

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. M. Westphal

**Untersuchungen zur Effektivität
antiviraler Kombinationstherapien bei der Behandlung
gentechnisch veränderter Gliome *in vitro* und *in vivo***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Alexander Senft
aus Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 7.2.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Manfred Westphal
Prüfungsausschuß, 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann Zeumer
Prüfungsausschuß, 3. Gutachter: PD Dr. med. Christian Hagel

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Gliome	1
1.2. Konventionelle Behandlungsstrategien	2
1.3. Die VDEPT als therapeutischer Ansatz	3
1.3.1. Aciclovir und Ganciclovir	4
1.3.2. Andere Nukleotidanaloga	6
1.3.3. Klinische Anwendung	6
1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung	7
2. Methoden	9
2.1. Zellkultur	9
2.1.1. Zelllinien	9
2.1.2. Medikamente	10
2.1.3. Proliferationsassay <i>in vitro</i>	11
2.1.4. Qualitative Auswertung	13
2.1.5. Quantitative Auswertung	13
2.2. Tierversuche	13
2.2.1. Mäuse	14
2.2.2. Gewinnung der Tumorzellen	14
2.2.3. Proliferationsassay <i>in vivo</i>	15
2.2.3.1. Kontrollbehandlung	16
2.2.3.2. Behandlung mit GCV	16
2.2.3.3. Behandlung mit BVDU	16

3. Ergebnisse	17
3.1. Auswertung der <i>in vitro</i>-Proliferationsassays	17
3.1.1. Kombination BVDU/TRD	17
3.1.2. Kombination GCV/TRD	22
3.1.3. Kombination GCV/BrDU	27
3.1.4. Kombination GCV/IDU	30
3.1.5. Zusammenfassung	33
3.2. Auswertung der Tierversuche	34
3.2.1. Behandlung mit GCV	34
3.2.2. Behandlung mit GCV und BVDU	36
4. Diskussion	38
4.1. <i>In vitro</i> Versuche	38
4.2. <i>In vivo</i> Versuche	43
4.3. Ausblick	45
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis	47
Danksagung	61
Lebenslauf	62
Eidesstattliche Versicherung	63

1. Einleitung

Gegenstand dieser Arbeit ist die zytostatische Behandlung gentechnisch veränderter maligner Gliomzelllinien.

1.1. Gliome

Gliome sind neuroepitheliale Tumore, ausgehend von den Gliazellen des Zentralnervensystems, d.h. von den Oligodendrozyten und den Astrozyten. Die Inzidenz primärer intrazerebraler Tumoren liegt in Europa bei ca. 7 – 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr (Counsell et al 1996, Cordera et al 2002). Auch wenn die neuroepithelialen Tumoren insgesamt nur ca. 2% aller menschlichen Tumoren ausmachen und somit insgesamt selten vorkommen, so zählen sie doch zu den gefürchtetsten Tumoren des Erwachsenenalters (Kleihues et al 1997). Die mediane Überlebenszeit eines Glioblastompatienten liegt heute trotz aller therapeutischer Bemühungen bei ca. einem Jahr (Oh et al 2004, Gil-Salu et al 2004, Rainov 2000).

Gliome werden heutzutage anhand eines von der World Health Organization (WHO) empfohlenen Klassifikationssystems in die Malignitätsgrade I bis IV eingeteilt (Kleihues et al 1993). Das häufigste Gliom ist mit einem Anteil von ca. 40 - 50 % an den intrazerebralen Tumoren das am meisten maligne, das Glioblastom entsprechend WHO Grad IV (Lönn et al 2003, Greenberg 2001). Insgesamt macht das Glioblastom ca. 15%-20% aller intrakraniellen Tumoren aus (Thomas und Graham 1995).

Histologisch handelt es sich bei den Glioblastomen um zellreiche, polymorphe Tumoren glialen Ursprunges mit sehr hoher Mitoserate, wobei entscheidende Kriterien das Vorkommen flächenhafter Nekrosen mit radiär angeordneten Tumorzellen sowie ausgeprägte Gefäßproliferate sind (Kleihues et al 1997).

Trotz ausgedehnter epidemiologischer Studien ist es bisher nicht gelungen, Umweltfaktoren zu identifizieren, die für die Entstehung von Gliomen verantwortlich sind. Gesichert ist allein die gelegentliche Induktion von Gliomen

durch therapeutische Dosen ionisierender Strahlen (Kleihues et al 1997, Lonser et al 2003). Auch im Rahmen genetischer Erkrankungen, wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, können Gliome gehäuft auftreten (Louis und von Deimling 1995).

1.2. Konventionelle Behandlungsstrategien

Die meisten Gliome wachsen primär unifokal oder diffus infiltrierend, und zu den gegenwärtigen Standardtherapien zählen die chirurgische Resektion, die Strahlenbehandlung und die Chemotherapie (Nieder 2002, Shapiro WR und Shapiro JR 1998).

Eine Wirksamkeit der Therapie im Sinne einer Überlebenszeitverlängerung ist hierbei insbesondere für die weitestgehende chirurgische Tumorresektion nachgewiesen (Lacroix et al 2001, Hess 1999). Im Jahre 1884 erfolgte die erste Operation eines Patienten mit einem malignen Gliom (Bennett und Godlee 1884). Diese Eingriffe blieben bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet. Die operative Behandlung maligner Gliome konnte zwar unter Zuhilfenahme moderner bildgebender Verfahren und durch den Einsatz intraoperativer Neuronavigationssysteme verbessert werden, jedoch wird die operative Therapie sowohl durch die charakteristische, mitunter hemisphärenüberschreitende Tumorzellinfiltration (Giese et al 2003, Shapiro WR 1999), als auch durch die Tatsache, daß die Radikalität einer Operation unter funktionellen Aspekten aufgrund der Lage der Tumoren in der Nähe kritischer neuroanatomischer Strukturen limitiert ist, eingeschränkt.

Obwohl Gliome nur eine mäßige bis geringe Strahlenempfindlichkeit besitzen, führt auch die Bestrahlung, insbesondere nach vorangegangener chirurgischer Resektion, zu einer Verlängerung der Überlebenszeit (Walker et al 1978, Muacevic und Kreth 2003). Eine Ganzhirnbestrahlung bietet hierbei keine Vorteile gegenüber einer lokalen Bestrahlung (Leibel und Sheline 1987). Zum derzeitigen Standard gehört deshalb die adjuvante lokale Strahlentherapie in einer Dosis von 54-60 Gy in 30 Einzeldosen (Kortmann et al 2003).

In der Primärtherapie der malignen Gliome war der Wert der Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie lange Zeit nicht eindeutig gesichert (Kortmann et al 2003, Prados und Levin 2000, Shapiro WR und Shapiro JR 1998). Als adjuvant verabreichte Chemotherapeutika kamen hauptsächlich Alkylantien zum Einsatz (Nieder 2002, Poeck und Hacke 2001), vor allem die die Blut-Hirn-Schranke penetrierenden Nitrosoharnstoffe wie BCNU, CCNU, PCNU und Fotemustin, aber auch andere Substanzen wie z.B. Procarbazin oder Temozolamid, welches z.T. alkylierende Wirkung besitzt (Krauseneck und Müller 1995). Ein weit verbreitetes Chemotherapieverfahren ist eine Kombinationstherapie aus CCNU, Procarbazin und Vincristin (Levin et al 1985). Die Erfolge der Chemotherapieverfahren waren jedoch lange Zeit uneinheitlich. Nur für einzelne Patientenkollektive mit bestimmten prognostischen Faktoren wie z.B. jüngerem Lebensalter oder oligodendroglialem Tumoranteil konnte eine Lebenszeitverlängerung durch adjuvante Chemotherapie beobachtet werden (Cairncross et al 1994, Kortmann et al 2003, Fine et al 1993).

Erst in jüngster Zeit konnte im Rahmen klinischer Phase III Studien eine klinisch bedeutsame und statistisch signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von Glioblastompatienten durch adjuvante Chemotherapien erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Implantation von BCNU-getränkten Schwämmchen (Gliadel®) in die Tumorsektionshöhle als auch die orale Gabe von Temozolamid (Temodal®) während und nach der adjuvanten Bestrahlung die mediane Überlebenszeit von Glioblastompatienten verlängert (Stupp et al 2005, Combs et al 2005, Westphal et al 2003).

1.3. Die VDEPT als therapeutischer Ansatz

Die bis zum heutigen Tage zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten können die Lebenserwartung von Gliompatienten lediglich um mehrere Monate verlängern, sind jedoch nicht imstande sie zu heilen (Mahaley et al 1989). Daher wird in vielen experimentellen Ansätzen nach weiteren Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten gesucht.

Ein solcher Ansatz ist die gentherapeutische Behandlung von Tumoren. Rekombinante DNS-Technologien und molekularonkologische Erkenntnisse können uns heute neue Möglichkeiten eröffnen, Medikamente selektiv auf Tumorzellen wirken zu lassen. Der am häufigsten verfolgte gentherapeutische Ansatz ist die sogenannte Virus Directed Enzyme/Prodrug Therapy (VDEPT) (Moolten 1986, Culver et al 1992).

Hierbei wird durch virale Vektoren die genetische Information für die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-tk) in Tumorzellen eingebracht. Bei diesen transfizierten Tumorzellen wird, im Gegensatz zu den normalen Zellen, die virale Thymidinkinase exprimiert. Dadurch werden die Zellen für eine medikamentöse Behandlung mit antiviralen Nukleotidanaloga selektiv empfindlich. Diese antiviralen Nukleotidanaloga werden als Prodrugs bezeichnet, weil sie ihre zytotoxische Wirkung nicht direkt, sondern erst nach intrazellulärer enzymatischer Veränderung entfalten. Die transfizierten Tumorzellen können somit Prodrug-Verbindungen im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen selektiv zu hochtoxischen Metaboliten aktivieren (Balzarini et al 1993).

1.3.1. Aciclovir und Ganciclovir

Im Jahre 1977 wurde mit Aciclovir das erste spezifische Virustatikum entwickelt, das selektiv durch die virale Thymidinkinase phosphoryliert wird (Fyfe et al 1978, Elion et al 1977, Schaeffer et al 1978). Aciclovir erwies sich als ein äußerst potentes Antiherpetikum, was zur Entwicklung von strukturanalogen Substanzen, darunter auch 9-(1,3-Dihydroxypropoxymethyl)guanin (Ganciclovir [GCV]) führte (de Clerq 1995; s. Abb. 1). Aufgrund seiner besonderen Effektivität gegen das Zytomegalievirus wurde GCV zum Mittel der Wahl bei CMV-Infektionen, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten. (Markham und Faulds 1994, Faulds und Heel 1990).

