalle gemittelt über alle Versuche für die entsprechenden Behandlungsgruppen aufgeführt. Die IC 50 Werte und die 95%-Konfidenzintervalle wurden mittels des Rechenmodells der nicht-linearen Regression (vgl 3.10.1) berechnet. Das 95%-Konfidenzintervall berücksichtigt dabei auch die Streuung zwischen den Einzelversuchen.

4.4.2.1 Wirkung von 5-FU auf nicht-transduzierte Zellen

Die Zelllinie HUH6 zeigte sich am sensibelsten mit einer IC 50 von 0,0221 mM. Die anderen Zelllinien HepG2, HepT3, HepT1 waren zunehmend weniger sensibel gegenüber 5-FU. Die 5-FU- Behandlung der Zelllinie HepT1 erforderte die höchsten Konzentrationen von 5-FU zur Erreichung der IC 50.

In Tabelle XII sind die geometrischen IC 50 Mittelwerte und das 95% - Konfidenzintervall der Behandlungsgruppe Kontrolle angegeben:

IC 50 5-FU - Kontrolle

	HepT1	HepT3	HUH6	HepG2
IC 50 [mM]	0,3047	0,2028	0,0221	0,1402
95%-Konfidenzintervall [mM]	0,049-1,875	0,033-1,249	0,002-0,205	0,023-0,863

Tabelle XII IC 50 5-FU Kontrollzellen (IC 50 ist der geometrische Mittelwert in mM)

4.4.2.2 Wirkung von 5-FU auf Zellen nach Transduktion mit AdGFP

Die Zelllinie HUH6, transduziert mit AdGFP, reagiert am sensibelsten auf die Behandlung mit 5-FU. Es folgen in abnehmender Sensibilität HepT1, HepG2 und HepT3.

Die geometrischen IC 50 Werte für jede Zelllinie transduziert mit AdGFP bei Behandlung mit 5-FU sind in Tabelle XIII abgebildet.

IC 50 5-FU - AdGFP

	HepT1	HepT3	HUH6	HepG2
IC 50 [mM]	0,0760	0,4655	0,0213	0,2527
95%-Konfidenzintervall [mM]	0,008-0,704	0,076-2,866	0,001-0,496	0,041-1,556

Tabelle XIII IC 50 5-FU Zellen mit AdGFP transduziert (IC 50 ist der geometrische Mittelwert in mM)

4.4.2.3 Wirkung von 5-FU auf Zellen nach Transduktion mit AdSuperCD

Alle geometrischen IC 50 Mittelwerte der mit AdSuperCD transduzierten Zelllinien liegen zwischen 0,0228 mM und 0,1134. Die Zelllinie HUH6 war am sensibelsten gegenüber 5-FU und mit abnehmender Sensibilität folgen HepT3, HepG2 und HepT1.

Die Tabelle XIV zeigt die geometrischen IC 50 Mittelwerte der mit AdSuperCD transduzierten Zelllinien.

IC 50 5-FU - AdSuperCD

	HepT1	HepT3	HUH6	HepG2
IC 50 [mM]	0,1134	0,0813	0,0228	0,1071
95%-Konfidenzintervall [mM]	0,018-0,698	0,013-0,500	0,003-0,211	0,017-0,659

Tabelle XIV IC 50 5-FU, Zell mit AdSuperCD transduziert (IC 50 ist der geometrische Mittelwert in mM)

4.4.2.4 Graphische Darstellung 5-FU

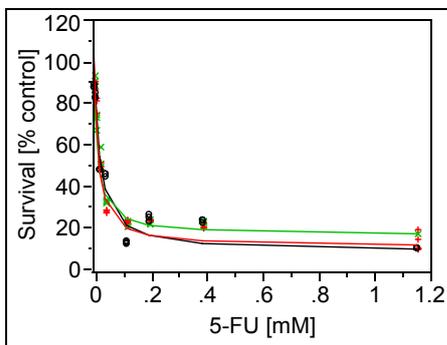
Exemplarisch sind im Folgenden für alle Zelllinien die Wirkung der 5-FU-Behandlung als Proliferationsassays graphisch dargestellt (vgl. Abb. 27). Die Schaubilder entsprechen jeweils einer Versuchswiederholung. Die Zelllinie HepT3 zeigte bei allen drei Versuchswiederholungen heterogene Ergebnisse in den Proliferationsassay. Diese sind dem Anhang (vgl. 9.2) beigefügt.

Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von 5-FU von 0 – 1,152 mM logarithmisch aufgetragen. Die Ordinate zeigt den Anteil vitaler Zellen in % im Bezug zur Kontrolle bei der Anfangskonzentration Null.

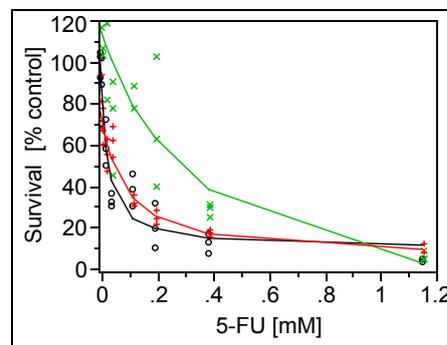
Die verwendeten Farben entsprechen der jeweiligen Behandlungsgruppe:

- Schwarz = Kontrolle
- Grün = AdGFP
- Rot = AdSuperCD

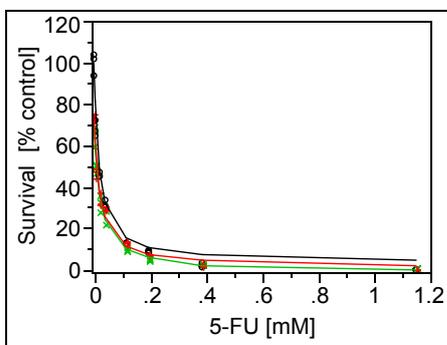
HepT1



HepT3



HUH6



HepG2

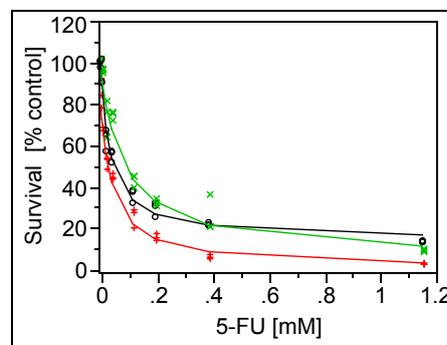


Abb. 27 Graphische Darstellung der Proliferationsassays bei Behandlung mit 5-FU für HepT1, HepT3, HUH6, und HepG2.

4.4.2.5 Zusammenfassung - Wirkung von 5-Fluorouracil

Bei den Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 zeigte sich eine Tendenz zu einer vermehrten Sensibilität gegenüber 5-FU nach Transduktion mit dem Adenovirus (AdGFP oder AdSCD). Bei HepT1 betrug die IC 50 im Mittel bei den Behandlungsgruppen AdGFP und AdSuperCD 37% der IC 50 der Kontrolle. Für HepT3 betrug die IC 50 der AdSuperCD Behandlungsgruppe 40% der Kontroll- IC 50 und für HepG2 betrug die IC 50 der AdSuperCD Gruppe 76% der Kontroll- IC 50.

Bei der Zelllinie HepT3 zeigten sich in allen drei Versuchswiederholungen eine unterschiedlich starke Sensibilität gegenüber 5-FU.

Bei der Zelllinie HUH6 zeigte sich kein Unterschied in der IC 50 in den einzelnen Behandlungsgruppen.

Die geometrischen IC-50-Mittelwerte der einzelnen Behandlungsgruppe für 5-FU wurden einander gegenübergestellt und in Abb. 28 in logarithmischer Einheit graphisch dargestellt.

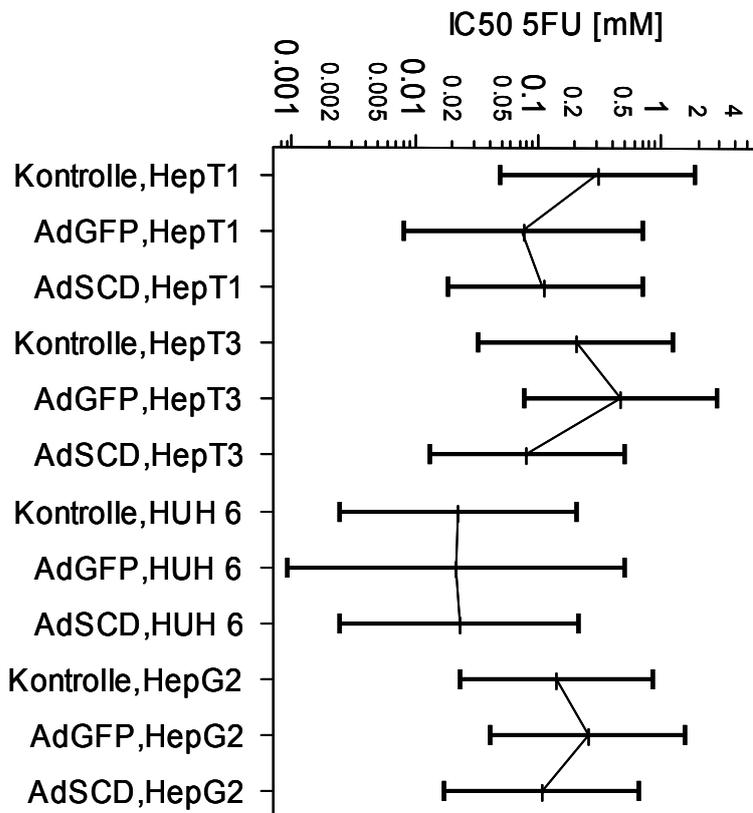


Abb. 28 Logarithmische Darstellung der gemittelten IC 50 5-FU [mM] und des gemittelten 95%-Konfidenzintervalls der Behandlungsgruppen Kontroll, AdGFP und AdSuperCD

4.4.3 Wirkung des Prodrug 5-Fluorcytosin

Das Prodrug 5-FC wird durch das Enzym Cytosindesaminase zu 5-FU metabolisiert. 5-FC kann seine Wirkung in Gegenwart dieses Enzyms entfalten (vgl.3.3.2). Dies soll durch die Transduktion mit dem suizidtragenden Virus AdSuperCD gewährleistet sein. Die alleinige Transduktion mit einem Adenovirus wie z.B. Adenovirus GFP hat keinen Einfluss auf die Wirkung des 5-FC. Daher diente in diesem Versuchsansatz die Behandlungsgruppe Adenovirus GFP als Negativkontrolle für den Adenovirus. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten keine unterschiedliche Vitalität verglichen mit den 5-FC behandelten Tumorzellen. Die Behandlungsgruppe Kontrolle war somit Negativkontrolle für die Wirkung von 5-FC ohne Anwesenheit der Cytosindesaminase. Das Wachstum der Kontrollzellen war von der alleinigen Anwesenheit des Prodrugs bei sehr hohen 5-FC-Konzentrationen aufgrund dessen Eigentoxizität in diesem Bereich beeinflusst.

Die Zelllinie HepG2 wurde als interne Positivkontrolle für die Suizidtherapie mit AdSuperCD verwendet, da der Effekt von 5-FC nach Transduktion durch Adenovirus SuperCD bei HepG2 bereits beschrieben wurde [130].

Unter den drei untersuchten Hepatoblastomen HepT1, HepT3 und HUH6 war nur bei HepT1 und HepT3 ein signifikanter Effekt von 5-FC/AdSuperCD erkennbar.

Die Zelllinie HepG2 zeigt den besten Suizidgeneffekt, gefolgt von HepT3 und HepT1. Bei der Zelllinie HUH6 lag die gemittelte IC 50 bei 10mM. Bei dieser hohen Konzentration ist die Wirkung des 5-FC auf dessen Eigentoxizität zurückzuführen. Es ist zu beobachten, dass die Konfidenzgrenzen bei HepT3 sehr extreme Werte annehmen, was im Wachstumsverhalten dieser Zellen (vgl. 4.4.1) begründet ist.

In Tabelle XV ist die gemittelte IC 50 und das berechnete 95%-Konfidenzintervall über drei Versuchswiederholungen angegeben.

IC 50 5-FC – AdSuperCD

	IC 50 [mM] gemittelt	95% KI [mM] gemittelt
HepT1	0,6397	0,020-20,747
HepT3	0,262	0,001-101,5
HUH6	10,027	0,239-420,5
HepG2	0,128	0,009-1,8164

Tabelle XV IC 50 5-FC [mM] mit AdSuperCD transduziert, geometrischer Mittelwert IC 50 [mM], 95%-Konfidenzintervall [mM] des geometrischen Mittelwertes

4.4.3.1 Graphische Darstellung 5-FC

Der durch Adenovirus SuperCD vermittelte Suizidgeneffekt mit dem Prodrug 5-FC ist im Folgenden exemplarisch für jede Zelllinie graphisch als Proliferationsassay dargestellt (vgl. Abb. 29). Die Schaubilder entsprechen jeweils einer Versuchswiederholung

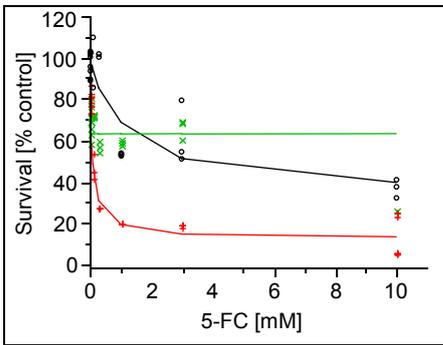
Für die HB-Zelllinie HepT3 sind im Anhang (vgl. 9.2.2 und 9.2.3) die Schaubilder für die Versuchswiederholungen I-III, aufgrund der Heterogenität der Einzelergebnisse in den Proliferationsassays, abgebildet.

Auf der Abszisse sind die 5-FC Konzentrationen in logarithmischer Darstellung von 0–10mM aufgetragen. Die Ordinate zeigt den Anteil vitaler Zellen in % im Bezug zur Kontrolle bei der Anfangskonzentration Null.

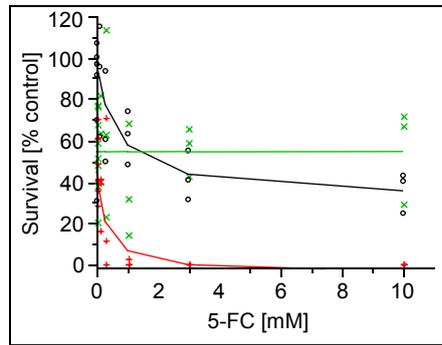
Die verwendeten Farben entsprechen der jeweiligen Behandlungsgruppe:

- Schwarz = Kontrolle
- Grün = AdGFP
- Rot = AdSuperCD

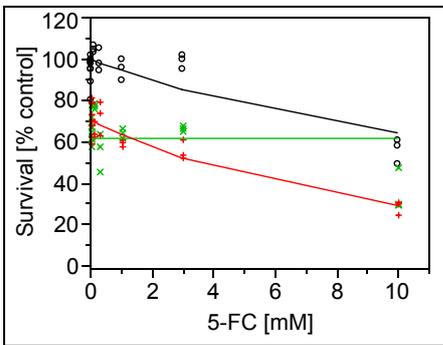
HepT1



HepT3



HUH6



HepG2

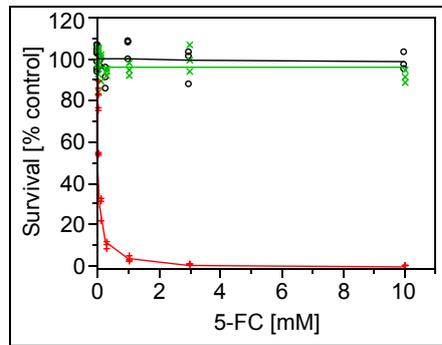


Abb. 29 Graphische Darstellung der Proliferationsassays bei Behandlung mit 5-FC für HepT1, HepT3, HUH6, und HepG2

4.4.3.2 Zusammenfassung Wirkung 5-Fluorcytosin

Für die Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2 zeigte sich der Suizidgeneffekt bereits bei geringen Konzentrationen für 5-FC (IC 50 < 0,6mM). Die HB-Zelllinie HUH6 zeigte keinen therapeutischen Effekt unter der Suizidgentherapie mit AdSuperCD und 5-FC bei einer IC 50 von 10mM. In diesem Bereich ist die Wirkung auf die Eigentoxizität von 5-FC zurückzuführen.

Die Eigentoxizität von 5-FC hatte bei den Zelllinien HepT1, HepT3 und HUH6 einen Einfluss auf die Behandlungsgruppen Kontrolle und AdGFP.

In der Varianzanalyse der Logarithmen der IC 50 von 5-FC wurde die Wechselwirkung der beiden Faktoren Zelllinie und Vorhandensein von AdSuperCD unter Therapie mit 5-FC analysiert. Der Faktor Zelllinie setzt sich aus den vier Niveaus (Zelllinien) HepT1, HepT3, HUH6 und HepG2 zusammen. Der zweite Faktor Vorhandensein von AdSuperCD steht für die beiden Behandlungsgruppen Kontrolle und AdSuperCD. Für die Wechselwirkung der beiden genannten Faktoren (Zelllinie versus Vorhandensein von AdSuperCD) war nur der Haupteffekt des Virus bei Behandlung mit 5-FC mit $p=0,0015$ signifikant. Der therapeutische Effekt von 5-FC führt nur unter Anwesenheit von AdSuperCD zu signifikantem Therapieeffekt (vgl. Abb.30B).

Die geometrischen IC-50-Mittelwerte der einzelnen Behandlungsgruppe für 5-FC wurden einander gegenübergestellt und in Abb.30A in logarithmischer Einheit graphisch dargestellt.

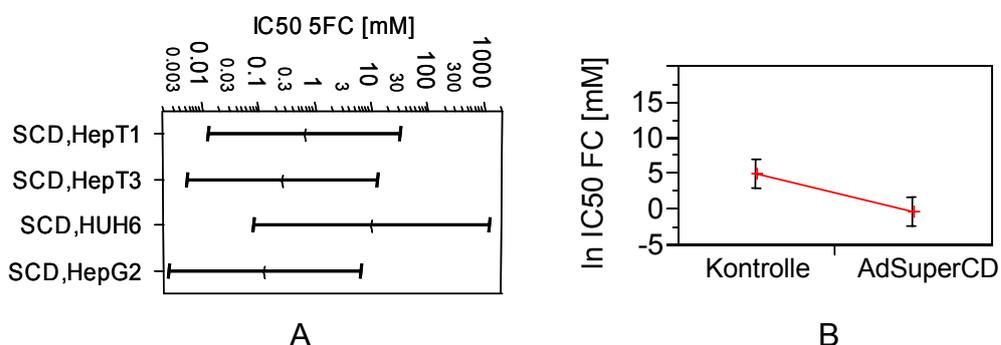


Abb.30 A: Logarithmische Darstellung der gemittelten IC 50 5-FC [mM] und des gemittelten 95%-Konfidenzintervalls der Behandlungsgruppen AdSuperCD. **B:** Vergleich des therapeutischen Effekts von 5-FC für Kontrolle bzw. AdSuperCD für alle Zelllinien (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2), $p= 0,001$

4.5 Promotorassay HUH6

Der Promotorassay wurde nur für HUH6 durchgeführt. Anlass dieser Untersuchung für die Zelllinie HUH6 war die schlechte Transduktionseffizienz für AdGFP und Ad SuperCD (direkte/indirekte Immunfluoreszenz und Western Blot) sowie das Fehlen des Suizidgeneffektes bei Behandlung mit 5-FC trotz positivem Nachweis in der indirekten Immunfluoreszenz für Adenohexonprotein nach Transduktion mit Adenovirus SuperCD (CMV Promotor) und Adenovirus GFP (RSV Promotor) (vgl. 4.1,4.3). Bei der direkten Immunfluoreszenz mit Adenovirus GFP (RSV Promotor) war die grüne Fluoreszenz detektierbar und somit das therapeutische Gen „green fluorescent protein“ exprimiert. Es stellte sich daher die Frage, ob bei der Zelllinie HUH6 der CMV Promotor für das Nicht-Expimieren des therapeutischen Gens SuperCD Protein und Ausbleiben des Suizidgeneffektes verantwortlich war.

Daher wurden in diesem Ansatz HUH6 Zellen mit zwei AdGFP Viren mit unterschiedlichem Promotor (CMV bzw. RSV) transduziert und anhand der FACS-Analyse quantifiziert. HepG2 wurde als interne Positivkontrolle mitgeführt (vgl.3.5, 3.9).