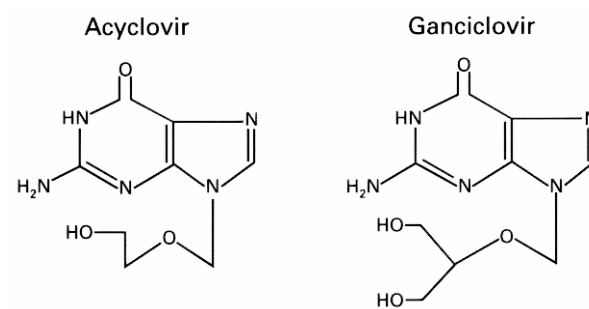


Abbildung 1: Strukturformeln von Aciclovir und seinem Strukturanalogon Ganciclovir

Die virale Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1 kann GCV selektiv zu GCV-Monophosphat phosphorylieren (Wildner et al 1999; s. Abb. 2). GCV-Monophosphat wird anschließend durch die virale und durch zelluläre Thymidinkinasen weiter zu GCV-Di- und -Triphosphat phosphoryliert, welches schließlich den aktiven zellschädigenden Metaboliten darstellt (Matthews und Boehme 1988).

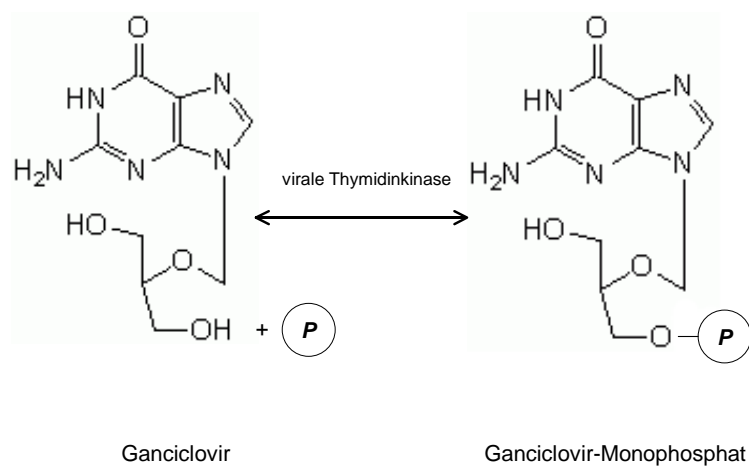


Abbildung 2: Schematische Darstellung der selektiven Phosphorylierung von Ganciclovir durch die virale Thymidinkinase

Die zytotoxische Wirkung resultiert wahrscheinlich einerseits aus dem Einbau in die DNS mit nachfolgenden DNS-Strangabbrüchen und andererseits aus der kompetitiven Hemmung der viralen und der zellulären DNS-Polymerase (Mar et al 1985, Reardon 1989, de Clerq 1997, Faulds und Heel 1990, Lüllmann und Mohr 1999).

1.3.2. Andere Nukleotidanaloga

Neben GCV können eine Reihe weiterer Nukleotidanaloga, darunter 5-Iodo-2'-deoxyuridin (Idoxuridin [IDU]), 5-Trifluoromethyl-2'-deoxyuridin (Trifluridin [TRD]), 5-Bromo-2'-deoxyuridin (Bromodeoxyuridin [BrDU]) und (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridin (Bromovinyldeoxyuridin [BVDU]), den Zelltod von Herpes-Simplex-Virus Typ 1-Thymidinkinase exprimierenden Zellen induzieren (Rainov et al 1996, de Clerq 1997). Diese auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen sind antiherpetische Virustatika, deren Anwendung beim Menschen bereits erfolgt ist (de Clerq 1997).

IDU wurde erstmals im Jahre 1962 zur Behandlung der herpetischen Keratitis verwendet (Kaufman 1962). Seit 1964 wird auch TRD zur Behandlung der herpetischen Keratitis verwendet (Kaufman und Heidelberger 1964). BVDU wird seit vielen Jahren in der topischen Behandlung der Herpeskeratitis eingesetzt (Maudgal und de Clerq 1991), sowie seit kurzem auch in der Behandlung des Herpes Zoster (Wutzler et al 1995). BrDU findet als Strahlensensitizer klinische Verwendung (Prados et al 1998).

1.3.3. Klinische Anwendung

Die Transfektion von Tumorzellen mit dem Gen für die Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase und die Behandlung mit Virustatika stellt einen innovativen Ansatz zur adjuvanten Therapie humaner Gliome dar (Mizuno et al 1989, Chen et al 1994). Das therapeutische Konzept der VDEPT wurde demzufolge in verschiedenen klinischen Studien zur Behandlung des Glioblastoms erprobt, darunter auch in Phase III Studien (Ram et al 1997, Serman et al 1998, Klatzmann et al 1998, Rainov 2000). Die Ergebnisse dieser

Studien waren bislang allerdings enttäuschend. Von besonderer Bedeutung waren hierbei die niedrige Effizienz der bislang zur Verfügung stehenden retroviralen Vektoren bzw. der Vektor-produzierenden Zellen und somit niedrigen *in vivo*-Transduktionsraten von Tumorzellen. Die *in vivo* beobachteten Transduktionsraten lagen unter 1%, und deshalb war auch die Wirksamkeit von GCV *in vivo* gering (Hadaczek et al 2005, Shand et al 1999, Rainov 2000).

Daher wird dringend nach Verbesserungen dieser vom Konzept der hohen Tumorselektivität der Medikamente her reizvollen Therapieform gesucht, sei es unter Ausnutzung und Ausweitung des Bystander-Effektes, der Verbesserung der *in vivo* Transduktionsraten, z.B. durch adenovirale Vektoren, oder durch pharmakodynamische Verbesserungen durch Transduktion mit Thymidinkinase-Varianten, die eine höhere Substratspezifität für GCV besitzen (Smitt et al 2003, Germano et al 2003, Kokoris und Black 2002, Trask et al 2000).

In Zukunft könnten aber, sollten die vorbeschriebenen Schwierigkeiten hinsichtlich der Applikationsform bei der VDEPT überwunden werden, auch pharmakologische Optimierungsstrategien, z.B. durch Prodrug-Kombinationstherapien, von Bedeutung sein. Das Prinzip der VDEPT selbst stellt dann nicht nur für die Behandlung von Gliomen, sondern auch für die Behandlung anderer maligner Erkrankungen oder der graft-versus-host-Reaktion nach Knochenmarkstransplantationen eine vielversprechende Möglichkeit dar.

1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

Ausgehend von der Überlegung, daß sich auch in der klassischen Chemotherapie eine gute zytostatische Wirkung meist erst durch Kombination verschiedener Substanzen erzielen läßt, wurde in Voruntersuchungen im Labor für Hirntumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik untersucht, ob ähnliche synergistische Wirkungssteigerungen der Einzelsubstanzen bei der VDEPT ebenfalls durch Kombination verschiedener Prodrugs erreicht werden können. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß z.B. BVDU die Toxizität von GCV auf verschiedene, die Herpes-Simplex-Virus Typ 1-Thymidinkinase exprimierende Zelllinien *in vitro* potenziert (Hamel et al 2001).

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, inwieweit auch andere Kombinationen antiviraler Prodrugs zu einer Wirkungsverstärkung führen. Potentielle *in vitro*-Effekte lassen jedoch keine Rückschlüsse auf den *in vivo*-Nutzen zu, so daß *in vitro* beobachtete Effekte durch Tierversuche nachfolgend validiert werden müssen.

Deshalb sollten die folgenden Fragen näher untersucht werden:

- Welche Prodrug-Kombinationen können sich gegenseitig in ihrer zytotoxischen Wirkung auf HSV-tk exprimierende Tumorzellen verstärken? Über GCV und BVDU hinaus sollen die folgenden, der Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase als Substrat dienenden Substanzen untersucht werden: BrDU, IDU und TRD.
- Lässt sich durch die kombinierte Gabe von BVDU und GCV eine Verstärkung der antitumorösen Wirkungen dieser Prodrugs auch *in vivo* beobachten, d.h. in subkutanen Tumoren athymischer Mäuse?

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien

9L-STK	-	Gliom (Ratte)
PA317 (mod. 3T3)	-	Fibroblasten (Maus)
C6-STK	-	Gliom (Ratte)
A172-STK	-	Gliom
SF295-STK	-	Gliom
U87-STK	-	Gliom
U251-STK	-	Gliom
WiDR-STK	-	Colonicarcinom
HCT116-STK	-	Colonicarcinom

wurden durch Transfektion mit einem die Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase exprimierenden STK-Retrovirus im Brain Tumor Research Center, UCSF, USA, hergestellt (Hamel et al 2001). Als Negativkontrolle wurde die nicht transfizierte Zelllinie 9L-BTRC verwendet. Alle Zellkulturlinien werden bei -257° C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Kultivieren wurden die Zelllinien in Plastik-Zellkulturflaschen (*BD Biosciences*) bei 37° C und 5% CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Als Wachstumsmedium dienten 20ml Dulbecco's MEM (*Gibco*) versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (*Gibco*) sowie jeweils 5% 200mM L-Glutamin (*Gibco*) und 100mM Na-Pyruvat (*Biochrom*).

Wenn die Zellen nach drei bis vier Tagen in einer Kulturflasche zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren, wurden die Zellen vereinzelt und ca. 5% der Zellen wurden erneut zur Fortführung der Kultur in Kulturflaschen unter den o.g. Bedingungen inkubiert.

Hierzu wurde das Nährmedium steril abgesaugt und die Zellen mit ca. 4ml 10% Trypsin-EDTA (*Gibco*) versetzt. Nach 5-10 Minuten weiterer Inkubation hatten sich die Zellen abgekugelt und waren von der Kunststoffoberfläche der Kulturflasche abgeschwommen. Die Zellen wurden sodann durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit einer sterilen 5ml Pipette (*Falcon*) vereinzelt.

Die Zellen, die nicht zur Aufrechterhaltung der Zellkultur verwendet wurden, standen für die Experimente zur Verfügung.

2.1.2. Medikamente

Untersucht wurden die Wirkungen auf das Tumorzellwachstum für die Substanzen GCV (*Sigma*), BVDU (*Berlin Chemie*), BrDU (*Sigma*), IDU (*Sigma*) und TRD (*Sigma*).

Es wurden aus den gelieferten Reinstsubstanzen jeweils Stocklösungen laut Herstellerangabe hergestellt. GCV wurde in einer Konzentration von 200mM in H₂O gelöst. BVDU wurde in einer Konzentration von 10mM in CH₂OH gelöst. BrDU wurde in einer Konzentration von 100mM in 0,1 M NH₄OH gelöst. IDU wurde in einer Konzentration von 10,0mM in 1 N NaOH gelöst. TRD wurde in einer Konzentration von 10,0mM in H₂O gelöst. Die Stocklösungen wurden bei – 20° C gelagert.

Für die Versuche wurden aus den Stocklösungen jeweils Verdünnungsreihen hergestellt. Da bei den Versuchen den Zellen zusätzlich zu einer Substanz jeweils entweder dieselbe Menge Nährmedium oder dieselbe Menge einer anderen Substanz zugesetzt wurden, wurden die Substanzen in den Verdünnungsreihen zweifach konzentriert angesetzt:

GCV: 20nM – 100nM – 200nM – 400nM – 1,0µM – 2,0µM – 4,0µM – 10,0µM

BVDU: 20nM – 50nM – 100nM – 200nM – 1,0µM

BrDU: 200nM – 400nM – 1,0µM – 2,0µM – 5,0µM – 10,0µM – 20,0µM

IDU : 200nM – 400nM – 1,0µM – 2,0µM – 5,0µM – 10,0µM – 20,0µM

TRD : 200nM – 400nM – 1,0µM – 2,0µM – 5,0µM – 10,0µM – 20,0µM

2.1.3. Proliferationsassay *in vitro*

Die Zellsuspensionen, die aus der Vereinzelnung der Zelllinien für die Experimente zur Verfügung standen, wurden zunächst 1:1 mit Nährmedium verdünnt. Eine Probe wurde dann in einer Neubauer Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop (*Leica*) gezählt. Für diese Verdünnungen ergaben sich Zellkonzentrationen zwischen 5×10^4 und 2×10^6 Zellen/ml.

Die Suspensionen wurden dann durch Hinzugabe von Nährmedium weiter verdünnt, bis sich für ein Volumen von ca. 20ml eine Zellkonzentration von 2×10^4 Zellen/ml ergab. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit einer sterilen 10ml Pipette (*Falcon*) wurde diese Zellsuspension gut durchmischt, bevor von dieser jeweils 100µl mittels einer sterilen 5ml Pipette (Eppendorf) und einer Pipettierhilfe (*Pipetman*) in einen Napf einer 96-Napf-Titerplatte (*NUNC*) gegeben wurden. Die beimpften 96-Napf-Titerplatten wurden wie die Zelllinien bei 37° C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Nach 24h Inkubation wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft, ob die Zellen sedimentiert und am Kunststoff des Napfbodens angeheftet waren. Sodann wurde das Nährmedium aus den Näpfen steril abgesaugt und die Zellen entsprechend der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3) behandelt.

Jeder Napf sollte mit 100µl einer zu untersuchenden Prodrugkonzentration bzw. Kombination von Prodrugs gefüllt sein. Die linken drei Näpfe der ersten horizontalen Reihe stellten die Kontrolle dar und auf diese wurden jeweils 100µl Nährmedium gegeben.

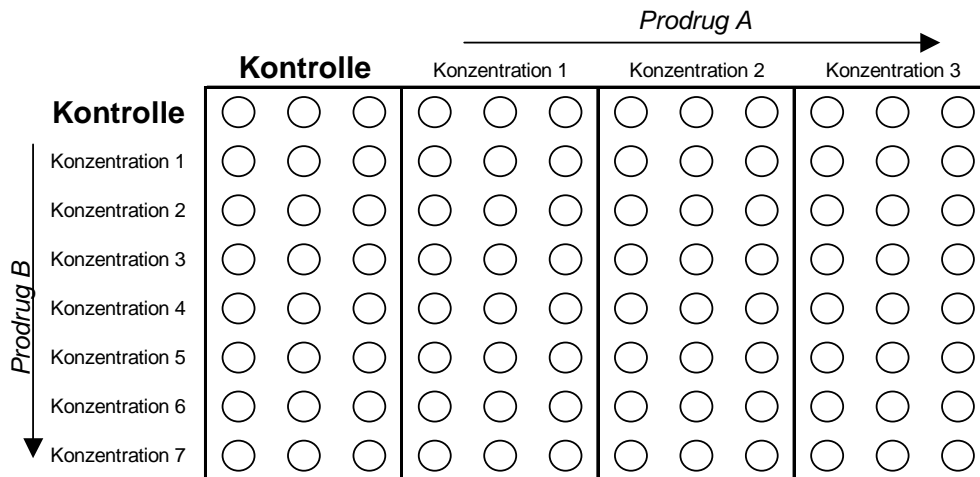


Abbildung 3: Beschickung der 96-Napf-Titerplatten mit zwei verschiedenen Prodrugs in unterschiedlichen Konzentrationen

Auf die übrigen Näpfe der ersten drei vertikalen Reihen und die übrigen Näpfe der ersten horizontalen Reihe wurden jeweils nur 50µl Nährmedium gegeben. Auf jeden Napf einer horizontalen Reihe mit Ausnahme der drei linken in der ersten Reihe wurden 50µl einer zu untersuchenden Prodrug in aufsteigender Konzentration gegeben, auf jeden Napf einer vertikalen Reihe mit Ausnahme der Näpfe in der obersten horizontalen Reihe wurden jeweils 50µl einer zweiten Prodrug in aufsteigender Konzentration gegeben.

Nach vollständiger Beschickung wurden die Zellkulturplatten erneut inkubiert. Die Proliferation der Zellen in den Näpfen wurde täglich unter einem Phasenkontrasmikroskop überprüft.

Die Auswertung dieser Versuchsanordnung erfolgte, wenn die unbehandelten Zellen in ihren Näpfen einen dichten, konfluierenden Zellrasen gebildet hatten. Ein konfluierender Zellrasen in diesen Näpfen konnte jeweils zwischen dem fünften und siebten Tag nach Versuchsbeginn beobachtet werden.

2.1.4. Qualitative Auswertung

Aus allen Nöpfen einer 96-Napf-Zellkulturplatte wurde das Medium steril abgesaugt. Dies geschah, ohne mit der Pasteur-Pipette den Napfboden zu berühren, um das unbeabsichtigte Absaugen anhaftender Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,1% Kristallviolett (0,1% Kristallviolett, 20% CH₂OH, 79,9% H₂O) für 20 Minuten fixiert und gefärbt. Dann wurde das nicht gebundene Kristallviolett unter fließendem Wasser über mehrere Stunden abgespült.

2.1.5. Quantitative Auswertung

Bei denjenigen Zelllinien und Prodrug-Kombinationen, bei denen die qualitative Auswertung Hinweise auf wirkungsverstärkende Interaktionen ergab, erfolgte in einer Wiederholung eine quantitative Auswertung bei den Konzentrationen, bei denen maximale wirkungsverstärkende Effekte vermutet wurden.

Unter Zugabe von 50µl Trypsin-EDTA wurden die Zellen für 5 Minuten inkubiert zur Vereinzelnung und Abkugeln. Danach wurden 50µl 0,4% Trypanblau zugesetzt und die Zellen einige Male zur Durchmischung aufgesaugt und ausgeblasen.

Im Anschluß erfolgte die Zählung in einer Neubauer Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop. Gezählt wurden die unbehandelten Kontrollen, die Nöpfe, in denen maximale Effekte beobachtet wurden, und die mit nur einer der Prodrugs behandelten Kontrollen. Pro Napf wurden jeweils zwei Zählungen durchgeführt.

2.2. Tierversuche

In einem ersten Tierversuch sollte untersucht werden, ob GCV einen dosisabhängigen, proliferationshemmenden Einfluß auf das *in vivo* Wachstum von Gliomzellen hat, die mit dem Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase-Gen

transfiziert worden sind. In einem folgenden Tierversuch sollte der Einfluß der zusätzlichen Gabe von BVDU überprüft werden.

2.2.1. Mäuse

Für die Experimente wurde ein subkutaner Tumormodell in athymischen nu/nu-Nacktmäusen gewählt. Die Durchführung der Experimente wurde unter der Antragsnr. 10/00 durch die Freie und Hansestadt Hamburg genehmigt.

Die verwendeten Tiere stammen aus der eigenen Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Sie wurden in keimarmen Barriereräumen mit kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit und einem 12h-Tag/Nacht-Rhythmus in Kunststoffkäfigen gehalten. Wasser und Futter standen den Tieren jederzeit zur Verfügung.

Verwendet wurden ausschließlich weibliche Tiere. Das Alter der Tiere bei Versuchsbeginn betrug ca. 6-8 Wochen.

2.2.2. Gewinnung der Tumorzellen

Für die *in vivo* Experimente wurden Zellen der Linien 9L-STK und SF295-STK verwendet. Sie wurden auf die oben beschriebene Weise gewonnen.

Pro Tier sollte eine subkutane Injektion von 3×10^6 Zellen erfolgen und jedem Tier konnten subkutan maximal 100µl einer Zellsuspension injiziert werden. Daher wurde die für den jeweiligen Versuch benötigte Anzahl von Zellen berechnet, und die Konzentration der aus den Zelllinien gewonnenen Zellen wurde durch Zählung in einer Neubauer Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt.

Das für die Tumorzellimplantation jeweils benötigte Volumen wurde steril abpipettiert und die Zellsuspension in einer Zentrifuge (*Hettich*) für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde steril abpipettiert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt durchgeführt, so daß die Zellen insgesamt dreimal gewaschen

wurden. Anschließend wurde den Zellen genau so viel zusatzfreies Dulbecco's MEM Nährmedium zugesetzt, daß die Konzentration der Zellsuspension 3×10^7 Zellen/ml betrug.

Die Zellsuspension wurde in 1ml Insulinspritzen (*Braun*) aufgezogen. Die im Kunststoffröhrchen verbliebenen Zellen wurden mit 0,4% Trypanblau (*Sigma*) gefärbt und unter einem Phasenkontrastmikroskop begutachtet, wobei sich nur avitale Zellen blau färbten.

2.2.3. Proliferationsassay *in vivo*

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere randomisiert und durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Den Tieren wurden jeweils 100µl der oben beschriebenen Zellsuspension subkutan in die rechte Flanke injiziert.

Etwa 4 bis 5 Tage nach Tumorzellinjektion hatten sich an den Einstichstellen kleine solide Tumorknötchen gebildet. Die Tiere wurden dann über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich unter Gewichtskontrolle behandelt. Ab dem letzten Tage der Behandlung wurde die Größe der soliden Tumoren regelmäßig bestimmt. Das Tumolvolumen und das Gewicht der Tiere wurden alle zwei Tage bis zum Versuchsende ermittelt.