Bei der FACS-Analyse des Promotorassays zeigte sich eine gute Transduktionseffizienz für HUH6 mit 81,70% für den AdGFP-RSV-Promotor, wohingegen HUH6 für den AdGFP-CMV-Promotor (AdGFP-CMV-Promotor = AdTrack) eine sehr schwache Transduktionseffizienz mit 2,5% zeigte (vgl. Abb. 31, Abb. 32).

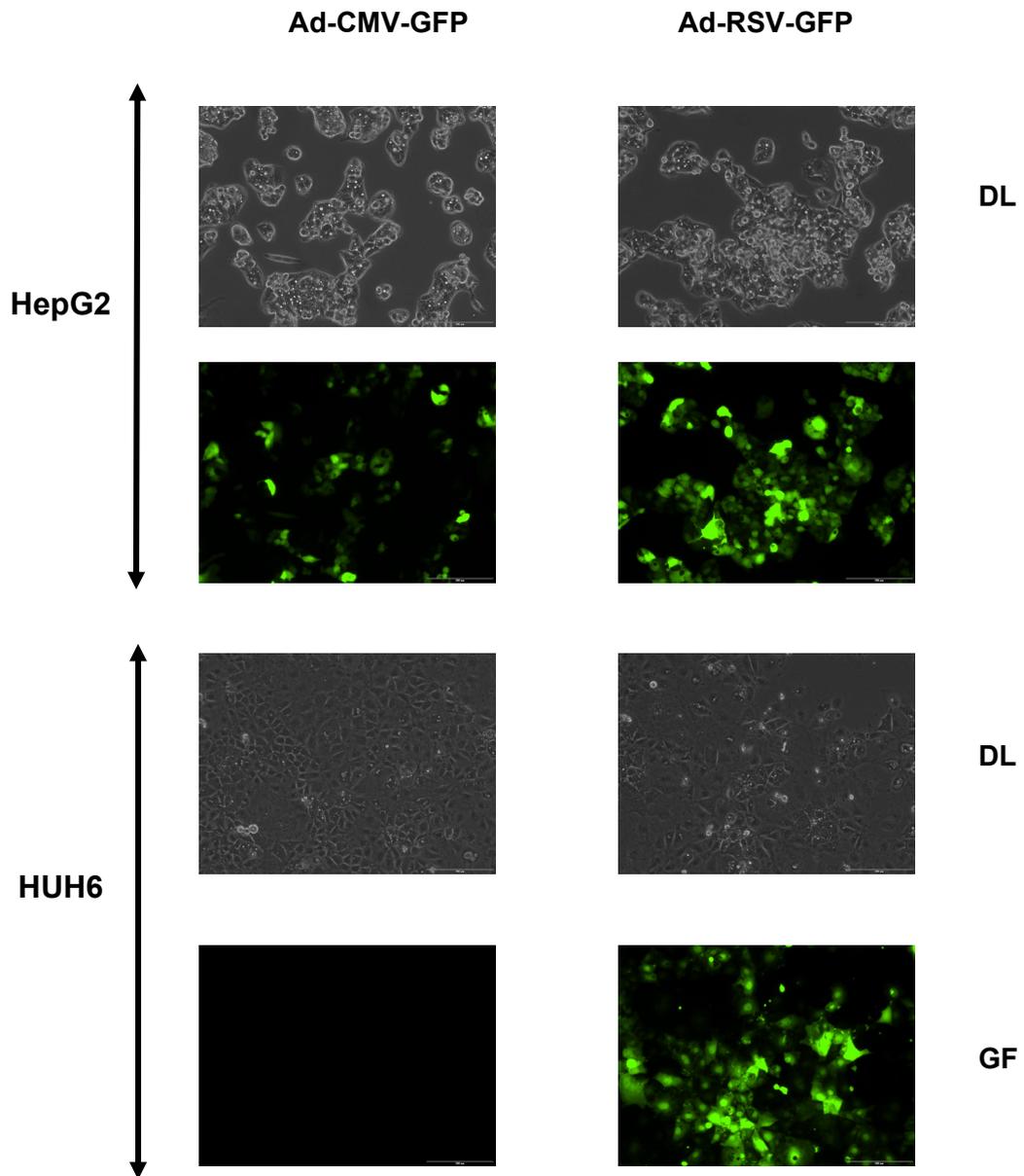
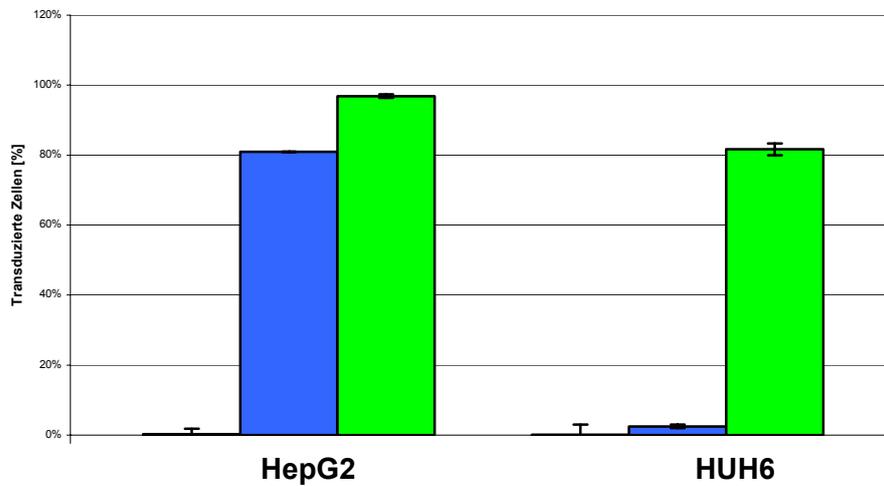


Abb. 31 Promotorassay HepG2 und HUH6 mit AdGFP (CMV Promotor) und AdGFP (RSV Promotor), direkte Immunfluoreszenz (20x; DL= Durchlicht, GF = Grüne Fluoreszenz)

Promotorassay HepG2 und HUH6



Legende:

- Kontrolle (keine Transduktion)
- AdCMV GFP (Track)
- AdRSV GFP

Abb. 32 Promotorassay HepG2 und HUH6, Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Transduktionseffizienzen (schwarz = Kontrolle, blau = AdCMV GFP(Ad Track), grün = AdRSV GFP)

Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass bei der Zelllinie HUH6 das therapeutische Gen durch einen CMV Promotor nicht exprimiert wird. Dies erklärt das schwache Expressieren von SuperCD und die geringe Zytotoxizität des CMV-Promotor vermittelten 5-FC/SuperCD Ansatzes.

5 Diskussion

5.1 Allgemeines

Das HB ist der häufigste maligne Lebertumor und tritt vor allem im frühen Kindesalter von 6 Monaten bis 3 Jahren mit einem Anteil von 1% aller pädiatrischen Tumorerkrankungen auf und lässt sich schlecht mit anderen soliden Tumoren des Kindesalters vergleichen. Die Grundlagenforschung zum HB konnte in den letzten Jahren Teile der Pathogenese des HB zunehmend identifizieren und Methoden etablieren, die eine suffiziente Diagnostik ermöglichen. Die Prognose für das HB hat sich über die letzten beiden Jahrzehnte beeindruckend verbessert. Dies ist vor allem auf die Etablierung kombinierter Therapie-schemata im Rahmen von Studienprotokollen (COG, GPOH, SIOPEL) aus neoadjuvanter bzw. adjuvanter Chemotherapie und verbesserten chirurgischen Techniken zurückzuführen. Die stadienunabhängige Fünf-Jahresüberlebenschance für Kinder mit HB hat sich von 35% vor 30 Jahren auf 75% heutzutage verbessert.

Der Therapieerfolg beim HB ist stark abhängig vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose. Das Langzeitüberleben für Kinder nach dem postoperativen Tumorstagingssystem der GPOH (vgl. 1.1.6) ist für Stadium I und II zwischen 96% –100%, im Stadium III 75% und im Stadium IV nur bei 36% [33,59]. Die fortgeschrittenen Tumoren im Stadium III und IV, Rezidive und Metastasen sind nach wie vor die Problemfälle in der Therapie des HB. Die Lebertransplantation zeigt in diesen Fällen, vor allem bei den nichtresektablen HB vielversprechende Ergebnisse. Das Langzeitüberleben nach einer Lebertransplantation mit neoadjuvanter Chemotherapie ist signifikant höher, wenn diese als Primärtherapie eingesetzt wird [7,43,44,45,46,49].

Die Ursachen für das nur bedingte Ansprechen auf die Chemotherapie bei den fortgeschrittenen Tumoren sind nur teilweise bekannt.

In der German Pediatric Liver Tumor Study (HB89) wurde eine Multi-Drug-Resistance bei Kindern nach vier und mehr Chemotherapiezyklen beobachtet [22]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit Gegenstand der For-

schung. In mehreren Studien konnte MDR1/P-Glykoprotein als wichtiger Faktor für die MDR beim HB identifiziert werden [54,55,56,57,58,59].

Die Gentherapie spielt als Therapieansatz bei Tumorerkrankungen eine immer wichtigere Rolle. Den größten Anteil an klinischen Gentherapiestudien haben Tumorerkrankungen mit 66,5%, gefolgt von kardiovaskulären Erkrankungen (9,1%) und monogenen Erkrankungen (8,3%) [105].

Für das HB stellt die Gentherapie einen neuen Therapieansatz dar.

In vitro konnte mittels non-viraler Gentherapie der Einfluss des Antiapoptosefaktors Bcl-2 Protein auf die Chemotherapie beim HB nachgewiesen werden. Durch Einsatz von Bcl-2-siRNA konnte die Sensitivität gegenüber den Zytostatika erhöht werden [61].

Warmann et al. haben in einer in vitro Studie die Transduktionseffizienz von non-viralen (LipofectaminTM2000, FuGENE6TM) gegen virale Vektoren (Adenovirus, Sendaivirus) gegenübergestellt. Für die HB-Zelllinien HUH6 und HepT1 zeigten sich bessere Transduktionseffizienzen für virale Vektoren. Die vektorinduzierte Apoptose war für die Adenovirustransduktion im tolerierbaren Bereich. Adenoviren, die am häufigsten als Vektoren in der Gentherapie weltweit verwendet werden, konnten als mögliche Vektoren für Gentherapiestudien am HB identifiziert werden [105,122].

Vielversprechende Ergebnisse in der Gentherapie wurden bei verschiedenen Tumoren mit der Suizidgentherapie erzielt, insbesondere auch bei Lebertumoren in vivo und in vitro [96,123,124,125,126,127,128,129,130].

In einem Ansatz ermöglicht die Suizidgentherapie „gene-directed enzyme prodrug therapy“ (GDEPT) die selektive Abtötung der Tumorzellen, die das Prodrug nach Expression des Suizidgens in dessen toxische Substanz metabolisieren. Effektivität des Suizidgeneffektes wird zum Teil durch eine verminderte Transduktionseffizienz limitiert. Dies wird aber teilweise durch den Bystander-Effekt kompensiert. Durch den Einsatz von gewebsspezifischen Vektoren wird eine systemische Toxizität verhindert [129,130].

5.2 Adenovirustransduktion - qualitativ und quantitativ

Adenovirale Vektoren eigneten sich *in vitro* für die Gentherapie beim HB [122]. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Untersuchung Adenoviren als Vektoren für die Suizidgentherapie verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien mit AdGFP transduziert und mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie konnte die Expression des GFP-Gens in transduzierten Zellen als grüne Fluoreszenz nach 48h *in vitro* für alle vier Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Fluoreszenzmikroskopie diente in allen folgenden Untersuchungen als *in vitro* Transduktionskontrolle. Die HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 und die HCC-Zelllinie HepG2 zeigten eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz, bei der HB-Zelllinie HUH6 war die Fluoreszenz schwächer ausgeprägt. Die Beobachtungen der direkten Immunfluoreszenz bei Transduktion mit dem AdGFP konnten durch die indirekte Immunfluoreszenz mit dem rotfluoreszierenden Antikörper gegen das Hexonprotein des Adenovirus-Capsidproteins für Transduktion mit AdGFP sowie auch für AdSCD bestätigt werden. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers (Mouse Anti-Adenovirus Monoclonal Antibody, MAB 8052 Chemicon International) ist durch dessen monoklonale Beschaffenheit gegen ein einzelnes Epitop (Hexon) des Adenovirus-Capsidproteins gewährleistet [131,132].

Die rote Fluoreszenz war bei allen vier Zelllinien im Cytoplasma und teilweise im Zellkern zu finden. Die simultane Detektion der grünen Fluoreszenz und der roten Fluoreszenz zeigte eine rote Fluoreszenz in allen grünfluoreszierenden Zellen. In den rotfluoreszierenden Zellen war die grüne Fluoreszenz jedoch nicht immer vorhanden. Bei der Zelllinie HUH6 war diese beobachtbare Differenz zwischen grüner und roter Fluoreszenz am stärksten ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass transduzierte Zellen das therapeutische Gen, in diesem Falle das AdGFP, nicht immer exprimieren. Die Ursachen dafür können vielfältig sein. Eine Rolle könnte das unterschiedliche biologische Verhalten und die histologischen Charakteristika der einzelnen Tumorzelllinien spielen. Eine andere Erklärung ist die unterschiedliche Eignung und Aktivität des Promotors für die jeweilige Zelllinie. Diese Wechselwirkung zwischen Zelllinien und Promotor im Bezug auf die Expression wurde bereits mehrfach beschrieben und un-

tersucht [133, 134]. Warmann et al. zeigten für die HB-Zelllinien HepT1 und HUH6 bei Lipofectamintransfektion mit unterschiedlichen leberspezifischen Promotoren für GFP unterschiedliche Aktivitäten für die beiden HB-Zelllinien. In dieser Untersuchung war die GFP Expression für HUH6 im Vergleich zu HepT1 vermindert [122]. Diese Beobachtung konnte durch die hier präsentierten Virus-Vektor-Transduktionen bestätigt werden.

Die Beobachtungen der direkten und indirekten Immunfluoreszenz konnten durch die quantitative Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS nach Transduktion mit dem AdGFP bestätigt werden. So zeigte die Zelllinie HepT1 mit 98,67% die höchste Transduktionseffizienz gefolgt von HepG2 (96,87%), HepT3 (93,62%) und HUH6 (87,79%). Die Ergebnisse für HepT1 und HUH6 korrelieren mit den Beobachtungen von Warmann et al. zur Transduktionseffizienz nach AdGFP Transduktion für HepT1 und HUH6 [122].

5.3 Nachweis des SuperCD-Proteins im Western Blot

Nach erfolgtem Transduktionsnachweis für AdGFP und AdSuperCD folgte der Expressionsnachweis für das Suizidgen-Produkt SuperCD mittels Western Blot. Die Expression des AdSuperCD ist eine essentielle Voraussetzung für die Suizidgentherapie mit 5-FC.

Für die beiden HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 sowie für die HCC-Zelllinie HepG2 und MH-SCD als Positivkontrolle ließen sich das Suizidprotein SuperCD bei 42 kDa nachweisen, wie bei Graepler et al. [128] und Lemken M-L et al. beschrieben [130].

Die HB-Zelllinie HUH6 zeigt keine Expression des Protein SuperCD. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zum erbrachten Transduktionsnachweis für das Adenohexonprotein für AdSuperCD in der indirekten Immunfluoreszenz (vgl. 5.2). Daraus kann geschlossen werden, dass die HB-Zelllinie HUH6 mit dem Adenovirus transduziert wird, jedoch das Suizidprotein SuperCD nicht bzw. nicht in ausreichender Menge zur Protein-Expression führt. Die GFP Expression war für die HB-Zelllinie HUH6 geringer als die anderen untersuchten drei Zelllinien. Die Ursache für die ausbleibende Suizidgenexpression SuperCD bei

HUH6 bei nachgewiesener adenoviraler Transduktion kann vielfältig sein. Wahrscheinlich erscheint die Theorie, dass der Promotor für das Suizidgen SuperCD für HUH6 nicht geeignet war. Diese Vermutung wird unter 5.5 dargestellt und diskutiert.

5.4 Funktionalität des Suizidgeneffektes

Die Überprüfung der Funktionalität des Suizidgeneffektes des AdSuperCD wurde für alle vier Zelllinien mit dem Zytostatikum 5-FU und Prodrug 5-FC durchgeführt und die IC 50 für 5-FC und 5-FU für die entsprechenden Behandlungsgruppen (Kontrolle, AdGFP, AdSuperCD) bestimmt.

Das Zytostatikum 5-FU ist nicht Teil der aktuellen Standardtherapieprotokolle des HB der SIOPEL und GPOH, hauptsächlich aufgrund der sehr starken toxischen Nebenwirkungen [33,135]. In einzelnen Studien wurde 5-FU in Kombination mit CDDP und VCR eingesetzt [35].

In dieser Arbeit wird die Zytostatikatherapie mit 5-FU der Suizidgentherapie mit dem Prodrug 5-FC, welches durch das Suizidgen SuperCD zu 5-FU metabolisiert wird, gegenübergestellt und deren zytotoxischen Einflüssen auf die Zellvitalität der HB-Zelllinien HepT1, HepT3 und HUH6 und HCC-Zelllinie HepG2 anhand eines Proliferationsassays analysiert.

5.4.1 Adenoviraler Einfluss

Zum Ausschluss einer adenoviralen vermittelten Wirkung auf die Zellvitalität wurde die Zellvitalität für transduzierte Zellen der Behandlungsgruppen AdGFP und AdSCD zur Behandlungsgruppe Kontrolle bei Konzentration Null bestimmt. Die Minderung der Zellvitalität durch die beiden Adenoviren erreichte keine signifikante Bedeutung. Eine geringe Minderung der Zellvitalität durch Adenovirustransduktion ist für die beiden HB-Zelllinien HepT1 und HUH6 bekannt und von Warmann et al. beschrieben worden [122]. Bei beiden Zelllinien schließt das 95%-Intervall für die Transduktion mit AdSCD 100% mit ein und für AdGFP nur knapp die 100% nicht mit ein.

Abweichendes Verhalten zu den anderen beiden HB-Zelllinien zeigte die Zelllinie HepT3 bei der Transduktion mit AdGFP im Proliferationsassay. Hier war eine Verstärkung der Zellvitalität in Bezug auf die Kontrolle und keine Abnahme der Zellvitalität, wie bei Transduktion von HepT3 mit AdSCD, festzustellen. Dieses Ergebnis konnte mittels in vitro Mikroskopie nicht bestätigt werden. Hier war eine Minderung der Zellvitalität zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Wachstumsmuster der HepT3 HB-Zelllinie. Zum einen wächst die HepT3 HB-Zelllinie zwar als Monolayer, wie die anderen HB-Zelllinien HepT1 und HUH6, jedoch zum anderen auch haufenförmig in mehreren Schichten ins Medium hineinragend. Diese Form des kumulativen Wachstums könnte nach Transduktion mit AdGFP für die Messungsartefakte im Proliferationsassay verantwortlich sein, aufgrund einer Interaktion der grünen Eigenfluoreszenz AdGFP mit dem fluoreszierenden Farbstoff des Proliferationsassay (vgl.3.7.1). Dem Hersteller Assays (Biomedica Medizinprodukte) war dieses Phänomen nicht bekannt. Dieser Messungsartefakt war nur für HepT3 nach AdGFP Transduktion bei Behandlung mit 5-FU gering und bei 5-FC sehr stark ausgeprägt. Aus diesem Grund resultiert das sehr große 95%-Konfidenzintervall (96,41%-148,75%) für HepT3 für AdGFP. Das 95%-Konfidenzintervall für HepT3 mit AdSCD schließt die 100% knapp nicht mit ein (62,84%-96,92).

Die HCC-Zelllinie HepG2 zeigte im Mittel eine Minderung der Zellvitalität nach Transduktion mit Adenovirus, wobei das 95%-Konfidenzintervall für AdGFP (69,41%-107,10%) und AdSCD (69,31%-106,94%) jeweils die 100% enthielten. Daher kann für die Zelllinien HepT1, HUH6 und HepG2 der Einfluss der adenoviralen Transduktion mit AdGFP und AdSCD auf die Zellvitalität vernachlässigt werden. Für die Zelllinie HepT3 kann diese Aussage, aufgrund der artefaktbedingten Messwerte für HepT3 AdGFP transduzierte Zellen, nur für AdSCD transduzierte Zellen geltend gemacht werden.

5.4.2 Wirkung des Zytostatikum 5-Fluorouracil

In dieser Studie war der Nachweis der Wirksamkeit der 5-FU Behandlung für alle vier Zelllinien die Grundvoraussetzung für die Suizidgentherapie mit dem Prodrug 5-FC und AdSuperCD.

Die Behandlung mit dem Zytostatikum 5-FU hatte unterschiedliche zytotoxische Wirkung auf die vier Zelllinien und teilweise innerhalb einer Zelllinie zwischen den Behandlungsgruppen (Kontrolle, AdGFP, AdSCD). Anhand der gemessenen Extinktionswerte des Proliferationsassay wurde mittels des statistischen Rechenmodells der nicht-linearen Regression (vgl. 3.10.1) die IC 50 für die Behandlungsgruppen ermittelt.

Die Zelllinie HUH6 vom HB Typ „mixed HB“ reagierte am sensibelsten auf 5-FU, wobei sich die IC 50 Werte der Behandlungsgruppen sich nahezu nicht unterschieden. Bei der HCC-Zelllinie HepG2 zeigten sich in den drei Behandlungsgruppen unterschiedliche Sensibilitäten gegenüber 5-FU, wobei die IC 50 der Gruppe AdSuperCD 70% der IC 50 der Kontrollgruppe betrug.

Bei der HB-Zelllinie HepT3 vom embryonalen-fetalen Typ zeigte sich eine Tendenz zu vermehrter Sensibilität gegenüber 5-FU zwischen den Behandlungsgruppen Kontrolle und AdSuperCD, deren IC 50 40% der IC 50 der Kontrollgruppe betrug. Die Behandlungsgruppe AdGFP kann bei dieser Zelllinie aufgrund der beobachteten Messartefakte nicht in den Vergleich eingebracht werden. Es ist anzumerken, dass die Ergebnisse der Zelllinie HepT3 der drei Versuchswiederholungen sehr heterogen sind (vgl. 9.2.1) und daher die berechneten gemittelten IC 50 Werte nur eine Tendenz zur Wirkung von 5-FU angeben. Zur Verifizierung des Ansprechens von HepT3 auf 5-FU wäre ein Vielfaches der durchgeführten Versuchswiederholungen notwendig. Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse kann das kumulative Wachstum der HepT3 bedingt sein. Um Zellwachstumsveränderungen durch mehrfache Zellpassagen zu vermeiden, wurden die Versuchswiederholungen mit Zellpassagen, die sich nur um maximal 4 Passagen unterschieden, durchgeführt. Dadurch wurden gleiche Kulturbedingungen für die Einzelversuche gewährleistet.

Den geringsten Therapieeffekt mit 5-FU zeigte die Kontrollgruppe der HB-Zelllinie HepT1 vom embryonalen Typ. Jedoch war bei HepT1 die stärkste Tendenz zu vermehrter Sensibilität gegenüber 5-FU nach adenoviraler Transduktion zu verzeichnen. Die IC 50 der Behandlungsgruppen AdGFP und AdSuperCD betragen 37% der Kontroll IC 50.

Die vermehrte Sensibilität nach Transduktion mit AdSuperCD gegenüber 5-FU bei HepT3 und HepG2 ist durch das zweite Enzym, des Suizidgens SuperCD (Yeast Uracilphosphoribosyl-transferase) zu erklären. Dieses Enzym sorgt für eine Weiterverstoffwechslung von 5-FU in 5-FUMP und erhöht dadurch die toxische Wirkung von 5-FU. Im Unterschied zu HepT3 und HepG2 konnte die therapeutische Wirkung des Zytostatikums 5-FU bei HepT1 durch alleinige Transduktion mit einem Adenovirus verbessert werden. Dies würde für die Zelllinie HepT1 vom embryonalen Typ bedeuten, dass durch additive adenovirale Transduktion die Dosis 5-FU zum Erreichen desselben therapeutischen Effektes wie bei der Kontrollgruppe, nur 37% der Dosis eingesetzt werden müssten.

Das unterschiedliche Ansprechen dieser vier Zelllinien (HepT1, HepT3, HUH6, HepG2) auf Zytostatika konnten Warmann et al. bei Behandlung mit DOXO bereits feststellen [57]. In dieser Studie zeigte HepT3 die stärkste Sensibilität gegenüber DOXO, gefolgt von HUH6, HepG2 und HepT1. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass differenziertere Tumore (z.B. HepT3 und HUH6) besser auf Zytostatika ansprechen als undifferenzierte (z.B. HepT1). Diese Tatsache korreliert eng mit den bisher gemachten klinischen Erfahrungen in der Behandlung des HB [57].

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ebenfalls, dass die Sensibilität gegenüber Zytostatika, hier 5-FU, mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen zunimmt. Die gleichzeitige adenovirale Transduktion mit AdSuperCD konnte die Sensibilität gegenüber 5-FU bei HepG2 und HepT3 verbessern. Eine rein adenovirale Transduktion führte bei HepT1, HB vom embryonalen Typ (undifferenziert), zu einem deutlich verbesserten Ansprechen auf 5-FU bei geringeren Konzentrationen. Dies kann durch den additiven Effekt erklärt werden. Durch alleinige adenovirale Transduktion wird bei dieser HB-Zelllinie die Sensibilität

gegenüber 5-FU erhöht. In weiteren Untersuchungen sollte untersucht werden, ob die adenovirale Transduktion bzw. der additive Effekt, das Ansprechen von Zytostatika bei undifferenzierten Tumoren (z.B. HepT1) verbessert, da sich diese Tumoren meist therapieresistent unter Zytostatikatherapie zeigen [56,61].

Für die HCC-Zelllinie HepG2 konnte in einer in vitro Studie nach Transfektion mit Bcl-2 siRNA eine vermehrte Sensibilität gegenüber 5-FU beobachtet werden. [136].

Das Zytostatikum 5-FU gehört bei einigen soliden Tumoren zur Standardtherapie wie z.B. dem Colon-CA, bei dem es in Kombination mit Folinsäure adjuvant zum Einsatz kommt. Mehrere randomisierte Studien konnten eine signifikante Senkung der Rezidivrate sowie des Gesamtüberlebens bei Kombination mit Folinsäure zeigen [137,138,139,]. Bei der Therapie mit 5-FU beim Colon-CA treten häufig Resistenzen auf. Gegenwärtig werden die verantwortlichen Resistenzmechanismen untersucht und gleichzeitig unterschiedliche Therapieansätze entwickelt diese Resistenzmechanismen zu umgehen [140,141,142,143]. Beim Exokrinen Pankreas Karzinom gehört die Kombinationstherapie aus 5-FU und Folinsäure ebenfalls zur adjuvanten Therapie [144].

5.4.3 Wirkung des Prodrugs 5-Fluorcytosin

Die Funktionalität und den Effekt der Suizidgentherapie mit AdSuperCD und dem Prodrug 5-FC wurde mittels desselben Proliferationsassays wie für das Zytostatikum 5-FU überprüft. Die Ergebnisse wurden anhand des statistischen Rechenmodells der nicht-linearen Regression (vgl. 3.10.1) für jede Zelllinie und deren Behandlungsgruppen ausgewertet.

Das Prodrug 5-FC hat ohne Anwesenheit des Enzyms Cytosindesaminase in den Behandlungsgruppen Kontrolle und AdGFP keine zytotoxische Wirkung im therapierelevanten Bereich. Bei sehr hohen Konzentrationen von 5-FC war das Wachstum der Zellen gering beeinflusst. Aus diesem Grunde konnte die IC 50 für 5-FC für jede Zelllinie nur für die Behandlungsgruppe AdSuperCD ermittelt werden.

Der Effekt und die Funktionalität der Suizidgentherapie war bei den beiden HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 und der HCC-Zelllinie HepG2 vorhanden. Bei der HB-Zelllinie HUH6 blieb der Effekt der Suizidgentherapie aus. Für diese Zelllinie konnte im Western Blot das SuperCD-Protein im Gegensatz zu HepT1, HepT3 und HepG2 nicht nachgewiesen werden.

Die berechneten 95%-Konfidenzintervalle für die Versuchswiederholungen I-III (vgl. Anhang 9.2.2) zeigen für HepT1 und HepT3 sehr große Konfidenzgrenzen (>10 mM) und geben die Streuung zwischen den Wiederholungsversuchen I-III an. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Konzentrationen von 5-FC bis 10 mM verwendet und die Extremwerte der Beobachtungen I-III lagen nicht soweit auseinander wie im 95%-Konfidenzintervall angegeben (vgl. Werte in Tabelle XV). Es ist daher anzunehmen, dass bei einem Vielfachen an Wiederholungen sich das 95%-Konfidenzintervall verkleinert.

Lemken et al [130] untersuchten für HepG2 den Suizidgeneffekt für AdSuperCD und 5-FC und konnte eine starke Sensibilität gegenüber 5-FC bei einer MOI 50 nachweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrelieren gut mit diesen Ergebnissen. Aus diesem Grunde konnte die HCC-Zelllinie HepG2 als interne Positivkontrolle in dieser Arbeit verwendet werden.

Verglichen mit HepG2 ist der Suizidgeneffekt gegen die HB-Zelllinien HepT1 vom embryonalen Typ und HepT3 vom embryonalen-fetalen Typ nahezu gleich stark ausgeprägt. Aus diesem Grunde scheint die Suizidgentherapie eine vielversprechend Therapie des HB zu sein und bietet einen möglichen Ansatz für weitere in vitro und in vivo Untersuchungen.

Die Zelllinie HepT1 vom embryonalen Typ zeigte sich in den bisherigen Untersuchungen unter Einsatz von Zytostatika nahezu therapieresistent [56,61]. Die Suizidgentherapie wäre möglicherweise also für undifferenzierte HB, u.a. vom embryonalen Typ, die im allgemeinen schlechter auf Zytostatika ansprechen, eine Therapiealternative der Zukunft.

Für das HB ist dies die erste Arbeit in der die Suizidgentherapie mit AdSuperCD und 5-FC in ihrer Wirkung untersucht wurde.

Zur weiteren Verbesserung der Suizidtherapie des AdSuperCD konnten Lemken et al. [130] durch Generierung eines neuen Vektorkonstrukts aus Fusion des HSV-1 Tegmentum Protein VP22 mit dem SuperCD-Protein den Bystandereffekt bei adenoviral vermittelter Suizidtherapie verbessern.

Die Suizidtherapie mit 5-FC in Kombination mit dem Enzym Cytosindesaminase (CD) wurde für mehrere Tumorerkrankungen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Häufig wird das Prodrug-System CD/5-FC mit Uracilphosphoribosyltransferase (UPRT) aufgrund erhöhter Effektivität kombiniert.

Für das HCC zeigten Kuriyama et al. [145] die Wirksamkeit der beiden Prodrug-Systeme CD/5-FC und HSV-TK/GC (Herpes simplex Virus, Tyrosinkinase/Ganciclovir), wobei das CD/5-FC Prodrug-System dem HSV-TK/GC *in vitro* im Bezug auf die Zellelimination sich überlegen zeigte. Koyama et al. [146] untersuchten die Wirksamkeit des Prodrug-Systems CD/5-FC, YUPRT/5-FU und CD/YUPRT/5-FC für das Colon-CA *in vitro* und *in vivo*. Die 5-FU Therapie gehört beim Colon-CA seit über 50 Jahren zur Standardtherapie, wobei sich häufig unter der Therapie mit 5-FU Resistenzmechanismen entwickeln, welche den Therapieerfolg mindern. Koyama et al. zeigten zu einem, dass die Transduktion mit AdUPRT und Behandlung mit 5-FU sowie auch die Transduktion mit AdCD und AdUPRT bei Applikation von 5-FC, die Sensibilität gegenüber 5-FU/5-FC erhöht. Mittels des Suizidtherapie-Systems AdCD, AdUPRT/5-FC kann die Resistenzentwicklung gegenüber dem Standardtherapeutikum 5-FU vermindert werden bei gleichzeitig geringerem Nebenwirkungsspektrum [146]. Shen et al. konnten mittels des rekombinanten Adenovirus AdCEACD bei Applikation von 5-FC die zellspezifische Wirksamkeit des Prodrug-Systems AdCEA/5-FC für CEA positive Colon-CA Zellen nachweisen [147]. Auch für maligne Gehirntumoren ist das Suizidtherapie-System aus CD und UPRT eine vielversprechende Alternative. Dies zeigten Adachi et al. in einer *in vitro* und *in vivo* Studie an Rattengliomsarcomazellen [148]. Erbs et al. beschrieben für Tumoren mit natürlicher Resistenz für 5-FU, wie Colon-CA, Mamma-CA, Pankreas-CA, Melanom-CA den erfolgreichen Einsatz der Suizidtherapie mit 5-FC und dem Fusionsprotein aus Cytosindesaminase und Uracilphosphoribosyltransferase. Das

Suizidgentherapie-System mit dem Fusionsprotein aus CD und UPRT war im Vergleich zum Suizidgentherapie-System HSV-TK/GCV das effektivere Prodrug-System [96].

Das Prodrug-System CD/UPRT/5-FC zeigte in der Behandlung unterschiedlicher Tumoren vielversprechende Therapieergebnisse, wie dies auch in der vorliegenden Arbeit am HB der Fall ist. Bei einem klinischen Einsatz der Suizidgentherapie 5-FC/AdSuperCD in der Therapie des HB, wäre es möglich die systemischen toxischen Nebenwirkungen einer 5-FU-Therapie sowie die Nebenwirkungen anderer Zytostatika-Therapien, zu verringern. Dadurch könnte die 5-FC/AdSuperCD Suizidgentherapie indirekt zur Renaissance von 5-FU in der HB-Therapie führen. Die Gefahr einer Resistenzentwicklung unter einer Suizidgentherapie mit AdSuperCD wären aufgrund der Erfahrungen von Erbs et al. [96] geringer. Eine in vivo Studie an einem HB-Mausmodell wäre ein möglicher nächster Ansatz, die Eignung einer Suizidgentherapie für das HB detaillierter zu untersuchen.

5.5 Promotorassay HUH6

HUH6 nahm unter den untersuchten Zelllinien eine Sonderstellung ein. So konnte bei dieser Zelllinie in der direkten Immunfluoreszenz nach Transduktion mit AdGFP-RSV-Promotor und in der indirekten Immunfluoreszenz nach Transduktion mit AdGFP-RSV-Promotor und AdGFP-CMV-Promotor die adenovirale Transduktion gezeigt werden. Die FACS-Analyse mit AdGFP-RSV-Promotor zeigte für HUH6 eine deutlich geringere Transduktionseffizienz als für die Zelllinien HepT1, HepT3 und HepG2. Im Western Blot gelang dagegen kein Nachweis für das Suizidprotein SuperCD, welches durch AdGFP-CMV-Promotor in die Zelle transduziert wurde. HUH6 zeigte auch kein Ansprechen auf die Suizidgentherapie mit AdSuperCD und 5-FC.

Die Diskrepanz zwischen dem positiven Nachweis des Hexonproteins des Adenovirus-Capsidproteins für AdSuperCD und dem Fehlen der Expression des SuperCD Proteins veranlasste uns zur Hypothese, dass der CMV Promotor Ursache des „Nicht-exprimierens“ sein könnte. Die unterschiedlichen Transdukti-

onseffizienzen mit den beiden Promotoren CMV (2,5%) und RSV (81,7%) konnten für HUH6 diese Vermutung bestätigen. Es liegt daher sehr nahe, dass der CMV Promotor einen Einfluss auf das „Nicht-exprimieren“ des SuperCD Proteins im Western Blot und das „Nicht-ansprechen“ der Suizidtherapie mit 5-FC bei HUH6 hat.

Für das Erreichen einer hohen Transduktionseffizienz bei der adenoviralen Transduktion ist zum einen die Rezeptorexpression der Zielzelle und additiv die Wahl des Promotors für das eingebrachte Gen ein weiterer entscheidender und bestimmender Faktor.

Sakurai et al. [149] haben für CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen die Transduktionseffizienz für sechs verschiedene Promotoren mit GFP gekoppelt (u.a. „human elongation factor 1 α promotor“ (EF1 α), CA Promotor, CMVi Promotor, CMV Promotor, MSCV Promotor, PGK Promotor) für Ad35 untersucht. Die Stärke der Transduktionseffizienz in den CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen war dabei abhängig vom Promotor. Die Promotoren EF1 α , CA, und CMVi erreichten die höchsten signifikanten Transduktionseffizienzen. Sakurai et al. beobachteten, dass transduzierte Zellen mit Ad35 GFP nicht exprimiert. Untersuchungen der real time PCR zeigten, dass das Ad35 Genom in GFP-positiven sowie in GFP-negativen Zellen vorhanden war.

Cayer et al. [150] verglichen bei Transduktion mit AD5/F35 für die Promotoren PGK und CMV mit EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) deren Aktivität und Transduktionseffizienz an B-Lymphozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen. Für die Expression für EYFP wurden ähnliche Beobachtungen wie bei Sakurai et al. [149] registriert. Einige Subpopulationen der B-Lymphozyten und CD34⁺ Zellen zeigten keine Expression des EYFP trotz des Nachweis der adenoviralen Transduktion mittels quantitativer real time PCR 48 Stunden nach erfolgter Transduktion. Gründe für das Fehlen der Aktivität von selbst universell verwendeten Promotoren wie CMV und PGK sind bisher unbekannt [150].

Der CMV Promotor ist einer der stärksten Promotoren und gehört zur Zeit zu den am häufigsten verwendeten Promotoren für transiente Genexpression. Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen veranlassen jedoch zu der Annahme,

dass der CMV Promotor für unreife Zellen (embryonale Mäusestammzellen, human CD34⁺ Zellen) zum Teil nicht geeignet ist [149,151].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur für die HB-Zelllinie HUH6 vom Typ „mixed HB“ stark unterschiedliche Aktivitäten der Promotoren RSV und CMV wie auch von Sakurai et al und Cayer et al beschrieben [149,150]. Für HepG2 zeigte sich im Promotorassay nur eine Tendenz zur vermehrten Aktivität des RSV Promotors. Für die beiden HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 wurde der Promotorassay aufgrund fehlender Indikation (positiver Nachweis für AdSuperCD Protein im Western Blot) nicht durchgeführt. Die unterschiedliche Aktivität der Promotoren CMV und RSV bei den drei HB-Subtypen embryonal (HepT1), embryonal-fetal (HepT3) und mixed-HB (HUH6), kann durch die unterschiedliche Tumorbiologie bedingt sein.

Für zukünftige Suizidgentherapiestudien am HB müssten diese hinsichtlich ihrer Eigenschaft auf Promotoraktivität untersucht werden, bevor der jeweilige Therapieansatz verfolgt wird.

5.6 Ausblick

Die Gentherapie in der Behandlung von soliden Tumoren gewinnt immer mehr an Bedeutung. Die Suizidgentherapie mittels eines Prodrugs (GDEPT) ist eine der vielen Therapieansätze, die zum Schlagwort Gentherapie zählen. In der Therapie von Lebertumoren gehört die GDEPT zu den erfolgsversprechendsten Therapiemethoden der Zukunft [129].

Neben dem Prodrug-System CD/UPRT/5-FC der vorliegenden Arbeit werden derzeit weitere Prodrug-Systeme angewendet und auf ihre Wirksamkeit untersucht. Das HSV-TK/GC Prodrug-System ist das meist verwendete Prodrug-System [105]. Es entwickelte sich aus dem Virostatikum Ganciclovir für Herpes simplex. Die Tyrosinkinase des Herpes simplex weist eine 1000-fach höhere Affinität für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Monophosphorylierung des Ganciclovirs in dessen zytotoxischen Metabolite auf, als die Tyrosinkinase der Säugetierzellen. Cytochrome P450 und Cytochrom P450 Reduktasen wurden bereits in klinischen Studien Phase I und II bei fortgeschrittenem Mam-

ma-CA und malignem Melanom mit dem Prodrug Cyclophosphamid eingesetzt [91,152,153]. Das Enzym Nitroreductase mit dem Prodrug 5-[aziridin-1-yl]-2,4-dinitrobenzamide (CB1954), welches in seiner aktiven Form eine p-53 unabhängige Apoptose auslöst, gehört wie die Carboxypeptidase G2 und die Purin-Nukleosid-Phosphorylase, zu den Prodrug-System der GDEPT [91].

Derzeit gibt es bereits eine Vielzahl klinischer GDEPT Studien in Phase I und II z.B. für rezidivierende und lokale Prostata-CA [154], Ovarial-CA [155] und Glioblastom multiforme [156], die hauptsächlich auf dem HSV-TK/GC Prodrug-System basieren. Insgesamt zeigen die bisherigen Studienergebnisse ermutigende Ergebnisse. Es ist zu beachten, dass es sich um sehr kleine Studien handelt und die Studienteilnehmer sich bereits in einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium befinden.

Für das in dieser vorliegenden Arbeit verwendete Prodrug-System 5-FC SuperCD wurde bisher nur eine in vivo Studie am Rattenmodell durchgeführt. Hierbei wurden MH-Zellen, welche das SuperCD Protein stabil exprimieren, subkutan appliziert, nach 11 Tagen wurde zweimal täglich 5-FC für weitere 7 Tage intraperitoneal appliziert. Das Tumorwachstum zeigte einen signifikanten Rückgang [63].