Zur Tumolvolumenbestimmung wurden die Tumorknoten mittels einer Schubleere in Längs- und Querrichtung ausgemessen, ohne die Tumoren zu quetschen. Die annähernde Berechnung der Tumorgröße erfolgte unter Anwendung der Formel

$$\text{Volumen} = \frac{1}{2} * \text{Breite}^2 * \text{Länge} \text{ (Dethlefsen et al 1968).}$$

Die Tiere wurden durch Genickbruch in CO₂-Narkose getötet, sobald die Tumoren entweder ulzerierten oder eine Größe erreichten, die mit einer Belastung der Tiere einhergingen.

2.2.3.1. Kontrollbehandlung

Eine Kontrollbehandlung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 150µl NaCl 0,9% (Braun) sowie für den zweiten Versuch mit einer zusätzlichen peroralen Gabe von 100µl Olivenöl-DAB (*Apotheke UKE*) mit einer 1ml Insulinspritze und einer gebogenen, stumpfen Knopfkanüle.

2.2.3.2. Behandlung mit GCV

Die Behandlung mit GCV (Cymeven[®], *Hoffmann-La Roche*) erfolgte durch gewichtsabhängige, intraperitoneale Injektionen von 30mg/kgKG bzw. 80mg/kgKG GCV.

Hierfür wurden 500mg GCV Trockenpulver zunächst in 10ml NaCl 0,9% (*Braun*) gelöst und anschließend 1:4 mit NaCl 0,9% verdünnt. Von dieser Lösung mit einer Wirkstoffkonzentration 10mg/ml wurden den Tieren die entsprechende Menge intraperitoneal (i.p.) injiziert.

2.2.3.3. Behandlung mit BVDU

Die Behandlung mit BVDU erfolgte durch gewichtsabhängige, perorale Verabreichung von ca. 60mg/kg KG BVDU mit einer 1ml Insulinspritze und einer gebogenen, stumpfen Knopfkanüle.

Das BVDU Trockenpulver wurde zuvor in einer Konzentration von 9mg/ml in Olivenöl-DAB gelöst.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung der *in vitro*-Proliferationsassays

3.1.1. Kombination BVDU/TRD

Beide Substanzen waren für die verwendeten transfizierten Zelllinien zytotoxisch. Dabei zeigten sich die Zelllinien unterschiedlich empfindlich für die Prodrugs, so daß eine bestimmte Prodrug-Konzentration bei verschiedenen Zellen unterschiedlich starke Wirkungen hatte. Eine Wirkungsverstärkung bei kombinierter Behandlung konnte bei fast allen untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

Auf die nicht HSV-tk transfizierte Zelllinie 9L-BTRC entfaltete BVDU keine zytotoxische Wirkung (Abb. 4). TRD hingegen entfaltete auch auf diese Zelllinie eine proliferationshemmende Wirkung ab Konzentrationen von 0,1µM. Auffällig war, daß unter einer für die 9L-BTRC-Zelllinie sicher toxischen Konzentration von 0,5µM TRD bei der transfizierten 9L-STK noch Zellproliferation zu beobachten war (Abb. 4).

Bei der 9L-STK-Zelllinie waren proliferationshemmende Wirkungen ab Konzentrationen von 25nM BVDU bzw. 0,5µM TRD zu beobachten. In der Kombination der Substanzen war die zytotoxische Wirkung gegenüber den Einzelgaben deutlich erhöht (Abb. 4). Da hier wirkungsverstärkende Effekte zu erkennen waren, erfolgte in einer nachfolgenden Wiederholung des Experimentes eine Quantifizierung: Unter 25nM BVDU betrug die Fraktion überlebender Zellen nach 5-tägiger Inkubation 79,7% und nach Inkubation mit 0,5µm TRD 43,8% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Nach kombinierter Inkubation fanden sich noch 10,3% der Zellen (Abb. 5.).

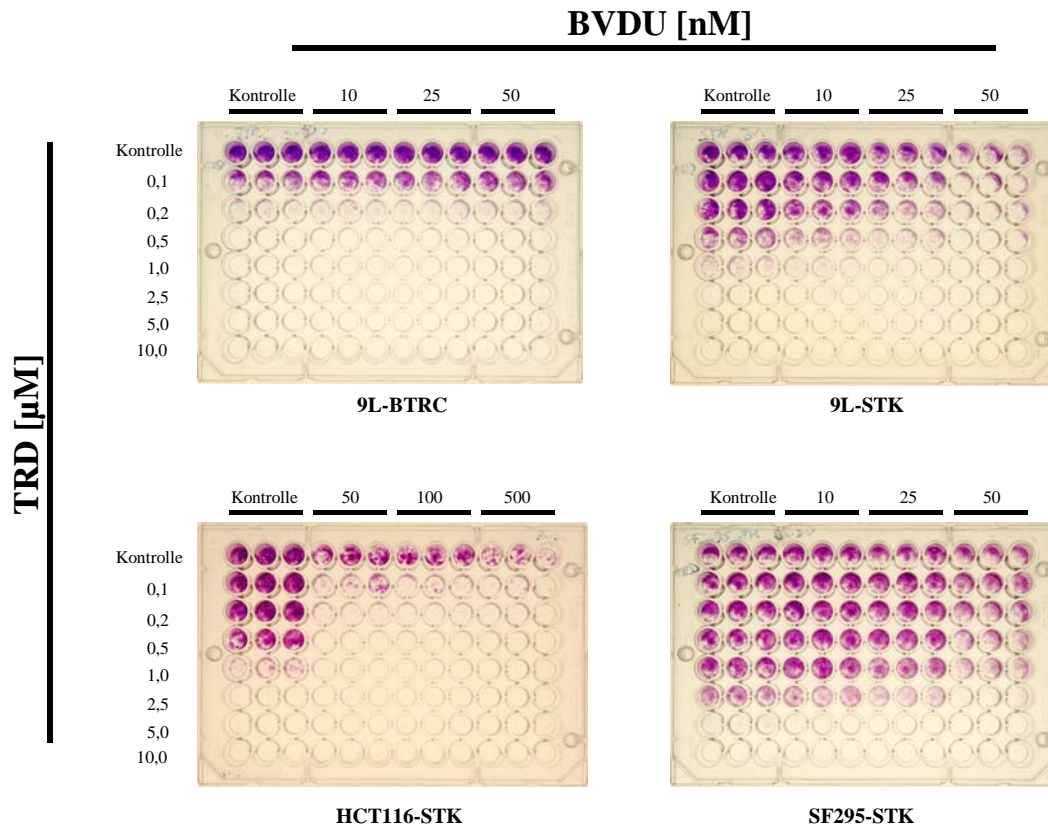


Abbildung 4: Mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Napf-Titerplatten nach Behandlung mit BVDU und TRD

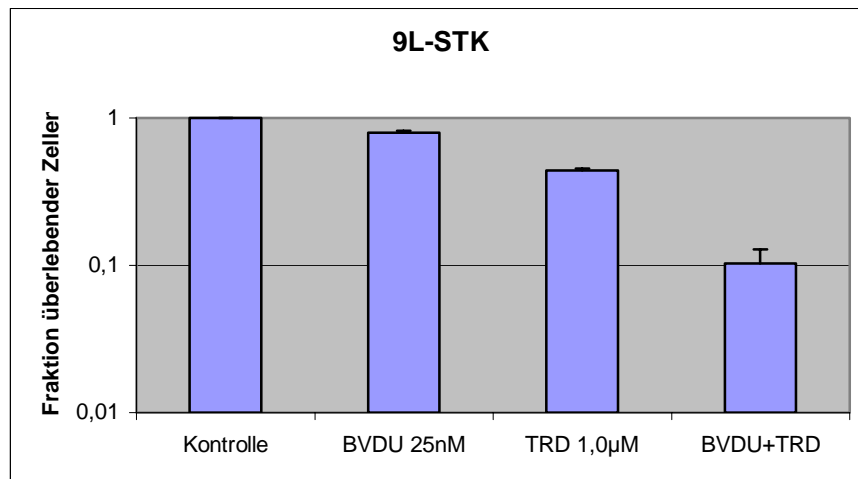


Abbildung 5: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von BVDU und TRD bzw. ihrer Kombination auf die 9L-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Einen ähnlichen Effekt hatte die kombinierte Behandlung mit BVDU und TRD auf die HCT116-STK Zelllinie. Die Färbung und Fixierung mit Kristallviolett ergab Hinweise für eine wirkungsverstärkende Interaktion ab Konzentrationen von BVDU 10nM und TRD 0,2 μ M (Abb. 4). Im Rahmen der Quantifizierung ergaben sich maximal wirkungsverstärkende Effekte für die Kombination aus BVDU 50nM und TRD 0,2 μ M. Nach Inkubation mit 50nM BVDU bzw. 0,2 μ M TRD betragen die Fraktionen überlebender Zellen 9,4% bzw. 53,0%. Nach kombinierter Inkubation betrug sie lediglich noch 1,1% (Abb. 6).

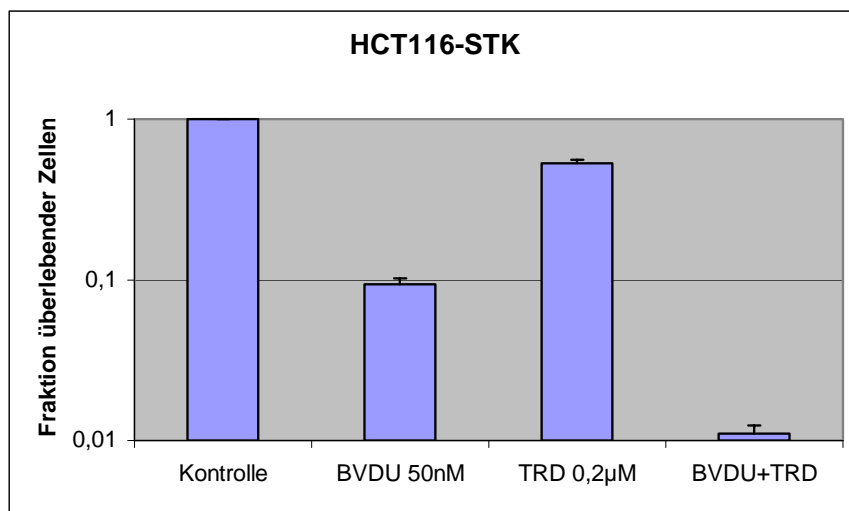


Abbildung 6: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von BVDU und TRD bzw. ihrer Kombination auf die HCT116-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Auch bei der SF295-STK Zelllinie konnte bei kombinierter Behandlung mit BVDU und TRD eine verstärkte Proliferationshemmung beobachtet werden. Die Inkubation mit 50nM BVDU oder 2,5 μ M TRD hatte jeweils leichte toxische Effekte, wohingegen die kombinierte Inkubation in diesen Konzentrationen zu einer deutlichen Wachstumshemmung führte (Abb. 4). Die Quantifizierung ergab eine Fraktion überlebender Zellen nach Behandlung mit 50nM BVDU von 92,4% und nach Behandlung mit 2,5 μ M TRD von 26,7%. Nach kombinierter Behandlung betrug die Fraktion überlebender Zellen nur noch 3,1% (Abb. 7).