Neben der Suizidgentherapie werden weitere gentherapeutische Ansätze untersucht [129]. Durch Transfer von Antisense-Nukleotiden (siRNA) soll die Inhibition von Onkogenen erreicht werden. Dieser Ansatz wurde bereits von Warmann et al. für das HB für den Antiapoptosefaktor Bcl-2 Protein untersucht [61]. Ein anderer Ansatz verfolgt die Wiederherstellung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. das p53, welches in ca. 50% der humanen Tumoren mutiert ist und somit seinen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nicht mehr ausüben kann. Die Anti-Angiogenesetherapie, die auch in der Therapie anderer Tumore durch Blockade des VEGF-Faktors (Vaso endothelial growth factor) eingesetzt wird, spielt auch in der Behandlung von Lebertumoren eine Rolle. Ein weiterer Ansatz, ähnlich der Suizidgentherapie mit einem Prodrug (GDEPT), ist die zielorientierte Expression von zytotoxischen bzw. proapoptotischen Genen in der Zielzelle. Unter der Kontrolle von gewebspezifischen Promotoren, für die Leber z.B. AFP, kann das toxische Gen, z.B. Diphterietoxin A, exprimiert werden und

in der transduzierten Zelle zum Zelltod führen. Alternativ kann durch Transduktion mit sogenannten „Todesgenen“, z.B. TRAIL-Ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand), Zellapoptose induziert werden.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Gruppe der immunogenen Therapien. Diese hat zum Ziel durch den Transfer von Genen die Immunantwort gegen die Tumorzelle auszulösen [129].

Gentherapie mit onkolytischen Viren (Adenoviren, Vaccinia Virus, HSV) induziert Zellyse durch Virusreplikation in der Zielzelle oder durch die zytotoxische Wirkung der viralen Proteine [157].

In Studien gibt es erste Hinweise auf synergistische Effekte bei Kombination von gentherapeutischen Ansätzen mit Radio- oder Chemotherapie [129].

Der sichere Einsatz der Suizidgentherapie in vivo ist auf die zielgerichtete Transduktion der Tumorzellen angewiesen. Dafür ist die Verwendung gewebespezifischer Promotoren und geeigneter viraler Vektoren essentiell. Adenoviren z.B. infizieren unselektiert alle eukaryotischen Zellen. Strategien zur Lösung dieses Problems wären die Verwendung eines Zelltyp-spezifischen Promotors (z.B. AFP bei Lebertumoren) oder aber die genetische Veränderung des Vektors durch spezifische Oberflächenantigene, die spezifisch an Rezeptoren auf den zu adressierenden Zielzellen binden. Weiter ist bei in vivo Studien zu beachten, dass der Einsatz von Adenoviren nicht zu einer langanhaltenden Genexpression führt und daher ungeeignet für den Einsatz zur Heilung genetisch bedingter und neurodegenerativer Erkrankungen ist.

Adenoviren eignen sich für die Tumorthherapie. Es bleibt aber zu beachten, dass in vivo adenoviral transduzierte Zellen anfälliger gegenüber dem eigenen Immunsystem sind [106]. Ebenfalls zirkulieren bei 85% der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen häufig vorkommende Adenoviren Serotypen. Selbst replikationsinkompetente Viren behalten ihre immunogene Eigenschaft und lösen eine verstärkte T-Zellantwort gegen virale Proteine aus [158,159].

Ein Lösungsansatz zur Reduktion der Immunantwort gegen Adenoviren wäre die Minimierung des viralen Anteils kombiniert mit gewebsspezifischen, besser noch mit tumorspezifischen Promotoren. Miyake et al. konnten durch Suizidgen-

therapie mittels eines HIV basierten Vektors in vitro und in vivo eine tumorselektive Transduktion bei adulter T-Zelleukämie erreichen. Grund dafür ist die Eigenschaft des HIV Virus nur CD4⁺ Zellen zu infizieren [160].

Die Suizidgentherapie alleine ist eine sehr gute Therapiealternative für das HB vor allem für die fortgeschrittenen Tumoren und Rezidive, in der die gegenwärtige Chemotherapie aufgrund Therapieresistenz keine Erfolg mehr erzielt. Für den sicheren Einsatz einer adenoviralen Suizidgentherapie beim HB wäre der Einsatz eines HB-spezifischen Promotors essentiell. Derzeit ist für das HB noch kein genaues Target gefunden, welches bei allen HB-Subtypen nachgewiesen werden kann. Das AFP, welches von mehr als 90% der HB exprimiert wird, scheidet als Target für die Gentherapie aus, da es von anderen Tumorerkrankungen, gesunden Hepatozyten und besonders von kleineren Kindern in den ersten 6 Lebensmonaten, vermehrt exprimiert wird [7]. Weitere Untersuchungen zeigten Mutationen im Gen p53 und β -Catenin in bis zu 50%, Mikrosatelliteninstabilität in bis zu 80% sowie eine vermehrte Aktivierung des β -Catenin Gens mit der die Aktivierung des WNT-Signalwegs einhergeht. Der WNT-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung und ist bei der Entstehung vieler Tumoren beteiligt [15,161,162]. Insgesamt ist die Frage nach einem Target für das HB, welches in allen HB-Subtypen vorkommt nicht geklärt.

Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit zeigen, dass die HB-Subtypen sich hinsichtlich ihrer Promotoraktivität unterscheiden. Aus diesem Grunde sollten in zukünftigen Gentherapiestudien am HB unterschiedliche Promotoren in vorausgehenden Untersuchungen auf ihre Eignung überprüft werden. Vor einem klinischen Einsatz der Suizidgentherapie für das HB sind weitere Analysen im Xenotransplantationsmodell notwendig. Des weiteren sollte untersucht werden, inwiefern sich unter der Suizidgentherapie mit AdSuperCD/5-FC eine „Multi-Drug-Resistance“ (MDR) ausbildet, die unter Chemotherapie, wie in 1.1.8 erläutert, auftritt.

6 Zusammenfassung

Das HB ist der häufigste Lebertumor im Kindesalter und hat bei den malignen Erkrankungen im Kindesalter einen Anteil von 0,8-1,0%. Die Prognose und das Langzeitüberleben für Kinder mit einem HB im Stadium III oder IV bzw. bei Rezidiven ist aufgrund der sich entwickelnden Chemotherapieresistenz nicht ausreichend zu verbessern. Daher ist es von großer Bedeutung, neue Therapiealternativen zu entwickeln und zu untersuchen.

In der Therapie solider Tumoren u.a. Ovarial-CA, Colon-CA, Mamma-CA und HCC, spielt die Gentherapie derzeit eine wichtige Rolle. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal in der Therapie des HB eine viral-vermittelte Gentherapie (Suizidgentherapie) untersucht.

Die Suizidgentherapie beruht auf dem Konzept, Tumorzellen selektiv durch Erzeugung toxischer Metabolite aus einer nicht toxischen Substanz, sogenanntes Prodrug, wie z.B. 5-Fluorcytosin (5-FC), in die zytotoxische Substanz, hier 5-Fluorouracil (5-FU), umzuwandeln. Das dafür notwendige Enzym wird durch einen viralen Vektor (hier Adenovirus) in die Zelle als sogenanntes Suizidgen transduziert und dort exprimiert. In dieser Arbeit war das Suizidgen ein Fusionsgen aus der Cytosindesaminase aus *Saccharomyces cerevisiae* (YCD = Yeast CD) und der nachgeschalteten Yeast Uracilphosphoribosyltransferase (YUPRT). Dieses Fusionsgen wird Super-Cytosindesaminase (SCD = SuperCD) genannt.

Zu Beginn der Untersuchung wurde mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz qualitativ die adenovirale Transduktion überprüft bei den drei HB-Zelllinien HepT1, HepT3 und HUH6 sowie für die HCC-Zelllinie HepG2. Als transduzierte Gene dienten AdGFP (Kontrollvirus) und AdSuperCD. Mittels FACS-Analyse konnte die adenovirale Transduktion quantitativ für alle Zelllinien überprüft werden. Die Expression des Suizidproteins SuperCD konnte im Western Blot für die beiden HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 sowie für das HCC HepG2 gezeigt werden, jedoch nicht für die HB-Zelllinie HUH6. Folgend wurden für jede Zelllinie Proliferationsassays unter Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen für 5-FU und 5-FC in Mehrfachbestimmungen durchgeführt und zu

zwei späteren Zeitpunkten unabhängig voneinander wiederholt. Der Proliferationsassay diente zur Überprüfung der Funktionalität des Suizidgeneffektes des AdSuperCD. Anhand des Rechenmodells der nicht-linearen Regression wurde die IC 50 für 5-FC und 5-FU für die entsprechenden Behandlungsgruppen (Kontrolle, AdGFP, AdSuperCD) berechnet.

Für die Therapie mit 5-FU reagiert die HB-Zelllinie HUH6 bereits bei geringen Konzentrationen von 5-FU mit einer starken Proliferationsabnahme, wohingegen HepT1, HepT3 und HepG2 im Gegensatz erst bei einer 10 bis 15-fachen höheren Konzentration von HUH6 eine Proliferationsabnahme zeigten. Bei HepT1, HepT3 und HepG2 zeigte sich in der Behandlungsgruppe AdSuperCD und Therapie mit 5-FU eine höhere Sensibilität als in der Kontrollgruppe. Die Suizidgentherapie mit Adenovirus SuperCD und dem Prodrug 5-FC zeigte für zwei HB-Zelllinien HepT1 und HepT3 und die HCC-Zelllinie HepG2 ein Absterben der mit AdSuperCD transduzierten Zellen unter Behandlung mit dem Prodrug 5-FC, welches intrazellulär durch das exprimierte Suizidprotein zu 5-FU metabolisiert wurde. Die Zelllinie HUH6 sprach aufgrund der ausbleibenden Promotoraktivität des AdSuperCD Virus und der dadurch fehlenden Expression des Suizidproteins nicht auf die Suizidgentherapie an. In einem Promotorassay konnte gezeigt werden, dass der Promotor CMV des AdSuperCD in der Zelllinie HUH6 nicht zur Expression führt.

Die Suizidgentherapie mit AdSuperCD bietet eine vielversprechende Alternative für die Therapie des HB in vitro. Der Suizidtherapieeffekt war in den beiden Subtypen embryonal und embryonal-fetal vorhanden und führte zu guten Therapieergebnissen. Das „Nicht-ansprechen“ des Typs „mixed HB“ ist auf die fehlende CMV Promotoraktivität zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass bei Durchführung der Suizidgentherapie mit einem anderen Promotor die Suizidtherapie auch hier einen Effekt zeigt, da dieser Typ in vitro bereits sehr gut auf den Metabolit des 5-FCs, das Zytostatikum 5-FU, anspricht.

Für den klinischen Einsatz der Suizidtherapie sind weitere experimentelle Untersuchungen unter Einschluss des HB-Xenotransplantatmodells jedoch essentiell.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie(2005). Hepatoblastom des Kindesalter. AWMF online. AWMF-Leitlinien-Register Nr 025/011, Entwicklungsstufe 1+IDA.
- [2] Misick OS (1898). A case of teratoma hepatis. *J Pathol Bacteriol* 5:128-137.
- [3] Schmidt A, Schmidt P, Haas R, Hecker W (1988). Primäre Lebertumoren im Kindesalter: Eine Analyse von 19 Fällen. *Langenbecks Arch Chir* 373: 159-165.
- [4] Weinel P, Freddara R, Bürger D (1986). Hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma. *Monogr. Paediat., Karger, Basel,18: 359-367.*
- [5] Von Schweinitz D., Hartmut Hecker, Gabriele Schmidt-von Arndt and Dieter Harms (1997). Prognostic factors and staging systems in childhood Hepatoblastoma, *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*; 74, 593-599.
- [6] Weinberg A, Feingold M (1983). Primary hepatic tumors in childhood. *Human Pathol*;14: 512-537.
- [7] Meyers RL (2007). Tumors of the liver in children. *Surg Oncol.* 16(3) :195-203
- [8] McLaughlin CC., Baptiste M S, Schymura M J1,2, Nasca P C, and Zdeb M S (2006). Maternal and Infant Birth Characteristics and Hepatoblastoma. *Am J Epidemiol.* May 1;163(9):818-28.
- [9] Oue T, Kubota A, Okuyama H, Kawahara H, Nara K, Kawa K, Kitajima H (2003). Hepatoblastoma in children of extremely low birth weight: a report from a single perinatal center. *J Pediatr Surg.* 38(1):134-137.
- [10] Sainati L, Leszi A, Stella M, Montaldi A, Perilongo G, Rugge M, Bolcato S, Iolascon A, Basso G (1998). Cytogenetic analysis of Hepatoblastoma: hypothesis of cytogenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study. *Cancer Genet Cytogenet*, 104:29-44.
- [11] Buendia M A (2002). Genetic Alterations in Hepatoblastoma and Hepatocellular Carcinoma: Common and Distinctive Aspects. *Med Pediatr Oncol* 39:530-535.
- [12] Suzuki M, Kato M, Yuyan C, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y (2008). Whole – genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci.* 99(3):564-570.

- [13] Kraus JA, Albrecht S, Wieslter OD, Von Schweinitz D, Pietsch T (1996). Loss of heterozygosity on chromosom 1 in human Hepatoblastoma. *Int J Cancer*, 67:467-471.
- [14] Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T (1994). Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in Hepatoblastoma. *Cancer* 54:5041-5044.
- [15] Albrecht S, Hartmann W, Houshdaran F, Koch A, Gärtner B, Prawitt D, Zabel BU, Russo P, Von Schweinitz D, Pietsch T (2004). Allelic loss but absence of mutations in the polyspecific transporter gene BWR1A on 11p15.5 in Hepatoblastoma; *Int: J. Cancer*, 111, 627-632.
- [16] Hartmann W, Waha A, Koch A, Goodyer CG, Albrecht S, von Schweinitz D, Pietsch T (2000). P57KIP2 is not mutated in Hepatoblastoma but shows increased Transcriptional Activity in a Comparative Analysis of the Three Imprinted Genes p57KIP2, IGF2 and H19. *American Journal of Pathology*, 157, 4:1393-1403.
- [17] Von Schweinitz D, Kraus J A, Albrecht S, Koch A, Fuchs J, Pietsch T (2002). Prognostic Impact of Molecular Genetic Alterations in Hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol*;38:104-108.
- [18] Ruck P. MD and Xiao J-C. MD (2002). Stem-like Cells in Hepatoblastoma. *Med. Pediatr. Oncology*: 39: 504-507.
- [19] Fiegel H C, Glüer S, Roth B, Rischewski J, Von Schweinitz D, Ure B, Lambrecht W, Kluth D (2004). Stem-like Cells in Human Hepatoblastoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol. 52(11): 1495-1501.
- [20] Ishak KG, Glunz PR (1967). Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood: report of 47 cases. *Cancer* 20: 396-422.
- [21] Haas J E, Muczynynski K A, Krailo M, Ablin A, Land V, Vietti TJ, Hammond GD (1989). Histopathology and Prognosis in Childhood Hepatoblastoma and Hepatocarcinoma. *Cancer*; 64:1082-1095.
- [22] Von Schweinitz D, Hecker H, Harms D, Bode U, Weinel P, Bürger D, Ertmann R, Mildenerger H (1995). Complete Resection Before Development of Drug Resistance Is Essential for Survival from Advanced Hepatoblastoma – A Report form the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB89, *J Ped Surg* 30:6;845-852.
- [23] Schmidt D, Harms D, Lang W (1985). Primary malignant hepatic tumours in childhood, *Vichows Arch (Pathol Anat)* 407: 387-405.

- [24] Kaw YT, Hansen K (1993). Fine needle aspiraton cytology of undifferentiated small cell (anaplastic) Hepatoblastoma. *Acta Cytol* 37: 216-220.
- [25] Von Schweinitz D, Byrd DJ, Hecker H, Weini P, Bode U, Burger D, Erttmann R, Harms D and Mildemberger H (1997). Efficiency and Toxicity of Ifosfamide, Cisplatin and Doxorubicin in the Treatment of Childhood Hepatoblastoma. *European Journal of Cancer*, Vol 33, No.8 :1243-1249.
- [26] Kasai M, Watanabe I (1970). Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. A study of 70 cases collected in Japan. *Cancer* 25, 551-563.
- [27] Gonzalez-Crussi F, Upton MP, Maurer HS (1982). Hepatoblastoma Attempt at characterization of histologic subtypes. *Am J Surg Pathol* 6:599-612.
- [28] Von Schweinitz D, Byrd DJ, Hecker H, Weini P, Bode U, Burger D, Erttmann R, Harms D and Mildemberger H (1997). Efficiency and Toxicity of Ifosfamide, Cisplatin and Doxorubicin in the Treatment of Childhood Hepatoblastoma. *European Journal of Cancer*, Vol 33, No.8 :1243-1249.
- [29] Dehner LP, Manivel JC (1988). Hepatoblastoma: An analysis of the relationship between morphologic subtypes and prognosis. *Am J Pediatr Hematol/Oncol* 10(4):301-307.
- [30] Haas JE, Feusner JH, Finegold MJ (2001). Small Cell undifferentiated histology in hepatoblastoma may be unfavorable. *Cancer* 92, 12: 3130-3134.
- [31] Conran RM, Hitchcock CL, Waclawiw MA, Stocker JT, Ishak KG (1992). Hepatoblastoma: the prognostic significance of histologic type. *Pediatr Pathol.*; 12: 167-183.
- [32] Exelby PR, Filler RM, Grosfeld JL (1974). Liver Tumors in Children in the Particular Reference to Hepatoblastoma and Hepatocellular Carcinoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey. *J Pediatr Surg* 10:329-3337.
- [33] Fuchs J, Rydzynski J, von Schweinitz D, Bode U, Hecker H, Weiniel P, Bürger M, Harms D, Erttmann R, Oldhafer K, Mildemberger H, the Study Committee of the Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94 for the German Society for Pediatric Oncology and Hematology (2002). Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with Hepatoblastoma – a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer* 95: 172-182.
- [34] Stringer MD, Hennayake S, Howard ER, Spitz L, Shafford EA, Mieli-Vergani G, Saxena R, Malone M, Dicks-Mireaux C, Karani J (1995). Improved outcome for children with Hepatoblastoma. *British Journal of Surgery* 82:386-391.

[35] Ortega J A, Douglass E, Feusner J, Reynolds M, King D, Quinn J, Finegold M, Haa J, Krailo M (1994). Treatment of Hepatoblastoma: results of the pediatric intergroup liver tumor study (CCG 8881/POG 8945). *Med Pediatr Oncol* 23:170.

[36] Gauthier F, Valayer J, Le Thai B, Sinico M, Kalifa C (1986). Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in children: Analysis of 29 cases. *J Pediatr Surg*, 21:424-429.

[37] Reynolds M, Douglass EC, Finegold M, Cantor a, Glicksman A (1992). Chemotherapy can convert unresectable hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 27:1080-1084.

[38] Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, Reynolds M, Quinn JJ, Finegold MJ, Haas JE, King DR, Liu-Mares W, Sinsel MG, Krailo MD (2000). Randomized comparison of cisplatin/vincristine/fluorouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric Hepatoblastoma: a report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol* 18:2665-267.

[39] Von Schweinitz D, Hecker H, Bürger D, Mildenerger H (1995). Chirurgische Therapie von Hepatoblastomen im Kindesalter. *Langenbecks Arch Chir* 380: 315-320.

[40] HB99, Protokoll zur kooperativen Therapie-Optimierungsprüfung der Behandlung von malignen Lebertumoren des Kindesalters. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie; Protokollfassung Dezember 99.

[41] Aronson DC, Schnater JM, Staalman CR, Weverling GJ, Plaschkes J, Perilongo G, Brown J, Philips A, Otte JB, Czauderna P, MacKinlay G, Vos A (2005). Predictive Value of the Pretreatment Extent of Disease System in Hepatoblastoma: Results from The International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 Study, *Journal of Clinical Oncology* 20;23(6):1245-52.

[42] Häberle B, Bode U, von Schweinitz D (2003). Differentiated treatment protocols for high- and standard-risk Hepatoblastoma - an interim report of the German Liver Tumor Study HB99. *Klin Pädiatr* 215(3):159-65.

[43] Casas-Melley A T, Malatack J, Consolini D, Mann K, Raab C, Flynn L, Woolfrey P, Menendez J, Dunn S P (2007). Successful liver transplant for unresectable Hepatoblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 42, 184-187.

[44] Otte JB, Goyet J V, Reding R (2005). Liver transplantation for Hepatoblastoma: indications and contraindications in the modern era. *Pediatr Transplant* 9(5): 557-65.