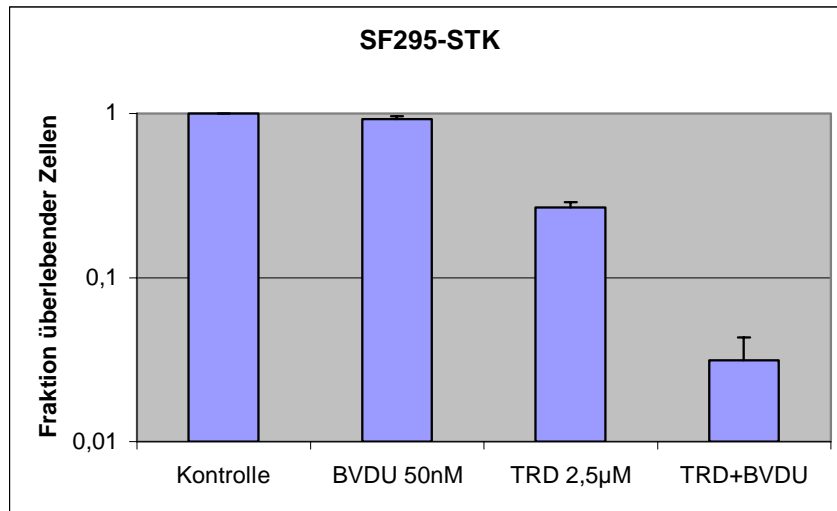


Abbildung 7: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von BVDU und TRD bzw. ihrer Kombination auf die SF295-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Eine Wirkungsverstärkung im Vergleich zur Toxizität der Einzelsubstanzen konnte auch bei der C6-STK Zelllinie gesehen werden. Eine maximale Wirkungsverstärkung wurde in der Kombination aus 100nM BVDU und 0,5µM TRD beobachtet. Diese Kombination führte zu einer Fraktion überlebender Zellen von 5,2% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach alleiniger Behandlung mit BVDU und TRD in den eben genannten Konzentrationen betragen die Fraktionen überlebender Zellen 37,5% für BVDU bzw. 34,9% für TRD (Abb. 8).

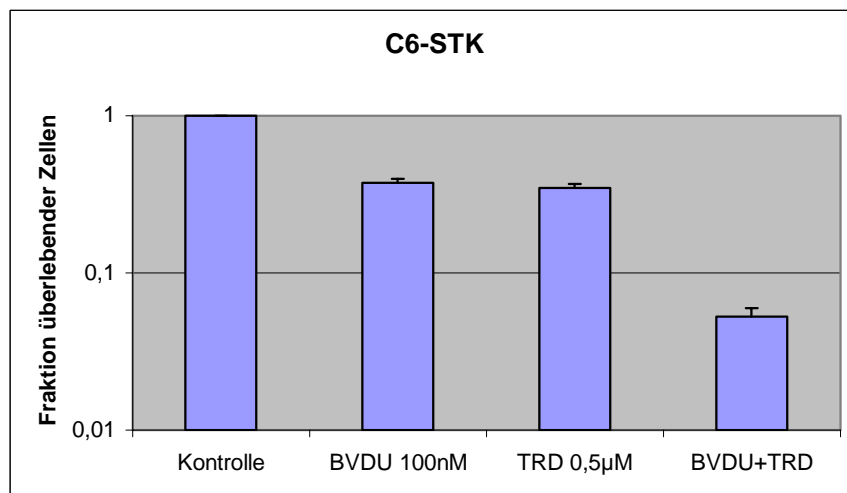


Abbildung 8: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von BVDU und TRD bzw. ihrer Kombination auf die C6-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Bei den Zelllinien A172-STK, U87-STK, U251-STK und WiDR-STK konnten ebenfalls leichte wirkungsverstärkende Effekte dieser Kombinationsbehandlung festgestellt werden (Abb.9). Für die A172-STK und die U87-STK Zelllinien konnten Wirkungsverstärkungen bei der Kombination aus 100nM BVDU und 1,0 μ M TRD, für die U251-STK und die WiDR-STK Zelllinien konnten Wirkungsverstärkungen bei Kombination aus 100 bzw. 500nM BVDU und 1,0 μ M TRD gesehen werden (Abb. 9). Diese Effekte waren jedoch nicht so deutlich wie bei den bereits oben erwähnten Zelllinien, so daß auf eine weitere Quantifizierung verzichtet wurde.

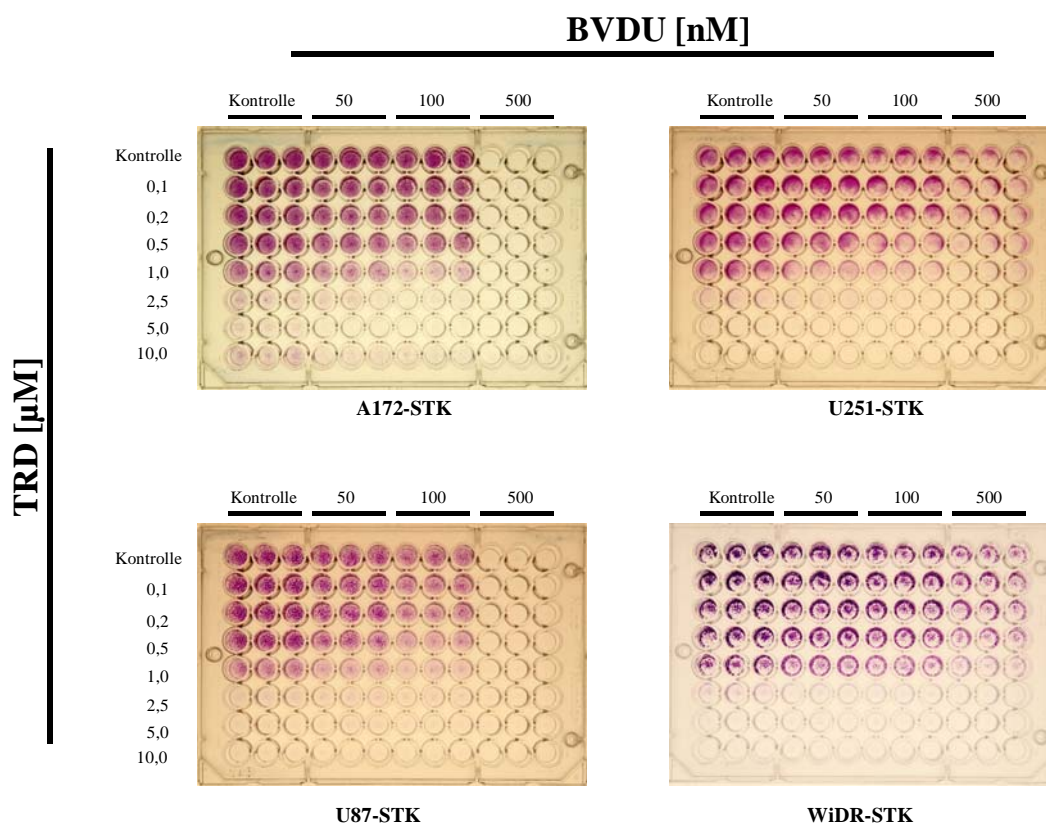


Abbildung 9: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Napf-Titerplatten nach Behandlung mit BVDU und TRD

Eine solche Wirkungsverstärkung konnte bei der PA317 Zelllinie nicht beobachtet werden (nicht abgebildet), wobei die Einzelsubstanzen ab Konzentrationen von 100nM (BVDU) bzw. 0,5 μ M (TRD) proliferationshemmende Wirkungen hatten,.

3.1.2. Kombination GCV/TRD

GCV zeigte als Monosubstanz eine zytotoxische Wirkung auf die untersuchten HSV-tk transfizierten Zelllinien. Auf die nicht transfizierte Zelllinie 9L-BTRC hatte GCV keine zytotoxische Wirkung. Eine Wirkungsverstärkung bei kombinierter Behandlung mit TRD konnte, in unterschiedlicher Ausprägung, bei der Mehrzahl der untersuchten transfizierten Zelllinien beobachtet werden.

Erneut zeigte sich TRD für die nicht transfizierte 9L-BTRC Zelllinie in geringerer Konzentration toxisch als für die transfizierte 9L-STK Zelllinie (Abb. 10).

Bei der 9L-STK Zelle fanden sich leichte proliferationshemmende Wirkungen von GCV ab Konzentrationen von 100nM und von TRD ab Konzentrationen von 0,5 μ M (Abb. 10). In der Kombination beider Prodrugs ließ sich eine deutliche Wirkungsverstärkung feststellen (Abb. 10). Diese Wirkungsverstärkung wurde nachfolgend quantifiziert. Es ergab sich hierbei eine maximale Wirkungsverstärkung in der Kombination aus 100nM GCV und 1,0 μ M TRD. Bei alleiniger Inkubation mit GCV in der entsprechenden Konzentration ergab sich eine Fraktion überlebender Zellen von 65,0% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die entsprechende Fraktion überlebender Zellen nach Inkubation mit 1,0 μ M TRD betrug 12,7%. Nach kombinierter Inkubation mit 100nM GCV und 1,0 μ M TRD überlebten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lediglich 0,4% der Zellen (Abb. 11).

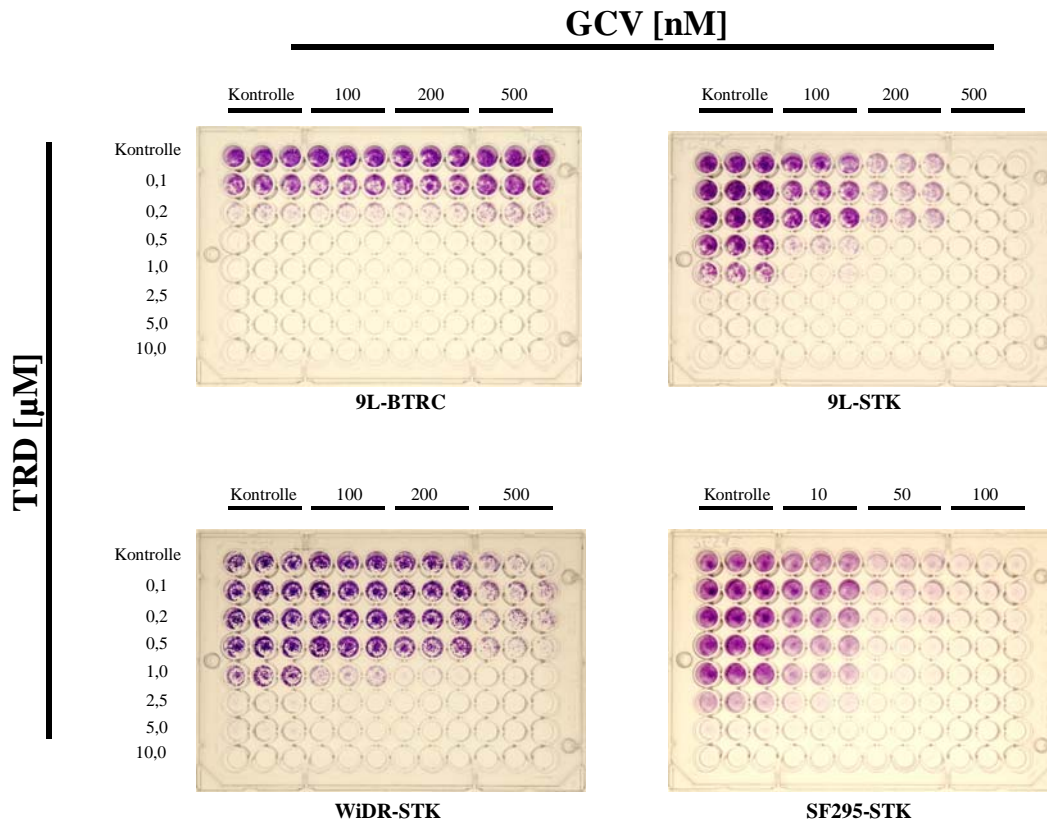


Abbildung 10: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Napf-Titerplatten nach Behandlung mit GCV und TRD

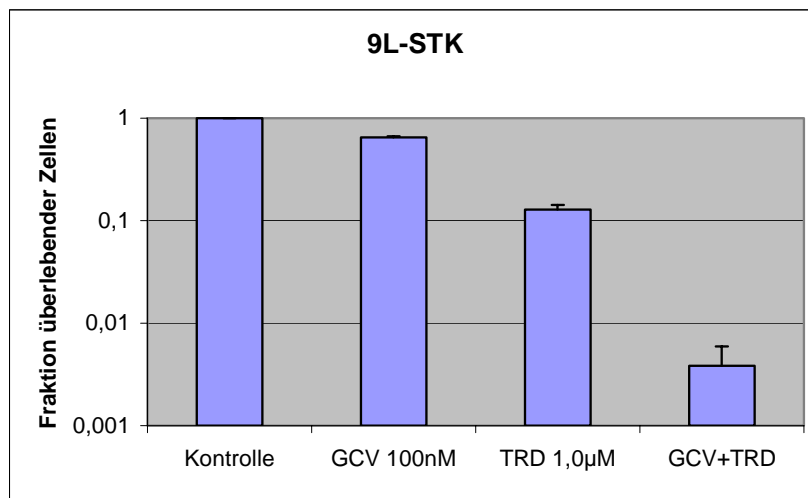


Abbildung 11: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von GCV und TRD bzw. ihrer Kombination auf die 9L-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Bei der SF295-STK Zelllinie konnte bei kombinierter Behandlung mit GCV und TRD ebenfalls eine verstärkte Proliferationshemmung beobachtet werden. Die Inkubation mit 10nM GCV oder 2,5 μ M TRD hatte jeweils einen mäßigen toxischen Effekt, der bei kombinierter Inkubation in diesen Konzentrationen deutlich stärker war (Abb. 10). Die nachfolgende Quantifizierung ergab eine Fraktion überlebender Zellen nach Behandlung mit 10nM GCV von 39,3% und nach Behandlung mit 2,5 μ M TRD von 27,3%. Nach kombinierter Behandlung betrug die Fraktion überlebender Zellen noch 2,5% (Abb. 12).

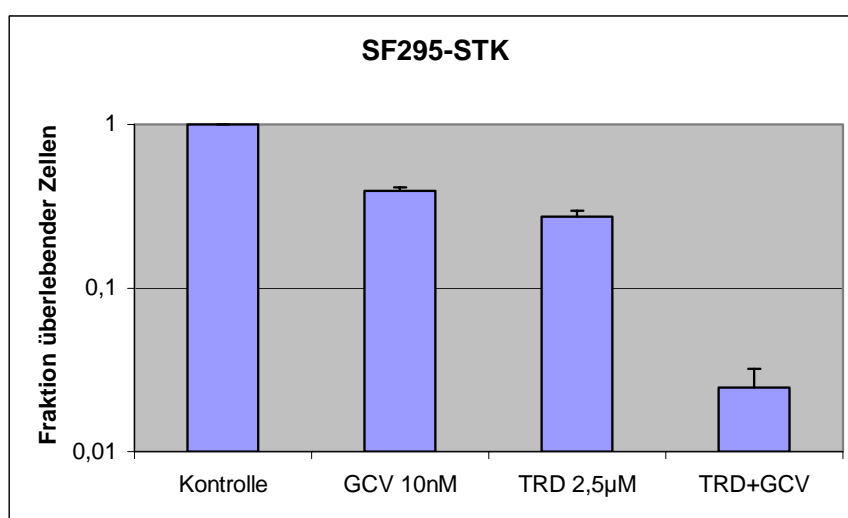


Abbildung 12: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von GCV und TRD bzw. ihrer Kombination auf die SF295-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Ähnliche Effekte zeigte die Behandlung mit GCV und TRD bei der WiDR-STK Zelllinie. Die Inkubation mit 200nM GCV bzw. 1,0 μ M TRD alleine führte nur zu einer leichten Proliferationshemmung. Die kombinierte Inkubation führte zu einer wesentlich stärkeren Hemmung des Zellwachstums (Abb. 10). Bei Quantifizierung dieses Effektes ergab sich für die alleinige Inkubation mit 200nM GCV eine Fraktion überlebender Zellen von 33,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für die alleinige Inkubation mit 1,0 μ M TRD ergab sich eine Fraktion überlebender Zellen von 69,5%. Die kombinierte Inkubation überlebten nur 6,2% der Zellen (Abb. 13).

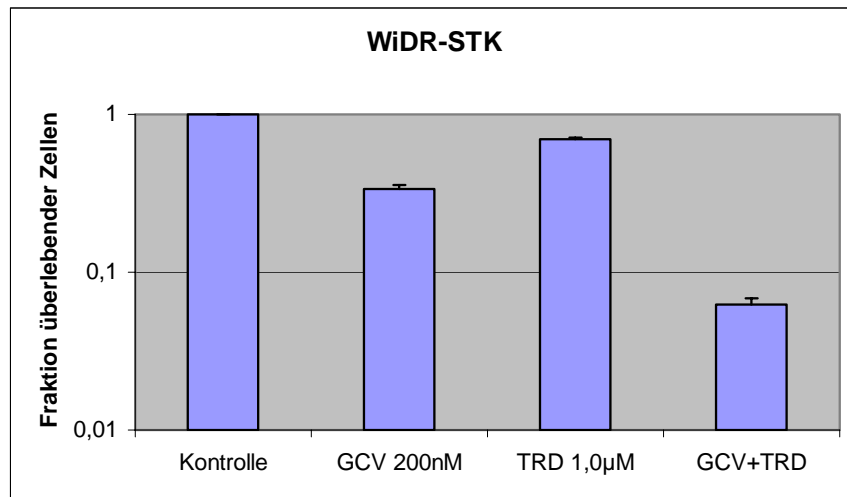


Abbildung 13: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von GCV und TRD bzw. ihrer Kombination auf die WiDR-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Die Kombination von GCV und TRD führte auch bei der HCT116-STK Zelllinie zu einer verstärkten Proliferationshemmung verglichen mit der jeweils alleinigen Inkubation. Ein maximaler Effekt ist hier für die Kombination aus 100nM GCV und 0,2µM TRD zu erkennen gewesen (Abb. 14).

Eine nachfolgende quantitative Auswertung ergab bei alleiniger Inkubation mit 100nM GCV eine Fraktion überlebender Zellen von 29,8% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach alleiniger Inkubation mit 0,2µM TRD lebten noch 53,0% der Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die kombinierte Inkubation führte zu einer Fraktion überlebender Zellen von nur noch 3,6% (Abb. 15).

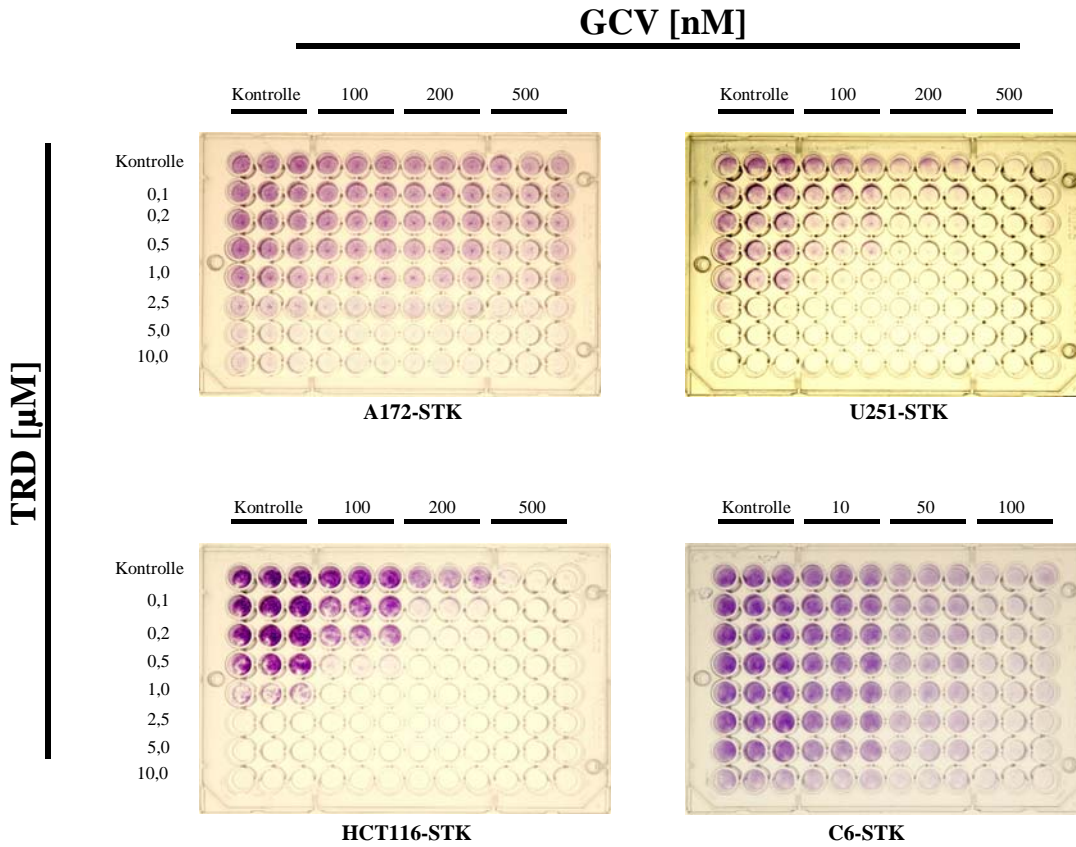


Abbildung 14: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Napf-Titerplatten nach Behandlung mit GCV und TRD