- [45] Avila LF, Luis AL, Hernandez F, Garcia Miguel P, Jara P, Andres AM, Lopez Santamaria M, Tovar JA (2006). Liver transplantation for malignant tumors in children. *Eur J Pediatr Surg.* 16(6) :411-414.
- [46] Beaunoyer M, Vanatta JM, Ogihara M, Strichartz D, Dahl G, Berquist WE, Castillo RO, Cox KL, Esquivel CO (2007). Outcomes of transplantation in children with primary hepatic malignancy. *Pediatr Transplant.* 11(6):655-660.
- [47] Reynolds M (1995). Conversion of Unresectable to respectable Hepatoblastoma and Long-term Follow-up Study. *World J. Surg* 19:814-816.
- [48] Brown J, Perilongo G, Shafford E, Keeling J, Pritchard J, Brock P, Dicks-Mireaux C, Phillips A, Vos A, Plaschkes J (2000). Pretreatment prognostic factors for children with Hepatoblastoma- results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Study SIOPEL 1. *European Journal of Cancer* 36:1418-1425.
- [49] Pham TH, Iqbal CW, Grams J M, Zarroug AE, Wall JCH, Ishitani MB, Nagorney DM, Moir C (2007). Outcomes of primary liver cancer in children: an appraisal of experience. *Journal of Pediatric Surgery* 42,834-839.
- [50] Ioris MD, Brugieres L, Zimmermann A, Keeling J, Brock P, Maibach R, Pritchard J, Shafford L, Zsiros J, Czaudzerna P, Perilongo G (2007). Hepatoblastoma with a low serum alpha-fetoprotein level at diagnosis: The SIOPEL group experience. *Eur J Cancer* 2007, article in press.
- [51] Fuchs J, Schmidt D, Pietsch T, Miller K, Schweinitz D (1996). Successful Transplantation of Human Hepatoblastoma into Immunodeficient Mice. *Journal of Pediatric Surgery* 31,9:1241-1246.
- [52] Fasano M, Theise ND, Nalesnik M, Goswami S, Garcia des Davila MT, Finegold MJ, Greco MA (1998). Immunohistochemical evaluation of Hepatoblastomas with use of the hepatocyte-specific marker, hepatocyte paraffin 1 and the polyclonal anti-carcinoembryonic antigen. *Mod Pathol.* 11(10):934-938.
- [53] Zynger DL, Guta N, Lauan CL, Chou PM, Yang G-Y, Yang XJ (2008). Expression of glypican 3 in Hepatoblastoma: an Immunohistochemical study of 65 cases. *Human Pathol.* October, 39(2):224-230.
- [54] Bader P., Fuchs J., Wenderoth M., von Schweinitz D, Niethammer D, Beck J F (1998). Altered Expression of Resistance Associated Genes in Hepatoblastoma Xenografts Incorporated into Mice Following Treatment with Adriamycin or Cisplatin, *Anticancer Research* 18: 3127-3132.
- [55] Warmann S, Hunger M, Teichmann B, Flemming P, Gratz K F, Fuchs J (2002). The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human Hepatoblastoma – clinical course and in vivo model. *Cancer* 95:1795-1801.

- [56] Warmann S, Göhring G, Teichmann B, Geerlings H, Fuchs J (2002). MDR1 Modulators Improve the Chemotherapy Response of Human Hepatoblastoma to Doxorubicin In vitro. *J Ped Surg* 37,11, 1579-1584.
- [57] Warmann S, Göhring G, Teichmann B, Geerlings H, Pietsch T, Fuchs J.(2003) P-glycoprotein modulation improves in vitro chemosensitivity in malignant pediatric liver tumors. *Anticancer Res* 23:4607-4612.
- [58] Warmann SW, Heitmann H, Teichmann B, Gratz KF, Ruck P, Hunger M, Fuchs J (2005). Effects of P-glycoprotein modulation on the chemotherapy of xenotransplanted human Hepatoblastoma. *Pediatr. Hematol Oncol* 22(5): 373-386.
- [59] Warmann SW, Fuchs J (2007). Drug resistance in Hepatoblastoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 8, 93-97.
- [60] Niedzielska G, Kocki J (2000). Evaluation of bcl-2 gene expression in papilloma of larynx in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 53:25.
- [61] Warmann SW, Frank H, Heitmann H, Ruck P, Herberts T, Seitz G, Fuchs J (2008). Bcl-2 Gene Silencing in Pediatric Epithelial Liver Tumors. *J Surg Res*. 144(1):43-48.
- [62] Forth W, Henschler D, Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer 2005, 9. Auflage, S29.
- [63] Graepler F, Lemken M-L, Wybranietz WA, Schmidt U, Smirnow I, Groß CD, Spielge M, Schenk A, Gregeor M, Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM (2005). Bi-functional chimeric SuperCD suicide gene-YCD:YUPRT fusion is highly effective in a rat hepatoma model. *World J Gastroenterol* 11 (44):6910-6919.
- [64] Cao G, Kuriyama S, Gao J, Nakatani T, Chen Q, Yoshiji H, Zhao L, Kojima H, Dong Y, Fukui H, Hou J (2001). Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter. *European J Cancer* 37, 140-147.
- [65] Liovet, J.M.; Burroughs, A.; Bruix, J (2003). Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 362: 1907-1917.
- [66] Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2006). Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterology* 14;12(38):6085-6097.
- [67] Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin*. Gerd Herold, 2007, 479-480.
- [68] Graham S G (2001). Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Ultrastructural Pathology* 25: 479-516.

- [69] Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier, Urban & Fischer 2004, 3.Auflage, 687-688.
- [70] Wörns M-A, Schuchmann M, Kanzler S, Weinmann A, Galle P R (2007). Molekulare Pathogenese des Leberzellkarzinoms. *Gastroenterologie* 2:12–19.
- [71] Czauderna P, Machkinlay G, Perilongo G, Brown J, Shafford E, Aronson D, Pritchard J, Chapchap P, Keeling J, Plaschkes J, Otte JB (2002). Hepatocellular Carcinoma in Children: Results of the First Prospective Study of the International Society of Pediatric Oncology Group, *Journal of Clinical Oncology*: Vol 20, No. 12.
- [72] Czauderna P. Adult Type vs Childhood Hepatocellular Carcinoma – Are they the same of different lesions? Biology, natural history, prognosis and treatment (2002). *Med Pediatr Oncol.* 39:519-523.
- [73] Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer 2005, 9. Auflage, S26-34.
- [74] Wikipedia, <http://de.wikipedia.org/wiki/Gentherapie>; September 13.09.2007.
- [75] Löffler G, Petriedes P (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, 7. Auflage, 368-370.
- [76] Anson DS (2004). The use of tetroviral vectors for gene therapy –what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy* 2 (1) :9.
- [77] Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer 2005, 9. Auflage, 30-31.
- [78] Löffler G, Petriedes P (2003). Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, 7. Auflage, 368-370.
- [79] Wadhwa P D, Zielske S P, Roth J C, Ballas C B, Bowman J E, Gerson S L (2002). Cancer Gene Therapy: Scientific Basis. *Annu. Rev. Med.*, 53:437-452.
- [80] Böcker W, Denk H, Heitz P U (2004). Pathologie. Elsevier, Urban und Fischer, 3.Auflage, 180-184.
- [81] Löffler G, Petriedes P.(2003). Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, 7. Auflage, 1165-1168.
- [82] Spitz Fr, Nguyen D, Skibber JM et al. (1996). Adenoviral –mediated wild type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* 2: 1665-1671.

- [83] Scinexx, das Wissensmagazin. Meilensteine der Gentherapie
http://www.scinexx.de/index.php?cmd=focus_detail2&f_id=10&rang=6
(19. Okt. 2007)
- [84] Shao –Ying, Yan-Fang Sui, Zeng-Shan Li, Cheng-En Pan, Jing Ye, Wen-Yong Wang (2003). Construction of a regulable gene therapy vector targeting for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 9(4):688-691.
- [85] Lauer, U. M., M. Spiegel, M. Bitzer, W. A. Wybranietz, C. D. Groß, F. Prinz, F. Graepler, W. Neubert, and M. Gregor. 1998. New strategies for the genetic therapy of primary liver carcinoma. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies* 7/6:567-571.
- [86] Lal, S.; Lauer, U.M.; Wessels, J.T.; Niethammer, D.; Beck, J.; Schlegel, P.G. (2000). Suicide Genes: Past, Present and Future Perspectives, *Immunology Today* 21: 48-54.
- [87] Bitzer, M.; Lauer, U.M. (2002). Effiziente Selektionsmechanismen: Voraussetzung für erfolgreiche Gentherapie, *DMW* 127: 1623-1624.
- [88] Springer C. J., Niculescu-Duvaz I (2000). Prodrug-activating systems in suicide gene therapy, *The Journal of Clinical Investigation*: Vol. 105, No. 5, 1161-1167.
- [89] Kunitomi M, Takayama E, Suzuki S, Yasuda T, Tsutsui K, Nagaike K, Hiroi S, Tadakuma T (2000). Selective inhibition of hepatoma cells using diphtheria toxin A under the control of the promoter/enhancer region of the human alpha-fetoprotein gene. *Jpn J Cancer Res.* 91(3):343-350.
- [90] Armeanu S, Lauer UM, Smirnow I, Schenk M, Weiss TS, Gregor M, Bitzer M (2003). Adenoviral Gene Transfer of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand Overcomes an Impaired Response of Hepatoma Cells but Causes Severe Apoptosis in Primary Human Hepatocytes. *Cancer Res.* 15;63(10):2369-2372.
- [91] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M (2007). Suicide genes for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 28, 4-41.
- [92] <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> (Oktober 2007). Gene therapy clinical Trials worldwide. Search parameters: gene type: suicide
- [93] Kievit, E., E. Bershady, E. Ng, P. Sethna, I. Dev, T. S. Lawrence, and A. Rehemtulla. 1999. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* 59:1417-1421.

[94] Seefried, S. 2004. Generierung und Evaluation neuartiger replikationskompetenter Retroviren (RCR) für einen effizienten therapeutischen HCC-Gentransfer. Diplomarbeit Universität Tübingen, Fachrichtung Biochemie; S.5.

[95] Adachi, Y., T. Tamiya, T. Ichikawa, K. Terada, Y. Ono, K. Matsumoto, T. Furuta, H. Hamada, and T. Ohmoto. 2000. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine desaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Ther.* 11:77-89.

[96] Erbs, P., E. Regulier, J. Kintz, P. Leroy, Y. Poitevin, F. Exinger, R. Jund, and M. Mehtali. 2000. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* 60:3813-3822.

[97] Longley, D. B., D. P. Harkin, and P. G. Johnston. 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330-338.

[98] Pietsch T, Fonatsch C, Albrecht S, et al. Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human Hepatoblastoma. *Lab Invest* 1996; 4:809-818.

[99] Doi I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with Hepatoblastoma. *Gann* 1976; 67:1-7.

[100] David P. Aden, Alice Fogel, Stanley Plotkin, Ivan Damjanov & Barbara B. Knowles Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; Vol. 282: 615 – 616.

[101] Kayser F H, Beinz K A, Eckert J, Zinkernagel R M (2001) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, 10. Auflage, 434-436.

[102] Gosh S S, Gopinath P, Ramesh A.(2006). Adenoviral Vectors, A Promising Tool for Gene Therapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 133(1),9-29.

[103] Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, J. E. Kurt, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Caxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.

[104] Trapnell, B. 1993. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 12:185-199.

[105] Edelstein M L, Abedi M R, Wixon J (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update. *J Gene Medicine* 9:833-842.

[106] Romano G (2006) The Controversial Role of Adenoviral-Derived Vectors in Gene Therapy Programs: Where do we stand? *Durg News Perspect* 19(2), 99-106.

[107] Forschungsinstitutes für Virologie und Biomedizin Wien (September 2007), <http://www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/ADENOGEN1.HTML>

[108] Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf I Medizinische Klinik und Poliklinik. http://www.uke.uni-hamburg.de/kliniken/medizinische-klinik-1/index_20991.php#15

[109] Graepler F, Lemken M-L, Wybranietz W A, Schmidt U, Smirnow I, Groß C D, Spiegel M, Schenk A, Graf H, Lauer U A, Vonthein R, Gregor M, Armeanu S, Bitzer M, Lauer U M (2005). Bifunctional chimeric SuperCD suicide gene –YCD: YURPT fusion is highly effective in a rat hepatoma model. *World J. Gastroenterol* 11(44):6910-6919.

[110] Shenk, T. 1996. Adenoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2111-2148.

[111] Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter 2002; 259. Auflage, S 1833.

[112] Roth, Fenner, *Arzneistoffe Struktur-Bioreaktivität-Wirkungsbezogene Eigenschaften*, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2000; 3. Auflage S 161.

[113] Mutschler E, Geisslinger G., Kroemer H K, Schäfer Korting M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, 897.

[114] Ortega JA, Douglass EC, Feusner JH, et al. Randomized comparison of cisplatin/vincristine/flourouracil and cisplatin/continuous infusion doxorubicin for treatment of pediatric Hepatoblastoma: a report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol* 2000;18:2665-2675.

[115] Mutschler E, Geisslinger G., Kroemer H K, Schäfer Korting M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, 838-839.

[116] Vermes A, Guchelaar H.-J., Dankert J. (2000). Flucytosin: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46,171-179.

[117] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:685.

- [118] Burnette, W. N. 1981. „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal.Biochem.* 112:195-203.
- [119] Towbin, H. and J. Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting. *J.Immunol.Methods* 72:313-340.
- [120] EZ4U The4th Generation non radioactive cell proliferation &cytotoxicity assay, Biomedica Gruppe; Beipacktext S 7 .
- [121] EZ4U The4th Generation non radioactive cell proliferation &cytotoxicity assay, Biomedica Gruppe; Beipacktext S 9.
- [122] Warmann SW, Armeanu S, Heitmann H, Ruck P, Seitz G, Wessels J T, Lemken M-L, Lauer UM, Fuchs J, Bitzer M (2006). Optimizing vector application for gene transfer into human Hepatoblastoma cells. *Pediatr Surg Int* 22:733-742.
- [123] Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujiii H, Hamada H, Nakano H (2000). Combined suicide gene therapy for human colon cancer cellusing adenovirus-mediated transfer of Escherichia coli cytosine desaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Therapy* 7,7:1015-1022.
- [124] Desaknai S, Lumniczky K, Esik O, Hamada H, Safrany G (2003). Local tumour irradiation enhances the anti-tumor effect of a double –suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med* 5, 377-385.
- [125] Harris, J.D.; Gutierrez, A.A.; Hurst, H.C.; Sikora K.; Lemoine, N.R. (1994). Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation, *Gene Ther.* 1: 170-175.
- [126] Cao G, Kuriyama S, Gao J, Nakatani T, Chen Q, Yoshiji H, Zhao L, Kojima H, Dong Y, Fukui H, Hou J (2001). Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter. *European J Cancer* 37, 140-147.
- [127] Adachi Y., Tamiya T., IchikawaT., et al.(2000). Experimental Gene Therapy for Brain Tumors Using Adenovirus –Mediated Transfer of Cytosine Deaminase Gene and Uracil Phosphoribosyltransferase Gene with 5-Fluorocytosine, *Human Gene Therapy* 11: 77-89.

[128] Graepler F., Lemken M-L., Wybranietz W. A, Schmidt U, Smirnow I, Groß CD, Spiegel M, Schenk A, Graf H, Lauer UA, Vonthein R, Gregor M, Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM (2005). Bifunctional chimeric SuperCD suicide gene – YCD: YUPRT fusion is highly effective in a rat hepatoma model, *World J. Gastroenterol.* 11(44): 6910-1919.

[129] Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J (2006). Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol.* 14;12(38):6085-97.

[130] Lemken M-L, Graepler F, Wolf C, Wybrantiz WA, Smirnow I, Schmidt U, Gregor M, Bitzer M, Lauer UM (2007). Fusion of HSV-1 VP22 to a bifunctional chimeric SuperCD suicide gene compensates for low suicide gene transduction efficiencies. *Int J Oncol.* 30(5):1153-61.

[131] Skog J, Mei Y-F, Wadell G (2002). Human adenovirus serotypes 4p and 11p are efficiently expressed in cell lines of neural tumour origin. *J Gen Virol.* 83(Pt 6):1299-309.

[132] Weaver LS, Kadan MJ (2000). Evaluation of Adenoviral Vectors by Flow Cytometry. *Methods* 21(3):297-312.

[133] Lemken M-L., Wybranietz W. A., Schmidt U., Graepler F, Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM (2005). Liver-directed gene expression employing synthetic transcriptional control units. *World J. Gastroenterol.* 11(34): 5295-5302.

[134] Aramaki Y., Lee I., Arima H., et al.(2003). Efficient Gene Transfer to Hepatoblastoma Cells through Asialoglycoprotein Receptor and Expression under the Control of the Cyclin A Promoter, *Biol. Pharm. Bull* 26(3):357-360.

[135] Perilongoa G, Shaffordb E., Maibachc R, Aronsond D, Brugiere L., Brockf P, Childsg M, Czaudernah P, MacKinlayi G., Ottej J.B, Pritchardk J, Rondellil R, Scopinarom M, Staalmann C, Plaschkeso J (2004). Risk-adapted treatment for childhood Hepatoblastoma: final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOPEL 2. *Eur J Cancer* 40(3) :411.421.

[136] Feng LF, Zhong M, Lei XY, Zhu BY, Tang SS, Liao DF (2006). Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. *J Drug Target.* 14(1):21-6.

[137] Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995; 345: 939-944.

[138] Francini G, Petrioli R, Lorenzini L et al. Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 899-906.

- [139] Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (2004). Kolorektales Karzinom. AWMF online. AWMF-Leitlinien-Register Nr 032/010, Entwicklungsstufe 3+IDA.
- [140] Fanciullino R, Giacometti S, Mercier C, Aubert C, Blanquicett C, Piccerelle P, Ciccolini J (2007). In vitro and in vivo reversal of resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells with a novel stealth double-liposomal formulation *Br J Cancer* 8;97(7):919-26.
- [141] Tegze B, Tulassay Z, Györfy B (2006). Chemotherapy agents, response rates and mechanisms of resistance in the therapy of the colorectal carcinoma. *Magy Onkol.* 2006;50(4):315-23.
- [142] Lenz HJ. (2006). Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* 587:211-31.
- [143] Zhu H, Guo W, Zhang L, Davis JJ, Teraishi F, Wu S, Cao X, Daniel J, Smythe WR, Fang B (2005). Bcl-XL small interfering RNA suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5(3),451-456.
- [144] Leitlinie der Dt. Ges. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Dt. Krebsgesellschaft (DKG) (2006). Exokrines Pankreaskarzinom. AWMF online. AWMF-Leitlinien-Register Nr 021/007, Entwicklungsstufe 3+IDA.
- [145] Kuriyama S, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Nakatani T, Akahane T, Toyokawa Y, Kojima H, Okamoto S, Fukui H (1999). Comparison of gene therapy with the herpes simplex virus thymidine kinase gene and the bacterial cytosine deaminase gene for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 34(10):1033-1041.
- [146] Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujiii H, Hamada H, Nakano H (2000). Combined suicide gene therapy for human colon cancer cell using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene and *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Therapy* 7,7:1015-1022.
- [147] Shen LZ, WU WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K (2002). Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol.* 8(2):270-275.
- [148] Adachi Y., Tamiya T., Ichikawa T., et al. (2000). Experimental Gene Therapy for Brain Tumors Using Adenovirus –Mediated Transfer of Cytosine Deaminase Gene and Uracil Phosphoribosyltransferase Gene with 5-Fluorocytosine, *Human Gene Therapy* 11: 77-89.

- [149] Sakurai F, Kawabata K, Yamaguchi T, Hayakawa, Mizuguchi H (2005). Research article: Optimization of adenovirus serotype 35 vectors for efficient transduction in human hematopoietic progenitors: comparison of promotor activities. *Gene Therapy* 12,1424-1433.
- [150] Cayer M-P, Drouin M, Esa S-P, Forest A, Côté S, Simard C, Boyer L, Jacques A, Pineault N, Jung D (2007). *J Immunol Methods*. 30;322(1-2):118-127.
- [151] Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Björklund L, Isacson O, Kim KS. (2002). Analysis of different promotor systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 20: 139-145.
- [152] Kan O, Kingsman S, Naylor S (2002). Cytochrome P450-based cancer gene therapy: current status. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2 (8), 857–868.
- [153] Braybrooke J.P., Slade A, Deplanque G, Harrop R, Madhusudan S, Forster MD, Gibson R, Makris A, Talbot DC, Steiner J, White L., Kan O, Naylor S, Carroll M.W, Kingsman SM, Harris AL (2005). Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. *Clin. Cancer Res.* 11 (4), 1512–1520.
- [154] Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F, Manabe D, Thompson TC, Kumon H (2007). Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tk gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther.* 15(4):834-40.
- [155] Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M, Barnes MN, Strong TV, Arani RB, Arafat W, Hughes JV, Siegal GP, Curiel DT (2000). Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther.* 2(5):524-30.
- [156] Colombo F, Barzon L, Franchin E, Pacenti M, Pinna V, Danieli D, Zanusso M, Palù G (2005). Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Ther.* 12(10):835-48.
- [157] Mullen JT, Tanabe KK (2002). New approaches to the Treatment of Hepatic Malignancies - Viral Oncolysis for Malignant Liver Tumors. *Ann of Surg Oncol* 10(6):596-605.
- [158] Smith C. A., Woodruff L. A., Kitchingman G. R., Rooney C. M. (1996). Adenovirus-Pulsed Dendritic Cells Stimulate Human Virus-Specific T-Cell Responses In vitro, *Journal of Virology*: 6733-6740.
- [159] Somia, N.; Verma, I.M. (2000). Gene therapy: Trias and tribulations, *Nat. Rev. Genet.* 1: 91-99.