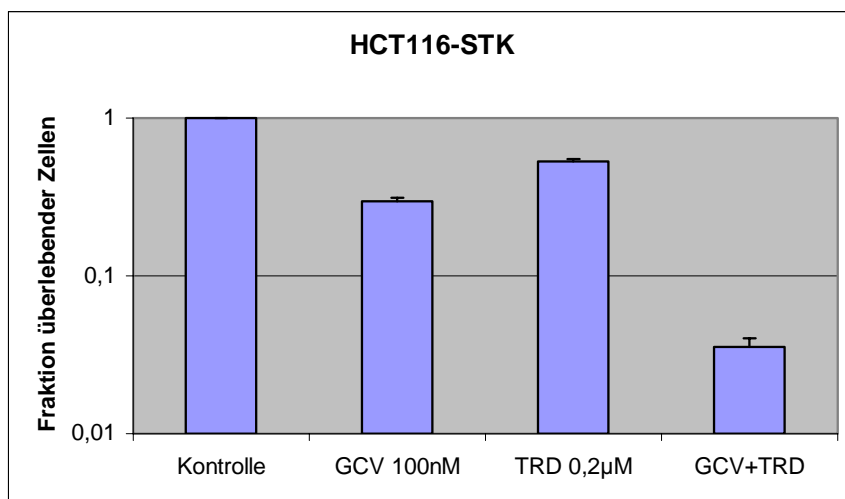


Abbildung 15: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von GCV und TRD bzw. ihrer Kombination auf die HCT116-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Bei der A172-STK Zelllinie ließ sich durch die Kombination von GCV und TRD eine allenfalls leichte Wirkungsverstärkung der Einzelsubstanzen nachweisen. Der wirkungsverstärkende Effekt, der insbesondere bei der kombinierten Inkubation mit 500nM GCV und 1,0 μ M TRD gesehen werden konnte (Abb. 14), war jedoch schwach, so daß auf eine Quantifizierung verzichtet wurde.

Ähnlich verhielt es sich mit der U251-STK Zelllinie. Auch hier wurde auf die Quantifizierung des nur leicht wirkungsverstärkenden Effektes verzichtet. Man erkennt einen schwachen Effekt bei der kombinierten Inkubation mit 100nM GCV und 1,0 μ M TRD (Abb. 14).

Keine wirkungsverstärkenden Effekte bei Behandlung mit GCV und TRD fanden sich bei den Zelllinien C6-STK (Abb. 14), PA317 und U87-STK (nicht abgebildet).

3.1.3. Kombination GCV/BrDU

BrDU war für alle HSV-tk transfizierten Zelllinien dosisabhängig zytotoxisch (Abb. 16, 18). Auf die nicht transfizierte 9L-BTRC Zelllinie hatte BrDU, ebenso wie GCV, keinen zytotoxischen Effekt (Abb. 16)

Jedoch war das Wachstum von 9L-STK Zellen unter Inkubation mit BrDU dosisabhängig gehemmt (Abb. 16). Während Dosen von bis zu 0,2 μ M BrDU nur wenig Effekt auf das Wachstum dieser Zelllinie hatten, kam es bei Inkubation mit 0,5 μ M zu einer stark reduzierten Zellproliferation. Bei dieser Konzentration zeigte sich eine Wirkungsverstärkung zusammen mit GCV in den Konzentrationen von 100nM und 200nM (Abb. 16).

Die nachfolgende quantitative Auswertung ergab den stärksten Effekt bei der kombinierten Inkubation der 9L-STK Zelllinie mit 0,5 μ M BrDU und 200nM GCV. Die alleinige Inkubation mit 0,5 μ M BrDU führte zu einem Überleben von 12,3% der Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Nach Inkubation mit 200nM GCV lebten noch 24,3% der Zellen. Die Fraktion überlebender Zellen nach kombinierter Inkubation betrug lediglich 1,6% (Abb. 17).

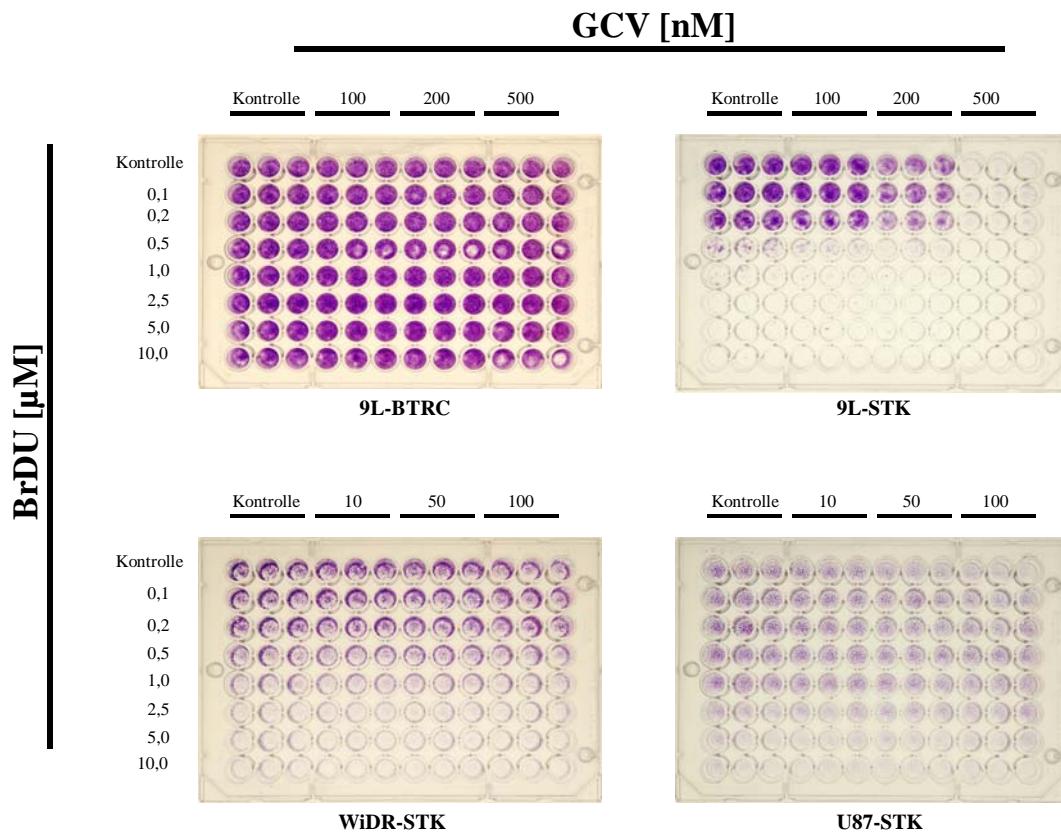


Abbildung 16: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Napftiterplatten nach Behandlung mit GCV und BrDU

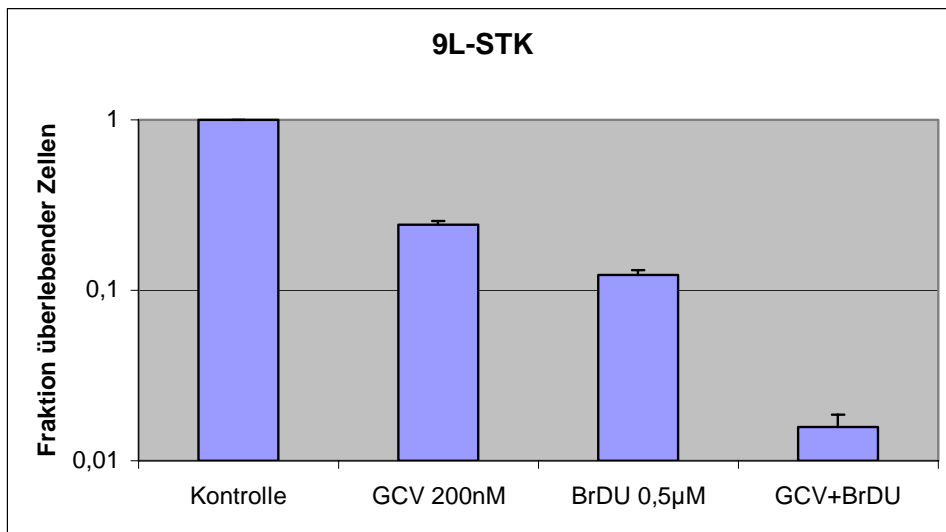


Abbildung 17: graphische Darstellung der Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkungen von GCV und TRD bzw. ihrer Kombination auf die HCT116-STK Zelllinie; Mittelwerte und Standardabweichungen

Bei den übrigen Zelllinien fanden sich keine Hinweise für eine Wirkungsverstärkung der GCV-Toxizität durch zusätzliche Gabe von BrDU.

Darüberhinaus auffällig war, daß die Inkubation der SF295-STK Zelllinie mit BrDU einen hemmenden Effekt auf die GCV-Wirkung hatte (Abb. 18). Man erkennt deutlich, daß auf diese Zelllinie die alleinige Gabe von 50nM GCV bereits einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt hat, der bei zusätzlicher Gabe von BrDU bis zu Dosen von 2,5µM abnimmt (Abb. 18).