[160] Miyake K, Inokuchi K, Miyake N, Dan K, Shimada T (2007). HIV vector-mediated targeted suicide gene therapy for adult T-cell leukemia. *Gene Therapy* 14, 1662-1667.

[161] Koch A, Waha A, Hartmann W, Hrychyk A, Schüller U, Waha A, Wharton KA, Fuchs SY, von Schweinitz D, Pietsch T (2005). Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastomas. *Clin Cancer Res.* 11(12):4295-304.

[162] Curia MC, Zuckermann M, De Lellis L, Catalano T, Lattanzio R, Aceto G, Veschi S, Cama A, Otte JB, Piantelli M, Mariani-Costantini R, Cetta F, Battista P (2008). Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations. *Mod Pathol.* 21(1):7-14.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-FC	5-Fluorcytosin
5-FdUMP	5-Fluor-desoxymonophosphat
5-FU	5-Fluorouracil
5-FUTP	5-Fluorouraciltriphosphat
Abb.	Abbildung
AdGFP	Adenovirus GFP
AdSCD	Adenovirus Super CD
AdSuperCD	Adenovirus Super CD
AFP	Alpha-Fetoprotein
BCD	Bacterial Cytosindesaminase, Bacterial CD
BWS	Beckwith- Wiedemannsyndrom
bzw.	Beispielsweise
CAR	Coxsackie and adenovirus receptor
CCSG	Children's Cancer Study Group
CD	Cytosindesaminase
CDDP	Cisplatin
COP	Children's Oncology Group
DOXO	Doxorubicin
dTMP	Desoxy-Thymidinmonophosphat
dUMP	Desoxy-Uracilmonophosphat
ECL	enhanced-chemiluminescence system
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FAP	Familiäre Adenomatosis Polyposis
FdUMP	Fluordesoxy-monophosphat
GDEPT	Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GST μ	Gluthation-S-Transferase μ
HB	HB
HB-Zelllinie	Hepatoblastom - Zelllinie
HBV	Hepatitis-B-Virus

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCC-Zelllinie	Hepatozelluläre Karzinom – Zelllinie
hCMV	Immediate-early enhancer /promotor fragment of the human cytomegalovirus (vgl. Paper Wybranietz 2001)
HCV	Hepatitis-C-Virus
LOH	loss of heterozygosity
POG	Pediatric Oncology Group
PRETEXT	Pretreatment extent of disease
SCID	Sever Combined Immunodeficiency
SIOPEL	International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group
sog.	sogenannt
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TOPO II α	Topoisomerase II alpha
UPRT	Uracilphosphoribosyltransferase
VEGF	Vaso Endothelial Growth Factor
YCD	Yeast Cytosindesaminase, Yeast CD
vgl.	vergleiche
YUPRT	Yeast Uracilphosphoribosyltransferase
VCR	Vincristin
VEGF	Vaso endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

9 Anhang

9.1 Material

9.1.1 Zellkultur

Kulturmedium	DULBECCO`s MEM (1x) – Flüssig- und Trockenmedium w 3,7 g/l NaHCO ₃ w 1,0 g/l D-Glucose w/o L-Glutamine tested for endotoxine [500 ml] Cat. No.: F 0415 BIOCHROM AG
Medium-Zusatz	HEPES Pufferlösung 1M, Flüssig 238,3 g/L HEPES in destilliertem Wasser pH: 7,2 bis 7,5 pK _a : 7,3 bis + 37° C Cat. No.: 15630 – 056 GIBCO™ Invitrogen Corporation
Medium-Zusatz	L-Glutamine [200 mM] Cat. No.: K 0283 BIOCHROM AG
Medium –Zusatz	Fötale Bovines Serum(FCS) Geprüft auf: - Endotoxine - Mykoplasmen - Bakterielle L-Formen - Viruskontaminationen - Antikörper gegen Viren(BVD-MD, IBR-IVP, PI3) Cat. No. S 0115, BIOCHROM AG

Zellbehandlung (Passagieren)	PBS Phosphate Buffered Saline without Ca ²⁺ and Mg ²⁺ (10x) Sterile Filtered for Cell Culture Volume: 1000ml Cat. No: BE17-517Q LotNo: 3Mb0193 Cambrex Bio Science Verviers,
Destilliertes Wasser (für 1X PBS, Zell- passage)	Wasser für Infusionszwecke 100 ml Glaxo SmithKline GmbH & Co. KG 80 700 München
Zellbehandlung (Passagieren)	Trypsin EDTA (10 X) 0,5% / 0,2% in D-PBS Cat. No.: L 11 – 003 PAA Laboratories GmbH
Kulturflaschen	Corning Incorporated 75cm ² Cell Culture Flask Treated 2µm vent cent Nr.3376 COSTAR®
Inkubator	Heraeus BBD 6220 37°C 10%CO2 95%rH
Lichtmikroskop	Fluovert FS WILD MPS 52 LEITZ Herbrugg Switzerland

Sterilbank (Labor Fuchs)	HLB 2472 GS Heraeus Lamin Air
Handschuhe	Puderfreie Latex-Untersuchungshandschuhe Kimberly-Clark SP2220E
Pipettierhilfe	Pipetboy acu IBS Integra Biosciences
Stabpipetten 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Falcon Advantage Pipetten
Glaspipetten (steril)	Pasteur Capillary Pipetts Long Size 230 mm WU Mainz

9.1.2 HE-Färbung

Objektträger	Super Frost [®] Plus Objektträger Microscope Slides Art.-Nr.: 03 -0060 R. Langenbrinck
Petrischalen	Lot: 4450152 CELLSTAR
Formalin	Roth [®] Histofix Formaldehydlösung 4,5% Säurefrei pH 7 – phosphatgepuffert Art. Nr.: 2213.3 Carl Roth GmbH & Co.
Hämalaun	Hämalaun Mayers Hamalunlösung für die Mikroskopie Best.Nr.:1.09249.0500 Merck

Eosin	Eosin, CERTISAIN® Best.Nr.: 1.15935.0025 Merck
Xylol	Xylol Best-NR.: 1.08685.2500 Merck
Eindeckmedium	Depex Best-Nr.: 18243 SERVA Electrophoresis GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 40 HBO 50/AC ZEISS

9.1.3 Virustransduktion

AdvSCD	Adenovirus SuperCD (AdSCD), CMV Promotor
AdvGFP	Rous- Sarcomar- Virus (Promotor) RSV-GFP 5
Sterilbank	Hera safe Typ: HSP 12 Order No: 51021641 Serial No.: 40372956 Heraeus
Inkubator	Biosafe eco Model: 700 40 Inkubationsbedingungen: 37°C 5,0% CO ₂ INTEGRA BIOSCIENCES

Mikroskop	CK 40 – F 200 No.: 1 F 074 92 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Fluoreszenzmikroskop	IX 50 – S 8F2 No: 9 M 11 838 , OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Fluoreszenzlampe	U-RFL-T-200 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Vortexer	Vortex Mixer Neo Lab® 7 -2020
ELISA –Reader	GENIOS Plus Art.No.: F 129024 Serial No.:12902400132 M-Code: 3360123 TECAN
Autoclav	Tuttnauer Autoclave –Steam Sterilizer Systec 3850 EL Serial No.: 2ä310025

9.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Objektträger	BD Falcon™ Culture Slides 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Glass Slides Sterile REF: 354108 REF 354118 BD Biosciences
Formalin	Roti® Histofix Formaldehydlösung 4,5% Säurefrei pH 7 – phosphatgepuffert Art. Nr.: 2213.3; Carl Roth GmbH & Co

1. Antikörper	<p>Mouse Anti-Adenovirus Monoclonal Antibody Cat.NO.:MAB 8052 Lot.No.: 20051017 Isotyp: IgG_{1K} ; Chemicon International</p>
2. Antikörper	<p>Cy3[™] –conjugated AffiniPure Goat-Anti-Mouse –IgG (H+L) Code Number: 115-165-062 Lot Number: 61375 Jackson ImmunoResearch LABORATORIES, INC.</p>
Blocking – Solution	<p>Goat Serum (Normal) Code-No.: X 0907 Lot: 082 Edition: 12.08.2002 DakoCytomation</p>
Kerngegenfärbung	<p>DAPI D-9542 SIGMA</p>
Eindeckmedium	<p>DAKO Fluorescent Mounting Medium Code No.: S 3032 Lot: 7359 DAKOCYTOMATION</p>
Fluoreszenzmikroskop	<p>Axioskop 40 HBO 50/AC ZEISS</p>

9.1.5 FACS

6-Well	<p>Multiwell[™] 6 Well Tissue Culture Treated Vacuum Gas Plasma Polystyrene; Nonpyrogenic; Steril; Best-Nr 353224; Falcon[®] ; Becton Dickinson Labware</p>
--------	--

Formalin	<p>Roti® Histofix Formaldehydlösung 4,5% Säurefrei pH 7 – phosphatgepuffert Art. Nr.: 2213.3 Carl Roth GmbH & Co</p>
FACS-Röhrchen	<p>Falcon® 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube Nonpyrogenic Steril Best. Nr.: 35 2052 Falcon® Becton Dickinson Labware</p>
FACS-Gerät	<p>BD FACS™ 7-Color Setup Beads Cat. No. 335775 Lot. 23621 BD Biosciences</p>
Software	<p>BD FACSDiva Software</p>

9.1.6 Western Blotting

Zellschaber	<p>Cell Lifter Polyethylene Sterile Art.Nr.: 3008 Corning Incorporated Costar®</p>
NP 40	<p>NP 40 492015 Calbiochem</p>
Ultraschallgerät	<p>Sonifier 450 Branson</p>
Kühlsystem	<p>Kühlsystem 2219 Multitemp II; Thermostatic Circulator, LKB Bromma</p>

Kopfhörer	Hearing protectors PELTOR Aearo
Methanol	Methanol Best. 1.06009.2511 MERCK
Tris 1M(121,14g/mol)	Trizma base Best. Nr. T 1503-1KG SIGMA
NaCl (58,44 g/mol)	Natriumchlorid Best. Nr. 1.06404.1000 Merck
Glycin	Glycin Art. 3908.2 Carl Roth GmbH + Co.
Triton	Triton X-100 Best. Nr. 789 704 Boehringer Mannheim
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Best. Nr. 1028693 Boehringer Mannheim
Salzsäure	Salzsäure Art. 4635.2 Carl Roth GmbH+ Co.
1-Butanol	1-Butanol Art. 7724.1 Carl Roth GmbH + Co.
Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30 30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid D-1,023 Carl Roth GmbH + Co.-KG
Temed	Temed p.a., 99% für d. Elektrophorese Art. 2367.3, Carl Roth GmbH + Co.

Milchpulver	Naturaflor® Magermilchpulver instant Töpfer GmbH
Standard(Marker)	Full Range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Marker PPN 800 Amersham Biosciences UK limited
Probenpuffer	Roti®Load1 4x-Konz. Art.Nr.:K929.1 Roth
Primärantikörper Vinculin	Monoclonal anti-human Vinculin Clone hVIN-1 Mouses Scites Fluid SIGMA
Primärantikörper FCU I	IgG rat anti FCUI polyclonal antibody Transgene
Sekundärantikörper Maus	Anti-Mouse HRP Best.Nr.:170-6516 BioRad
Sekundärantikörper Ratte	Anti-Rat HRP Best.Nr.:AP136P Chemicon
Blocklösung	Roti® - Block 10 x Konzentrat Art. A151.1 Roth
Chemilumineszenz- lösung	Chemilumineszenz HRP Substrat Immobilon Western Milipore Corporation, Billerica
Stromgerät	Electrophoresis, E 802, Consort

Laufkammer (Gelelektrophorese) Schüttler	Pharmacia Biotech Model: SE 400-15-15 Code No.:80-6155-24 Typ Promax 1020 No.: 543-22332-00-3 Heidolph
Thermomixer	Thermomixer comfort ependorf
Membran	PVDF Transfer Membran Cat. No.: ND1427 Amersham Biosciences
Blotkammer	Trans-Blot ^M Cell Bio-Rad
Film	Hyperfilm TM ECL High performance chemiluminescence film Film size 18 x 24cm RPN 3103K Amersham Biosciences
ECL- Detektionslösung	ECL-Detektionslösungen 1 und 2 Amersham Pharmacia Biotech

9.1.7 Proliferationsassay 5-FU

Kulturplatten	24 Well Tissue Culture Plate Flat bottom with Low Evaporation Lid Tissue Culture Treated by Vacuum Gas Plasma Polystyrene Nonpyrogenic Steril Best-Nr 353226 Falcon [®] Becton Dickinson Labware
---------------	--

Kulturplatten		<p>96- Well Tissue Culture Plate Flat bottom with Low Evaporation Lid Tissue Culture Treated by Vaccum Gas Plasma Polystyrene Nonpyrogenic Steril Best-Nr.: 35 3075 Falcon® Becton Dickinson Labware</p>
Zellfärbung (Neubauer kammer)	Zähl-	<p>Tryptan Blue Solution(0,4%) Sterile filtered Prepared in 0,81% sodium chloride and 0,06% potas- sium Phosphate, dibasic T 8154 LOT. 53K2309 SIGMA Chemical Co.</p>
Pipettenspitzen		<p>SafeSeal-Tips Sterile Filter-Spitzen mit „Sealing Filter“ DNase, RNase, pyrogenfrei 10 µl: Art- Nr.:692150 100 µl:Art.-Nr.692066 1000 µl Art.-Nr.:692079 Biozym Diagnostik GmbH</p>
Zytostatika		<p>5-Fluorouracil (5-FU) 50mg/ml medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH Fehlandstraße 3 20354 Hamburg</p>

Zytostatika- Handschuhe	Cytostatic protective gloves BERNER
Proliferationstest	MTT-ASSAY EZ4U Nonradioactive cell proliferation and cytotoxicity assay Cat. No.: BI-5000 10x96 determinations Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien
Falcon tubes	Falcons Cellstar® PP –Test tubes Sterile 15 ml: Cat.No.: 188 271 50 ml: Cat. No.: 210 261 greiner bio-one
Zentrifuge	Rotixa/RP Hettich
ELISA-Reader	Spectra Mini Art.-Nr.: F039100 Serien-Nr.: 1000 115 TECAN

9.1.8 Proliferationsassay 5-FU/FC

AdSCD	CMV Promotor
AdvGFP	Rous- Sarcomar- Virus (Promotor) RSV-GFP 5
Sterilbank	Hera safe Typ: HSP 12 Order No: 51021641 Serial No.: 40372956 Heraeus

Inkubator	Biosafe eco Model: 700 40 Inkubationsbedingungen: 37°C 5,0% CO ₂ INTEGRA BIOSCIENCES
Mikroskop	CK 40 – F 200 No.: 1 F 074 92 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Fluoreszenzmikroskop	IX 50 – S 8F2 No: 9 M 11 838 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Fluoreszenzlampe	U-RFL-T-200 OLYMPUS OPTICAL CO. LTD
Vortexer	Vortex Mixer Neo Lab [®] 7 -2020
ELISA –Reader	GENIOS Plus Art.No.: F 129024 Serial No.:12902400132 M-Code: 3360123 TECAN
Autoclav	Tuttnauer Autoclave –Steam Sterilizer Systemec 3850 EL Serial No.: 2ä310025

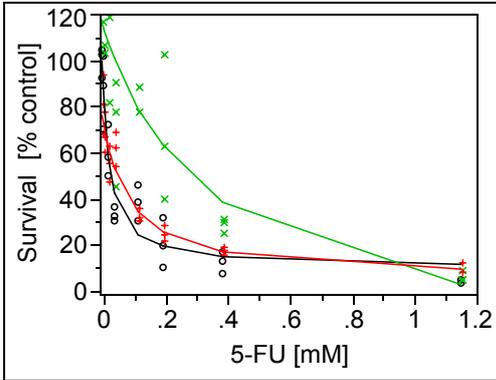
9.1.9 Promotorassay HUH6

AdGFP	RSV Promotor
Ad Track GFP	CMV Promotor

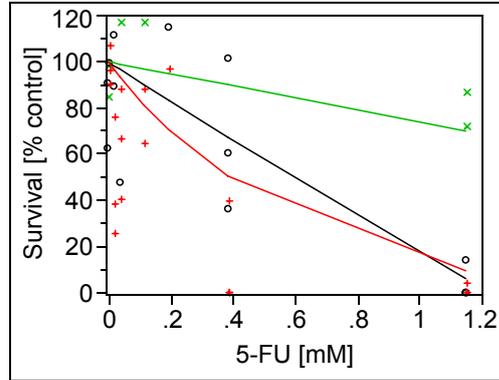
Formalin	<p>Roti[®] Histofix Formaldehydlösung 4,5% Säurefrei pH 7 – phosphatgepuffert Art.Nr.: 2213.3 Carl Roth GmbH & Co</p>
FACS-Röhrchen	<p>Falcon[®] 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube Nonpyrogenic Steril Best-Nr.: 35 2052 Falcon[®] Becton Dickinson Labware</p>
FACS-Gerät	<p>BD FACS[™] 7-Color Setup Beads Cat. No. 335775 Lot. 23621 BD Biosciences</p>
Software	<p>BD FACSDiva Software</p>
Formalin	<p>Roti[®] Histofix Formaldehydlösung 4,5% Säurefrei pH 7 – phosphatgepuffert Art. Nr.: 2213.3 Carl Roth GmbH & Co</p>

9.2 Anhang Proliferationstests

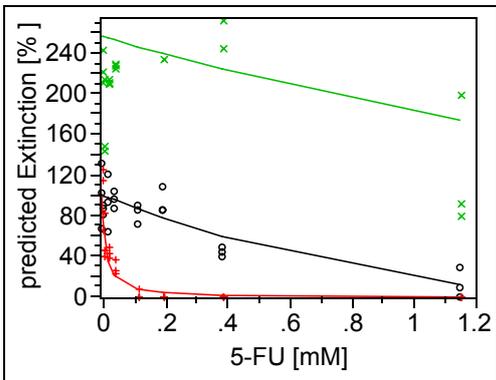
9.2.1 Graphische Darstellung HepT3 5-FU



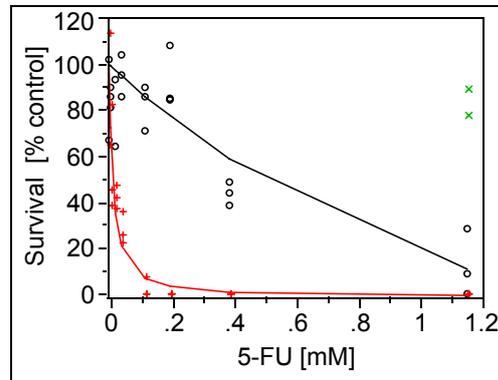
HepT3 5-FU (I)



HepT3 5-FU (III)



HepT3 5-FU (IIa)



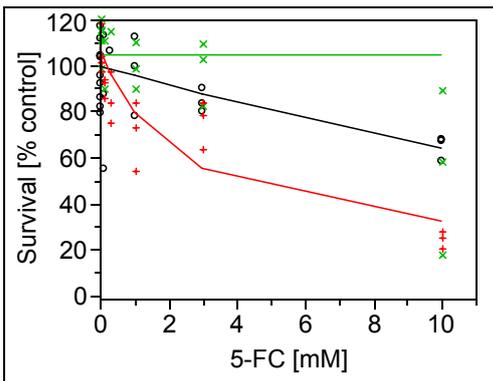
HepT3 5-FU (IIb)

9.2.2 IC50 5-FC Einzelwerte Versuche I-III

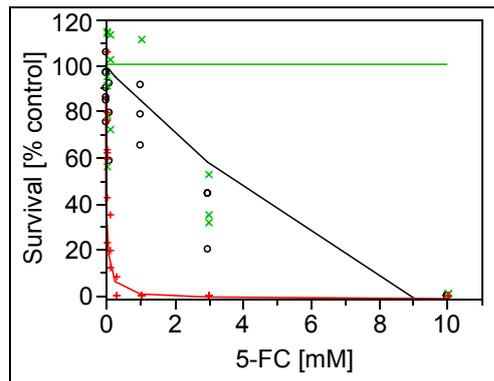
IC 50 5-FC – AdSuperCD

	IC 50 [mM] I	IC 50 [mM] II	IC 50 [mM] III	IC 50 [mM] gemittelt	95% KI [mM] gemittelt
HepT1	0,654	2,566	0,156	0,6397	0,020-20,747
HepT3	3,1555	0,0263	0,2172	0,262	0,001-101,5
HUH6	13,4547	7,4725	-	10,027	0,239-420,5
HepG2	0,3626	0,0442	0,0766	0,128	0,009-1,8164

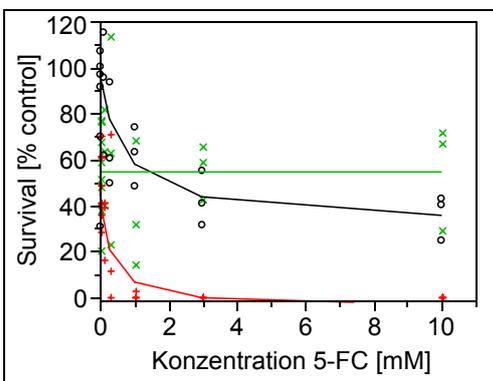
9.2.3 Graphische Darstellung HepT3 5-FC



HepT3 5-FC (I)



HepT3 5-FC (II)



HepT3 5-FC (III)

9.2.4 Rohdaten der MTT-Versuche

Datum	Zelllinie	Konzentration 5-FU[mM]	gemessene Extinktion	Konzentration 5-FC[mM]	gemessene Extinktion
19.09.2005	HepT1	0	1,030	0	
19.09.2005	HepT1	0	1,024	0	1,17
19.09.2005	HepT1	0	1,124	0	1,213
19.09.2005	HepT1	0,00384	1,044	0,001	1,107
19.09.2005	HepT1	0,00384	4,124	0,001	1,158
19.09.2005	HepT1	0,00384	1,152	0,001	1,009
19.09.2005	HepT1	0,0192	1,046	0,03	1,029
19.09.2005	HepT1	0,0192	1,17	0,03	1,2
19.09.2005	HepT1	0,0192	1,032	0,03	1,189
19.09.2005	HepT1	0,0384	1,095	0,1	1,151
19.09.2005	HepT1	0,0384	1,112	0,1	1,205
19.09.2005	HepT1	0,0384	1,144	0,1	1,23
19.09.2005	HepT1	0,1152	0,641	0,3	1,019
19.09.2005	HepT1	0,1152	0,922	0,3	1,231
19.09.2005	HepT1	0,1152	0,842	0,3	1,262
19.09.2005	HepT1	0,192	0,751	1	1,15
19.09.2005	HepT1	0,192	0,728	1	1,182
19.09.2005	HepT1	0,192	0,789	1	1,265
19.09.2005	HepT1	0,384	0,585	3	1,147
19.09.2005	HepT1	0,384	0,789	3	1,184
19.09.2005	HepT1	0,384	0,987	3	1,247
19.09.2005	HepT1	1,152	0,347	10	0,997
19.09.2005	HepT1	1,152	0,414	10	1,209
19.09.2005	HepT1	1,152	0,507	10	1,224
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0	0,883	0	1
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0	0,819	0	1,059
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0	0,88	0	1,013
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,00384	0,856	0,001	0,991
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,00384	0,907	0,001	0,987
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,00384	0,876	0,001	0,963
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0192	0,779	0,03	0,99
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0192	0,785	0,03	1,055
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0192	0,849	0,03	1,04
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0384	0,628	0,1	1,026
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0384	0,655	0,1	0,871
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,0384	0,68	0,1	0,904
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,1152	0,489	0,3	0,626
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,1152	0,526	0,3	0,72
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,1152	0,579	0,3	0,794
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,192	0,495	1	0,285
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,192	0,502	1	0,443
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,192	0,571	1	0,458
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,384	0,375	3	0,119
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,384	0,465	3	0,189
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	0,384	0,504	3	0,051
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	1,152	0,11	10	0,047

ANHANG

19.09.2005	HepT1 + AdSCD	1,152	0,069	10	0
19.09.2005	HepT1 + AdSCD	1,152	0,1300	10	0
24.10.2005	HepT1	0	1,0684	0	1,0477
24.10.2005	HepT1	0	1,1149	0	1,0936
24.10.2005	HepT1	0	1,1936	0	1,0682
24.10.2005	HepT1	0,00384	0,9898	0,001	1,0132
24.10.2005	HepT1	0,00384	1,1650	0,001	1,1443
24.10.2005	HepT1	0,00384	1,1434	0,001	1,0986
24.10.2005	HepT1	0,0192	1,1222	0,03	1,0410
24.10.2005	HepT1	0,0192	1,0490	0,03	1,1223
24.10.2005	HepT1	0,0192	1,1172	0,03	1,0555
24.10.2005	HepT1	0,0384	1,1135	0,1	1,1704
24.10.2005	HepT1	0,0384	1,1339	0,1	1,1051
24.10.2005	HepT1	0,0384	1,1256	0,1	1,0663
24.10.2005	HepT1	0,1152	1,0112	0,3	0,9772
24.10.2005	HepT1	0,1152	1,1121	0,3	0,9629
24.10.2005	HepT1	0,1152	1,1530	0,3	1,1475
24.10.2005	HepT1	0,192	0,8635	1	1,0973
24.10.2005	HepT1	0,192	1,0066	1	1,1429
24.10.2005	HepT1	0,192	0,9690	1	1,0960
24.10.2005	HepT1	0,384	0,8483	3	0,9846
24.10.2005	HepT1	0,384	0,9212	3	1,1947
24.10.2005	HepT1	0,384	1,0165	3	1,1752
24.10.2005	HepT1	1,152	0,6389	10	0,9540
24.10.2005	HepT1	1,152	0,6887	10	1,0428
24.10.2005	HepT1	1,152	0,6829	10	1,1333
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0	0,6546	0	0,6905
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0	0,6451	0	0,6905
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0	0,7702	0	0,7282
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,00384	0,7014	0,001	0,6331
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,00384	0,8437	0,001	0,8093
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,00384	0,8798	0,001	0,7443
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0192	0,7224	0,03	0,6184
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0192	0,8505	0,03	0,7243
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0192	0,9156	0,03	0,7524
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0384	0,7476	0,1	0,7369
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0384	0,5485	0,1	0,8295
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,0384	0,6438	0,1	0,8116
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,1152	0,6074	0,3	0,6152
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,1152	0,5633	0,3	0,6843
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,1152	0,4038	0,3	0,4785
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,192	0,4701	1	0,7679
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,192	0,4911	1	0,6094
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,192	0,4617	1	0,4932
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,384	0,2822	3	0,8380
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,384	0,2483	3	0,7162
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	0,384	0,3092	3	0,7824
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	1,152	0,1878	10	0,8153
24.10.2005	HepT1 + AdGFP	1,152	0,2177	10	0,7555

ANHANG

24.10.2005	HepT1 + AdGFP	1,152	0,2260	10	0,7509
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0	0,8351	0	0,8006
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0	0,9031	0	0,8833
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0	0,8545	0	1,0078
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,00384	0,9874	0,001	0,9412
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,00384	1,0280	0,001	1,0775
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,00384	0,9884	0,001	1,0684
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0192	0,8658	0,03	0,8715
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0192	0,8681	0,03	0,9844
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0192	0,9787	0,03	0,9223
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0384	1,0706	0,1	0,8663
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0384	0,9907	0,1	1,0281
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,0384	0,8409	0,1	0,8936
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,1152	0,6094	0,3	0,6947
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,1152	0,6048	0,3	0,7208
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,1152	0,7024	0,3	0,7497
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,192	0,5092	1	0,7873
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,192	0,5381	1	0,6351
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,192	0,5079	1	0,5656
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,384	0,5412	3	0,4910
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,384	0,4901	3	0,4893
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	0,384	0,4646	3	0,4710
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	1,152	0,2851	10	0,2552
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	1,152	0,2803	10	0,3073
24.10.2005	HepT1+ AdSCD	1,152	0,2356	10	0,3803
26.04.2006	HepT1	0	0,9555	0	1,0463
26.04.2006	HepT1	0	0,9578	0	1,1196
26.04.2006	HepT1	0	0,9691	0	1,0488
26.04.2006	HepT1	0,1	0,9271	0,001	1,0973
26.04.2006	HepT1	0,1	0,9057	0,001	1,1792
26.04.2006	HepT1	0,1	0,8980	0,001	1,1998
26.04.2006	HepT1	0,5	0,5226	0,03	1,2088
26.04.2006	HepT1	0,5	0,5227	0,03	1,1940
26.04.2006	HepT1	0,5	0,5194	0,03	1,2009
26.04.2006	HepT1	1	0,4834	0,1	
26.04.2006	HepT1	1	0,5041	0,1	1,0014
26.04.2006	HepT1	1	0,5001	0,1	1,2924
26.04.2006	HepT1	3	0,1488	0,3	1,1940
26.04.2006	HepT1	3	0,1435	0,3	1,1797
26.04.2006	HepT1	3	0,1345	0,3	
26.04.2006	HepT1	5	0,2756	1	0,6369
26.04.2006	HepT1	5	0,2916	1	0,6275
26.04.2006	HepT1	5	0,2534	1	0,6190
26.04.2006	HepT1	10	0,2577	3	0,9318
26.04.2006	HepT1	10	0,2425	3	0,6007
26.04.2006	HepT1	10	0,2592	3	0,6403
26.04.2006	HepT1	30	0,1130	10	0,3797
26.04.2006	HepT1	30	0,1136	10	0,4405
26.04.2006	HepT1	30	0,1134	10	0,4816

ANHANG

26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0	0,9796	0	0,8876
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0	1,0043	0	0,9363
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0	0,9531	0	0,8227
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,1	0,7200	0,001	0,6693
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,1	0,8037	0,001	0,7563
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,1	0,7843	0,001	0,7262
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,5	0,6354	0,03	0,8030
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,5	0,5440	0,03	0,8194
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	0,5	0,5269	0,03	0,8022
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	1	0,3561	0,1	0,8232
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	1	0,3458	0,1	0,8400
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	1	0,3395	0,1	0,8299
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	3	0,2359	0,3	0,6849
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	3	0,2443	0,3	0,6219
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	3	0,2183	0,3	0,6595
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	5	0,2299	1	0,6966
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	5	0,2306	1	0,6782
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	5	0,2489	1	0,6664
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	10	0,2346	3	0,7992
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	10	0,2253	3	0,6950
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	10	0,2458	3	0,7923
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	30	0,1771	10	0,2963
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	30	0,1596	10	0,2729
26.04.2006	HepT1 + AdGFP	30	0,2057	10	0,2972
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0	0,9391	0	1,0145
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0	0,9691	0	0,9654
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0	0,9857	0	0,9508
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,1	0,8827	0,001	0,8574
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,1	0,8156	0,001	0,9423
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,1	0,8982	0,001	0,9177
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,5	0,5562	0,03	0,8963
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,5	0,5404	0,03	0,8953
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	0,5	0,5210	0,03	0,8527
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	1	0,3011	0,1	0,6275
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	1	0,2958	0,1	0,4842
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	1	0,3066	0,1	0,5264
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	3	0,2559	0,3	0,3207
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	3	0,2474	0,3	0,3161
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	3	0,2547	0,3	0,3171
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	5	0,2509	1	0,2285
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	5	0,2582	1	0,2279
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	5	0,2576	1	0,2327
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	10	0,2193	3	0,2035
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	10	0,2116	3	0,2264
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	10	0,2452	3	0,2214
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	30	0,1048	10	0,0673
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	30	0,1150	10	0,0606
26.04.2006	HepT1+ AdSCD	30	0,1051	10	0,0682
31.10.2005	HepT3	0	0,493	0	0,3443

ANHANG

31.10.2005	HepT3	0	0,4808	0	0,4161
31.10.2005	HepT3	0	0,4338	0	0,3823
31.10.2005	HepT3	0,00384	0,329	0,001	0,3278
31.10.2005	HepT3	0,00384	0,4199	0,001	0,3177
31.10.2005	HepT3	0,00384	0,4777	0,001	0,3691
31.10.2005	HepT3	0,0192	0,2354	0,03	0,4666
31.10.2005	HepT3	0,0192	0,2723	0,03	0,4149
31.10.2005	HepT3	0,0192	0,3387	0,03	0,4464
31.10.2005	HepT3	0,0384	0,1525	0,1	0,2206
31.10.2005	HepT3	0,0384	0,1719	0,1	0,3501
31.10.2005	HepT3	0,0384	0,144	0,1	0,4519
31.10.2005	HepT3	0,1152	0,1804	0,3	0,4257
31.10.2005	HepT3	0,1152	0,2164	0,3	0,4807
31.10.2005	HepT3	0,1152	0,142	0,3	0,546
31.10.2005	HepT3	0,192	0,1506	1	0,3988
31.10.2005	HepT3	0,192	0,0917	1	0,312
31.10.2005	HepT3	0,192	0,049	1	0,4492
31.10.2005	HepT3	0,384	0,0798	3	0,3606
31.10.2005	HepT3	0,384	0,0602	3	0,3342
31.10.2005	HepT3	0,384	0,0372	3	0,3189
31.10.2005	HepT3	1,152	0,0235	10	0,271
31.10.2005	HepT3	1,152	0,0180	10	0,2684
31.10.2005	HepT3	1,152		10	0,2337
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,6879	0	0,5448
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,6056	0	0,4886
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,5462	0	0,4994
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,5752	0,001	0,4561
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,4990	0,001	0,4762
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,4838	0,001	0,4532
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,5542	0,03	0,4807
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,3805	0,03	0,4369
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,6264	0,03	0,3904
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,2098	0,1	0,3541
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,4222	0,1	0,4367
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,3629	0,1	0,4853
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,4120	0,3	0,4792
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,3621	0,3	0,5556
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,6397	0,3	0,4551
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,2911	1	0,3538
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,4802	1	0,4345
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,1830	1	0,3908
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,1432	3	0,4317
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,1374	3	0,4051
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,1138	3	0,3264
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,0389	10	0,3515
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,0209	10	0,2297
31.10.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,0190	10	0,0669
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,4417	0	0,4042
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,3815	0	0,4699

ANHANG

31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,3214	0	0,4146
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,3655	0,001	0,5104
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,3158	0,001	0,5471
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,2835	0,001	0,3878
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,2947	0,03	0,4812
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,2226	0,03	0,5119
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,2597	0,03	0,4043
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,2930	0,1	0,3421
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,2551	0,1	0,3684
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,3248	0,1	0,3744
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,1486	0,3	0,2987
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,1426	0,3	0,3874
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,1687	0,3	0,333
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,1150	1	0,3342
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,1007	1	0,2907
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,1341	1	0,2153
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0906	3	0,3335
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0817	3	0,3117
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0729	3	0,2517
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	1,152	0,0382	10	0,1001
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	1,152	0,0592	10	0,1105
31.10.2005	HepT3+ AdSCD	1,152		10	0,0816
21.11.2005	HepT3	0	0,1487	0	0,2036
21.11.2005	HepT3	0	0,2263	0	0,2430
21.11.2005	HepT3	0	0,2889	0	0,3461
21.11.2005	HepT3	0,00384	0,1996	0,001	0,3604
21.11.2005	HepT3	0,00384	0,1794	0,001	0,2610
21.11.2005	HepT3	0,00384	0,1907	0,001	0,2848
21.11.2005	HepT3	0,0192	0,2658	0,03	0,2628
21.11.2005	HepT3	0,0192	0,2064	0,03	0,2322
21.11.2005	HepT3	0,0192	0,1419	0,03	0,2295
21.11.2005	HepT3	0,0384	0,2105	0,1	0,1586
21.11.2005	HepT3	0,0384	0,2299	0,1	0,2488
21.11.2005	HepT3	0,0384	0,1903	0,1	0,2144
21.11.2005	HepT3	0,1152	0,1997	0,3	0,4028
21.11.2005	HepT3	0,1152	0,1574	0,3	0,3352
21.11.2005	HepT3	0,1152	0,1894	0,3	0,3451
21.11.2005	HepT3	0,192	0,1884	1	0,2120
21.11.2005	HepT3	0,192	0,1875	1	0,1765
21.11.2005	HepT3	0,192	0,2394	1	0,2476
21.11.2005	HepT3	0,384	0,0975	3	0,1204
21.11.2005	HepT3	0,384	0,1073	3	0,0547
21.11.2005	HepT3	0,384	0,0854	3	0,1195
21.11.2005	HepT3	1,152	0,0630	10	0,0000
21.11.2005	HepT3	1,152	0,0000	10	0,0000
21.11.2005	HepT3	1,152	0,0202	10	0,0000
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,5331	0	0,3053
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,4615	0	0,3419
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0	0,4871	0	0,3432

ANHANG

21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,3241	0,001	0,3082
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,3126	0,001	0,1489
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,00384	0,4680	0,001	0,2092
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,4692	0,03	0,2541
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,4583	0,03	0,2441
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0192	0,4615	0,03	0,3321
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,4997	0,1	0,1924
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,5033	0,1	0,3033
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,0384	0,4931	0,1	0,2738
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,7899	0,3	0,4735
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,6704	0,3	0,5172
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,1152	0,8346	0,3	0,6348
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,5149	1	0,2981
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,6480	1	0,4770
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,192	0,6623	1	0,5420
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,5354	3	0,0831
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,5976	3	0,1406
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	0,384	0,6799	3	0,0928
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,1968	10	0,0000
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,4344	10	0,0000
21.11.2005	HepT3 + AdGFP	1,152	0,1700	10	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,2517	0	0,3450
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,1443	0	0,2859
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0	0,2776	0	0,2048
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,1006	0,001	0,2144
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,0854	0,001	0,1681
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,00384	0,1827	0,001	0,1703
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,0930	0,03	0,0625
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,1056	0,03	0,1594
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0192	0,0828	0,03	0,1142
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,0500	0,1	0,0323
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,0791	0,1	0,0948
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,0384	0,0571	0,1	0,0533
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,0000	0,3	0,0229
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,0000	0,3	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,1152	0,0170	0,3	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,0000	1	0,0006
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,0000	1	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,192	0,0000	1	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0000	3	
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0000	3	0,0006
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	0,384	0,0000	3	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	1,152	0,0000	10	
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	1,152	0,0000	10	0,0000
21.11.2005	HepT3+ AdSCD	1,152	0,0000	10	0,0000
22.05.2006	HepT3	0	0,0398	0	0,1848
22.05.2006	HepT3	0	0,0578	0	0,1976
22.05.2006	HepT3	0	0,0960	0	0,0568
22.05.2006	HepT3	0,1	0,0634	0,001	0,1682

ANHANG

22.05.2006	HepT3	0,1	0,0877	0,001	0,2493
22.05.2006	HepT3	0,1	0,0824	0,001	0,1287
22.05.2006	HepT3	0,5	0,0846	0,03	0,1785
22.05.2006	HepT3	0,5	0,0570	0,03	0,3217
22.05.2006	HepT3	0,5	0,0710	0,03	
22.05.2006	HepT3	1		0,1	0,2125
22.05.2006	HepT3	1	0,1071	0,1	0,1760
22.05.2006	HepT3	1	0,0303	0,1	0,1148
22.05.2006	HepT3	3	0,1148	0,3	0,1121
22.05.2006	HepT3	3	0,0836	0,3	0,1719
22.05.2006	HepT3	3	0,0873	0,3	0,0916
22.05.2006	HepT3	5	0,0732	1	0,1166
22.05.2006	HepT3	5	0,1143	1	0,0892
22.05.2006	HepT3	5	0,0768	1	0,1362
22.05.2006	HepT3	10	0,0646	3	0,0753
22.05.2006	HepT3	10	0,0387	3	0,0582
22.05.2006	HepT3	10	0,0231	3	0,1015
22.05.2006	HepT3	30	0,0090	10	0,0794
22.05.2006	HepT3	30	0,0000	10	0,0747
22.05.2006	HepT3	30	0,0000	10	0,0464
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0		0	0,1399
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0	0,0619	0	0,1235
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0	0,0536	0	0,0870
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,1	0,0855	0,001	0,1393
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,1	0,0882	0,001	0,0682
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,1	0,1574	0,001	0,1067
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,5	0,0971	0,03	0,0927
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,5	0,1030	0,03	
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	0,5	0,1102	0,03	0,0360
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	1	0,0741	0,1	0,0727
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	1	0,0926	0,1	0,1155
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	1	0,1132	0,1	0,1487
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	3	0,1765	0,3	0,1143
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	3	0,0740	0,3	0,2076
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	3	0,1751	0,3	0,0407
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	5	0,1875	1	0,0249
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	5	0,1639	1	0,0574
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	5	0,1155	1	0,1236
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	10	0,1344	3	0,1073
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	10	0,1163	3	0,0768
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	10	0,1474	3	0,1192
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	30	0,0454	10	0,0520
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	30	0,0857	10	0,1299
22.05.2006	HepT3 + AdGFP	30	0,0546	10	0,1222
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0	0,0824	0	0,0897
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0		0	0,1287
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0		0	0,1116
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,1	0,0573	0,001	
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,1	0,0613	0,001	0,0753

ANHANG

22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,1	0,0680	0,001	0,0660
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,5	0,0482	0,03	0,0521
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,5	0,0242	0,03	0,0742
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	0,5	0,0161	0,03	0,1126
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	1	0,0560	0,1	0,0299
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	1	0,0255	0,1	0,0725
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	1	0,0422	0,1	0,0756
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	3	0,0411	0,3	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	3	0,0788	0,3	0,0217
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	3	0,0560	0,3	0,1307
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	5	0,0616	1	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	5	0,0860	1	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	5		1	0,0049
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	10	0,0251	3	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	10	0,0000	3	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	10	0,0000	3	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	30	0,0026	10	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	30	0,0000	10	0,0000
22.05.2006	HepT3+ AdSCD	30	0,0000	10	0,0000
19.09.2005	HUH 6	0	0,8900	0	1,015
19.09.2005	HUH 6	0	0,8830	0	0,95
19.09.2005	HUH 6	0	0,6960	0	1,006
19.09.2005	HUH 6	0,00384	0,6670	0,001	1,029
19.09.2005	HUH 6	0,00384	0,7830	0,001	1,081
19.09.2005	HUH 6	0,00384	0,7690	0,001	1,129
19.09.2005	HUH 6	0,0192	0,3620	0,03	0,982
19.09.2005	HUH 6	0,0192	0,4780	0,03	1,16
19.09.2005	HUH 6	0,0192	0,4990	0,03	1,154
19.09.2005	HUH 6	0,0384	0,3200	0,1	1,051
19.09.2005	HUH 6	0,0384	0,7000	0,1	0,943
19.09.2005	HUH 6	0,0384	0,4010	0,1	1,003
19.09.2005	HUH 6	0,1152	0,1600	0,3	0,993
19.09.2005	HUH 6	0,1152	0,1370	0,3	1,107
19.09.2005	HUH 6	0,1152	0,2440	0,3	1,091
19.09.2005	HUH 6	0,192	0,0630	1	0,912
19.09.2005	HUH 6	0,192	0,0990	1	1,111
19.09.2005	HUH 6	0,192	0,1100	1	1,205
19.09.2005	HUH 6	0,384	0,0000	3	1,109
19.09.2005	HUH 6	0,384	0,0000	3	1,042
19.09.2005	HUH 6	0,384	0,0160	3	1,178
19.09.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	0,722
19.09.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	0,888
19.09.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	1,001
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0	0,9610	0	0,868
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0	0,9880	0	0,873
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0	0,9060	0	1
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,00384	0,6500	0,001	0,948
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,00384	0,8220	0,001	0,987
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,00384	0,8620	0,001	1,094

ANHANG

19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0192	0,5470	0,03	1,08
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0192	0,4660	0,03	1,14
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0192	0,6080	0,03	1,02
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0384	0,2700	0,1	0,964
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0384	0,4250	0,1	1,052
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,0384	0,4330	0,1	1,035
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,1152	0,1170	0,3	1,1
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,1152	0,2040	0,3	1,084
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,1152	0,2160	0,3	0,972
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,192	0,0620	1	1,115
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,192	0,0910	1	1,084
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,192	0,1260	1	1,102
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,384	0,0080	3	0,888
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,384	0,0240	3	0,983
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	0,384	0,0270	3	0,969
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	1,152	0,0000	10	0,477
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	1,152	0,0000	10	0,447
19.09.2005	HUH6 + AdSCD	1,152	0,0000	10	0,566
24.10.2005	HUH 6	0	1,0812	0	1,1253
24.10.2005	HUH 6	0	1,1778	0	1,0865
24.10.2005	HUH 6	0	1,1997	0	1,1640
24.10.2005	HUH 6	0,00384	0,8362	0,001	1,1151
24.10.2005	HUH 6	0,00384	0,7466	0,001	1,1303
24.10.2005	HUH 6	0,00384	0,7758	0,001	1,1411
24.10.2005	HUH 6	0,0192	0,5254	0,03	1,0178
24.10.2005	HUH 6	0,0192	0,5444	0,03	1,0857
24.10.2005	HUH 6	0,0192	0,5226	0,03	0,9187
24.10.2005	HUH 6	0,0384	0,3633	0,1	1,2162
24.10.2005	HUH 6	0,0384	0,3918	0,1	1,1906
24.10.2005	HUH 6	0,0384	0,3540	0,1	1,1782
24.10.2005	HUH 6	0,1152	0,1524	0,3	1,1112
24.10.2005	HUH 6	0,1152	0,1464	0,3	1,1958
24.10.2005	HUH 6	0,1152	0,1488	0,3	1,0774
24.10.2005	HUH 6	0,192	0,1071	1	1,1363
24.10.2005	HUH 6	0,192	0,0951	1	1,0224
24.10.2005	HUH 6	0,192	0,1110	1	1,0934
24.10.2005	HUH 6	0,384	0,0222	3	1,1350
24.10.2005	HUH 6	0,384	0,0146	3	1,1602
24.10.2005	HUH 6	0,384	0,0395	3	1,0809
24.10.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	0,5597
24.10.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	0,6938
24.10.2005	HUH 6	1,152	0,0000	10	0,6634
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0	0,6817	0	0,6434
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0	0,7644	0	0,6824
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0	0,7853	0	0,6901
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,00384	0,5282	0,001	0,7741
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,00384	0,5747	0,001	0,7319
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,00384	0,5679	0,001	0,7543
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0192	0,3129	0,03	0,7526

ANHANG

24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0192	0,3652	0,03	0,8051
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0192	0,4053	0,03	0,8802
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0384	0,2405	0,1	0,8526
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0384	0,3249	0,1	0,8826
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,0384	0,3251	0,1	0,8667
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,1152	0,0921	0,3	0,7158
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,1152	0,1157	0,3	0,6467
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,1152	0,1027	0,3	0,5106
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,192	0,0496	1	0,7247
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,192	0,0414	1	0,6933
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,192	0,0577	1	0,7502
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,384	0,0232	3	0,7303
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,384	0,0201	3	0,7621
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	0,384	0,0184	3	0,7453
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	1,152	0,0000	10	0,5282
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	1,152	0,0000	10	0,3241
24.10.2005	HUH6 + AdGFP	1,152	0,0000	10	0,3308
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0	0,8364	0	0,6704
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0	0,8635	0	0,7082
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0	0,8392	0	0,8961
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,00384	0,5479	0,001	0,8300
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,00384	0,5066	0,001	0,9001
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,00384	0,5613	0,001	0,9221
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0192	0,4275	0,03	0,7946
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0192	0,3701	0,03	0,8933
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0192	0,3568	0,03	0,7727
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0384	0,3255	0,1	0,7263
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0384	0,3495	0,1	0,7901
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,0384	0,3402	0,1	0,7095
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,1152	0,1554	0,3	0,7148
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,1152	0,1521	0,3	0,8353
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,1152	0,1338	0,3	0,9017
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,192	0,0785	1	0,6785
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,192	0,0825	1	0,6532
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,192	0,0877	1	0,6894
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,384	0,0148	3	0,6076
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,384	0,0202	3	0,6944
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	0,384	0,0296	3	0,5950
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	1,152	0,0000	10	0,3441
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	1,152	0,0000	10	0,3369
24.10.2005	HUH6+ AdSCD	1,152	0,0000	10	0,2765
26.09.2005	HepG2	0	1,1009	0	0,9897
26.09.2005	HepG2	0	1,0638	0	0,9701
26.09.2005	HepG2	0	1,2444	0	0,8382
26.09.2005	HepG2	0,00384	1,0955	0,001	0,9988
26.09.2005	HepG2	0,00384	1,1098	0,001	0,9351
26.09.2005	HepG2	0,00384	1,2448	0,001	0,9071
26.09.2005	HepG2	0,0192	1,0787	0,03	0,9457
26.09.2005	HepG2	0,0192	1,1266	0,03	0,9167

ANHANG

26.09.2005	HepG2	0,0192	1,1987	0,03	0,8843
26.09.2005	HepG2	0,0384	1,1115	0,1	0,9849
26.09.2005	HepG2	0,0384	1,2219	0,1	1,0137
26.09.2005	HepG2	0,0384	1,2284	0,1	0,9664
26.09.2005	HepG2	0,1152	1,1568	0,3	0,9333
26.09.2005	HepG2	0,1152	1,1295	0,3	0,9948
26.09.2005	HepG2	0,1152	1,0098	0,3	0,9754
26.09.2005	HepG2	0,192	1,0472	1	0,9486
26.09.2005	HepG2	0,192	0,9692	1	0,9625
26.09.2005	HepG2	0,192	0,9191	1	0,9216
26.09.2005	HepG2	0,384	0,7365	3	0,8695
26.09.2005	HepG2	0,384	0,7421	3	0,9139
26.09.2005	HepG2	0,384	0,7290	3	0,9269
26.09.2005	HepG2	1,152	0,4579	10	1,0024
26.09.2005	HepG2	1,152	0,5168	10	0,9070
26.09.2005	HepG2	1,152	0,4409	10	0,8540
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,9892	0	0,9582
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0	1,1606	0	0,8488
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,9604	0	0,8365
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,9566	0,001	0,8546
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	1,2811	0,001	0,8649
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	1,1328	0,001	0,8286
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	1,1266	0,03	0,8924
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,9666	0,03	0,9117
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,8504	0,03	0,7534
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,8500	0,1	0,8464
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	1,1038	0,1	0,7561
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,9511	0,1	
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	1,0944	0,3	0,8098
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	1,0243	0,3	0,8764
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,7792	0,3	0,8680
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,8650	1	0,9465
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,8967	1	0,7881
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,9319	1	
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,6519	3	0,7852
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,6478	3	0,8254
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,7477	3	0,7522
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,3506	10	0,8179
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,3439	10	0,9903
26.09.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,3454	10	0,9719
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0	1,2320	0	0,8846
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0	1,2124	0	0,8423
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0	1,1018	0	0,9999
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	1,0193	0,001	0,8126
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	1,0402	0,001	0,8962
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	1,0000	0,001	0,8113
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	0,9055	0,03	0,8442
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	0,9816	0,03	0,8048
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	1,1192	0,03	0,7954

ANHANG

26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	1,0372	0,1	0,4807
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	1,1257	0,1	0,5092
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	1,1745	0,1	0,4745
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	1,1299	0,3	0,0261
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	0,8693	0,3	0,0096
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	0,9602	0,3	0,0441
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,7141	1	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,7545	1	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,7931	1	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,3718	3	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,3787	3	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,4271	3	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,2594	10	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,2485	10	0,0000
26.09.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,2798	10	0,0000
31.10.2005	HepG2	0	1,0619	0	0,9771
31.10.2005	HepG2	0	1,1013	0	0,9351
31.10.2005	HepG2	0	1,0929	0	0,9475
31.10.2005	HepG2	0,00384	0,9808	0,001	1,0400
31.10.2005	HepG2	0,00384	0,9888	0,001	1,0624
31.10.2005	HepG2	0,00384	1,1058	0,001	1,0168
31.10.2005	HepG2	0,0192	0,6267	0,03	1,0267
31.10.2005	HepG2	0,0192	0,7113	0,03	1,0581
31.10.2005	HepG2	0,0192	0,7369	0,03	1,0305
31.10.2005	HepG2	0,0384	0,6204	0,1	0,9570
31.10.2005	HepG2	0,0384	0,6220	0,1	0,9848
31.10.2005	HepG2	0,0384	0,5660	0,1	1,0059
31.10.2005	HepG2	0,1152	0,3573	0,3	0,8529
31.10.2005	HepG2	0,1152	0,4163	0,3	0,9092
31.10.2005	HepG2	0,1152	0,4130	0,3	0,9524
31.10.2005	HepG2	0,192	0,3509	1	1,0737
31.10.2005	HepG2	0,192	0,3393	1	1,0822
31.10.2005	HepG2	0,192	0,2818	1	0,9928
31.10.2005	HepG2	0,384	0,2515	3	1,0269
31.10.2005	HepG2	0,384	0,2371	3	0,8722
31.10.2005	HepG2	0,384	0,2355	3	1,0054
31.10.2005	HepG2	1,152	0,1490	10	1,0246
31.10.2005	HepG2	1,152	0,1554	10	0,9653
31.10.2005	HepG2	1,152	0,1459	10	0,9491
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0	1,0398	0	0,9617
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0	1,0471	0	0,9130
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0	1,0982	0	0,9762
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	1,0302	0,001	1,0336
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	1,0527	0,001	1,0248
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	1,0401	0,001	1,0395
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,6922	0,03	0,8254
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,8258	0,03	0,9374
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,8816	0,03	1,0372
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,8125	0,1	0,9904

ANHANG

31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,7755	0,1	1,0069
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,8228	0,1	0,8800
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,4892	0,3	0,9372
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,4883	0,3	0,9057
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,4295	0,3	0,9231
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3714	1	0,9316
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3345	1	0,9648
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3469	1	0,9052
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,2192	3	0,9242
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,2200	3	0,9828
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,3915	3	1,0538
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,0967	10	0,9309
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,0914	10	0,8984
31.10.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,1059	10	0,8696
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0	0,9157	0	0,8274
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0	0,8548	0	0,8829
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0	1,0073	0	0,8161
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	0,7528	0,001	0,8540
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	0,7377	0,001	0,7445
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,00384	0,7373	0,001	0,7555
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	0,5917	0,03	0,5464
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	0,5321	0,03	0,5380
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0192	0,5812	0,03	0,5337
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	0,5050	0,1	0,3115
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	0,4890	0,1	0,3261
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,0384	0,4817	0,1	0,2193
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	0,2252	0,3	0,1017
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	0,2988	0,3	0,0854
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,1152	0,3146	0,3	0,1174
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,1702	1	0,0278
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,1554	1	0,0198
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,192	0,1905	1	0,0502
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,0709	3	0,0053
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,0639	3	0,0095
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	0,384	0,0828	3	0,0082
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,0303	10	0,0000
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,0298	10	0,0000
31.10.2005	HepG2+ AdSCD	1,152	0,0396	10	0,0000
28.11.2005	HepG2	0	1,1947	0	1,0401
28.11.2005	HepG2	0	1,1386	0	1,0785
28.11.2005	HepG2	0	1,0396	0	1,0415
28.11.2005	HepG2	0,00384	1,1003	0,001	1,1172
28.11.2005	HepG2	0,00384	1,0725	0,001	1,0131
28.11.2005	HepG2	0,00384	1,1137	0,001	0,9765
28.11.2005	HepG2	0,0192	0,8234	0,03	1,0963
28.11.2005	HepG2	0,0192	0,8021	0,03	1,1294
28.11.2005	HepG2	0,0192	0,8513	0,03	1,0351
28.11.2005	HepG2	0,0384	0,6732	0,1	1,0399
28.11.2005	HepG2	0,0384	0,6964	0,1	1,0944

ANHANG

28.11.2005	HepG2	0,0384	0,6650	0,1	1,0875
28.11.2005	HepG2	0,1152	0,4790	0,3	1,0482
28.11.2005	HepG2	0,1152	0,4534	0,3	0,9150
28.11.2005	HepG2	0,1152	0,5023	0,3	1,0835
28.11.2005	HepG2	0,192	0,3914	1	1,1576
28.11.2005	HepG2	0,192	0,4101	1	1,0940
28.11.2005	HepG2	0,192	0,4350	1	1,0590
28.11.2005	HepG2	0,384	0,2774	3	1,1218
28.11.2005	HepG2	0,384	0,3379	3	1,1966
28.11.2005	HepG2	0,384	0,3461	3	1,1010
28.11.2005	HepG2	1,152	0,1639	10	1,0845
28.11.2005	HepG2	1,152	0,1619	10	1,0087
28.11.2005	HepG2	1,152	0,1457	10	1,1080
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,7954	0	0,6527
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,7037	0	0,6640
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,8090	0	0,7030
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,8437	0,001	0,7101
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,8552	0,001	0,7141
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,9775	0,001	0,7022
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,7739	0,03	0,7541
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,8638	0,03	0,7434
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,8723	0,03	0,6599
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,6766	0,1	0,6766
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,7347	0,1	0,7895
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,7820	0,1	0,7740
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,5181	0,3	0,8842
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,5124	0,3	-0,7065
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,5691	0,3	0,7331
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,4233	1	0,7224
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,5054	1	0,6924
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,4846	1	0,7924
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,3194	3	0,8369
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,3608	3	0,8641
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,3490	3	0,8909
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,1344	10	1,0624
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,1300	10	0,9834
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,0895	10	0,9928
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,9146	0	0,8252
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,8938	0	0,8880
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0	0,8804	0	0,7937
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,9651	0,001	0,8523
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,9497	0,001	0,8424
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,00384	0,9701	0,001	0,8277
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,6671	0,03	0,8439
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,6686	0,03	0,8758
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0192	0,6751	0,03	0,8092
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,5709	0,1	0,7449
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,5806	0,1	0,7801
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,0384	0,5785	0,1	0,8169

ANHANG

28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,4278	0,3	0,4855
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,3699	0,3	0,4456
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,1152	0,4162	0,3	0,4862
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3355	1	0,2355
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3860	1	0,1987
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,192	0,3372	1	0,2631
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,2926	3	0,1809
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,3073	3	0,1224
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	0,384	0,2748	3	0,1081
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,1160	10	0,1276
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,1528	10	0,1294
28.11.2005	HepG2 + AdGFP	1,152	0,0829	10	0,1030

Danksagung

Auf dem Weg zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt. Jeder einzelne von ihnen hat seinen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit geleistet. Dafür möchte ich an dieser Stelle allen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. med. J. Fuchs für die Aufnahme in seine Abteilung der Kinderchirurgie am Universitätsklinikum Tübingen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. S. Warmann für die Vergabe der Doktorarbeit, für sein Interesse, sein Engagement, seine Unterstützung, die ermutigenden Worte und seine hervorragende Betreuung.

Danken möchte ich den beiden Mitarbeiterinnen H. Heitmann und C. Treuner des Forschungslabors der Kinderchirurgie für ihre freundliche Aufnahme, die angenehme Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe beim Erlernen der Methoden.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. U. M. Lauer und Professor Dr. med. M. Bitzer für die Kooperation mit ihrer Forschungsgruppe sowie allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe für Ihre Unterstützung und freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. S. Armeanu für seine Unterstützung beim Erlernen der virologischen Methoden, seine stets hilfreichen Anregungen bei technischen oder methodischen Problemen und Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. R. Vonthein danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meiner Familie, Verwandten und Freunden danke ich für ihren Zuspruch und Anteilnahme an großen und kleinen Problemen des Doktorandenalltags. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich stets in allen Situationen unterstützt, motiviert und ermutigt haben. Danken möchte ich meinem Mann für all seine verständnisvollen, motivierenden und aufbauenden Worte und für seine Geduld und Stärkung in dieser Lebensphase. Vielen Dank!

Lebenslauf

Heike Heigoldt

Persönliche Daten

Familienstand: verheiratet, geb. Buck
 Geburtsdatum: 12.08.1982
 Geburtsort: Bad Urach
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Konfession: evangelisch

Schulbildung

09/1989-07/1993 Schillerschule, Grundschule Dettingen/Erms
 09/1993-07/2002 Graf-Eberhard-Gymnasium, Bad Urach
 2002 Abitur

Hochschulbildung

10/2002-06/2009 Studium der Humanmedizin
 Eberhard- Karls-Universität Tübingen
 08/2004 1. Ärztliche Vorprüfung
 01/2007-06/2007 Auslandsstudium an der Warren Alpert
 Medical School of Brown University,
 Providence, RI, USA
 2008-2009 Praktisches Jahr
 1.Tertial: Innere Medizin, Klinikum am Steinenberg Reutlingen
 2.Tertial: Kinderchirurgie, Universität Tübingen
 3.Tertial: Chirurgie, Klinikum am Steinenberg Reutlingen
 12/05/2009 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)