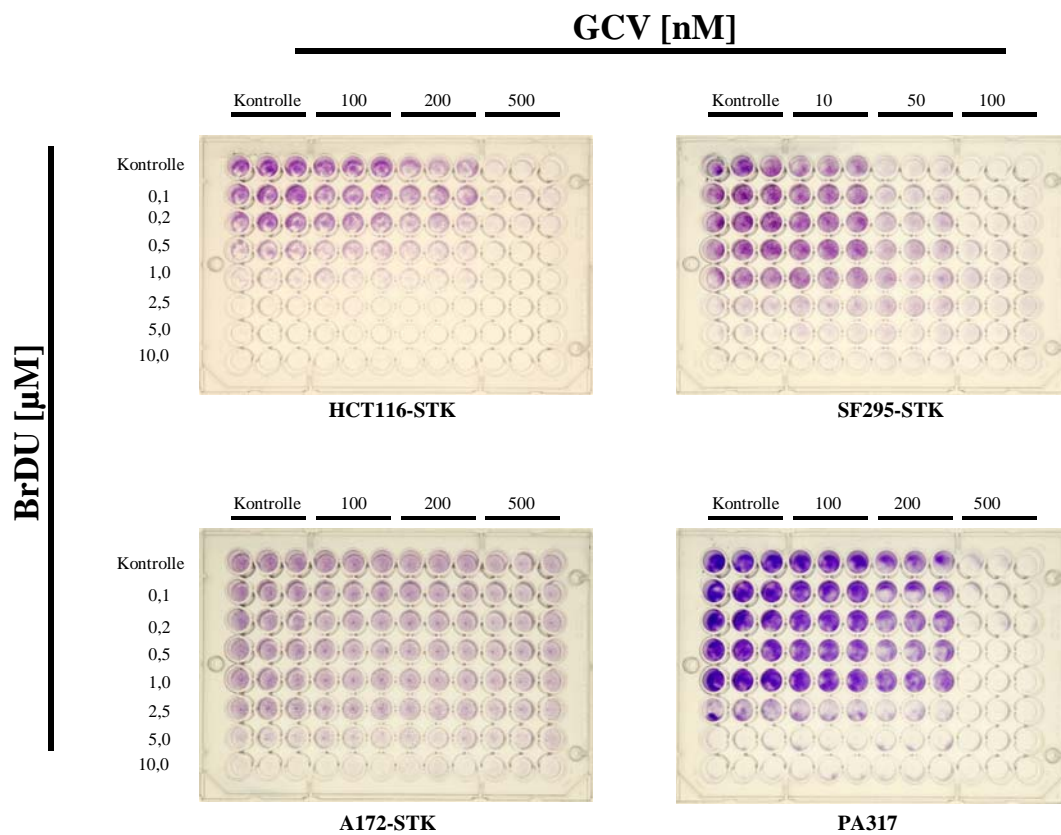


Abbildung 18: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Well-Platten nach Behandlung mit GCV und BrDU

3.1.4. Kombination GCV/IDU

Auch IDU war dosisabhängig proliferationshemmend auf die untersuchten HSV-tk transfizierten Zelllinien. IDU war erst in hohen Konzentrationen leicht wachstumshemmend für die nicht transfizierte Zelllinie 9L-BTRC, wohingegen zytotoxische Effekte auf die transfizierte 9L-STK Zelllinie bereits bei deutlich niedrigeren Konzentrationen zu beobachten waren (Abb. 19, 20).

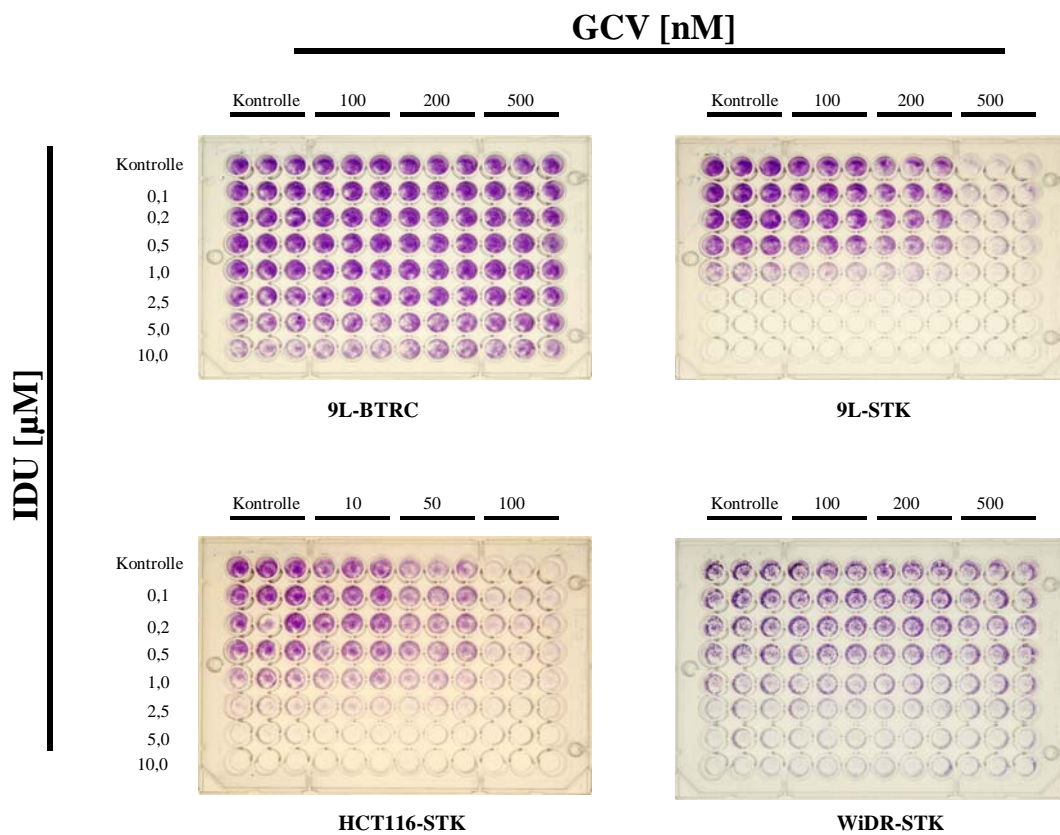
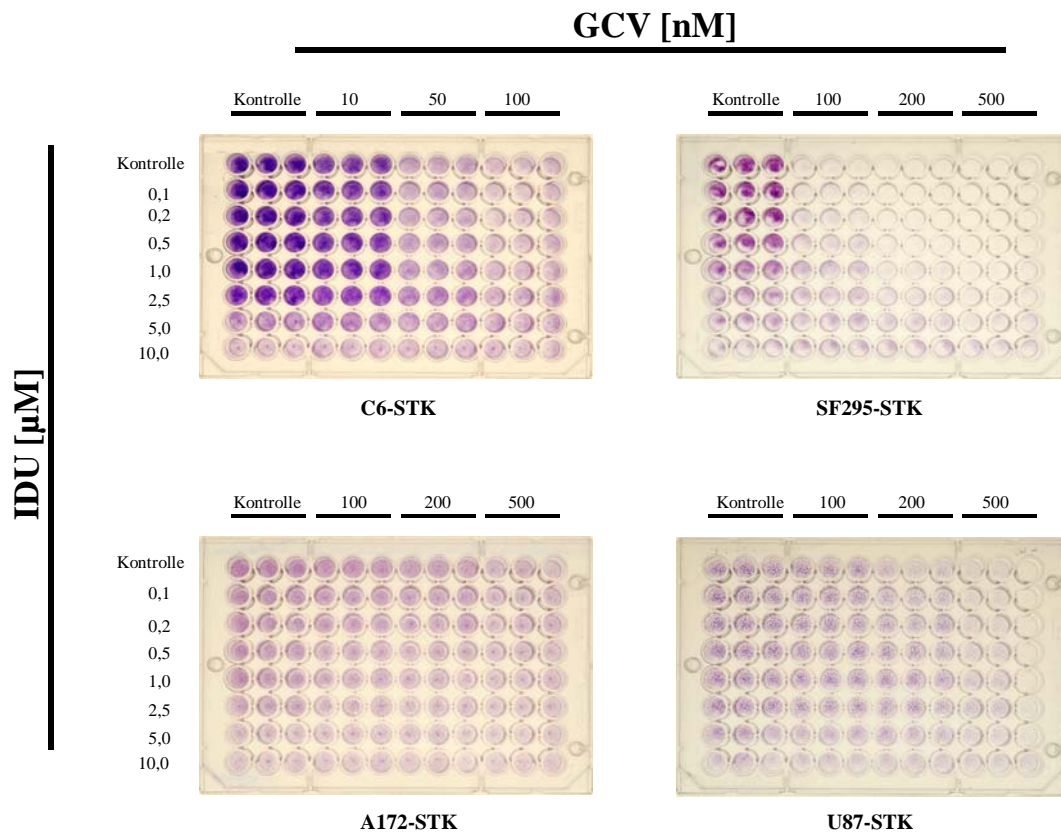


Abbildung 19: mit Kristallviolett gefärbte und fixierte 96-Well-Platten nach Behandlung mit GCV und IDU

Allerdings war bei IDU die proliferationshemmende Wirkung auf die transfizierten Zelllinien insgesamt nicht so ausgeprägt wie bei dem strukturverwandten BrDU. Zum Erreichen des gleichen zytotoxischen Effektes waren, in unterschiedlicher Ausprägung bei den einzelnen Zelllinien, höhere Prodrug-Konzentrationen nötig.

Auf die Zelllinien 9L-STK, HCT116-STK, WiDR-STK und U251-STK entfalteten GCV und IDU dosisabhängige zytotoxische Wirkungen, ohne daß es bei kombinierter Inkubation zu einer Wirkungsverstärkung kam (Abb. 19, U251-STK nicht abgebildet).

Auf die Zelllinien A172-STK und PA317 hatte die Inkubation mit IDU nur schwache proliferationshemmende Effekte. Eine Wechselwirkung zwischen GCV und IDU konnte bei kombinierter Inkubation nicht beobachtet werden (Abb. 20, PA317 nicht abgebildet).



Ähnlich wie bei der Behandlung mit BrDU konnte bei der SF295-STK Zelllinie durch die zusätzliche Gabe von IDU eine Abschwächung der GCV-induzierten Proliferationshemmung beobachtet werden. Dieser Effekt wurde noch deutlicher sichtbar, als die SF295-STK Zelle mit hohen, sicher toxischen Dosen GCV behandelt wurde. Man erkennt z.B. noch deutliche Zellproliferation bei kombinierter Inkubation mit 100nM GCV und 1,0µM IDU, obwohl sich nach alleiniger Inkubation mit 100nM GCV keine Zellen mehr durch die Kristallviolett-Färbung darstellen ließen (Abb. 20).

Eine ähnliche Beobachtung konnte für die Kombination GCV/IDU bei den Zelllinien C6-STK und U87-STK gemacht werden. Bei der C6-STK Zelllinie war die kombinierte Inkubation mit 50nM GCV und 2,5µM IDU weniger zytotoxisch als die alleinige Inkubation mit GCV. Bei der U87-STK Zelllinie war die kombinierte Inkubation mit 200nM GCV und 1,0µM IDU weniger zytotoxisch als die alleinige Inkubation mit GCV (Abb 20).

3.1.5. Zusammenfassung

Insgesamt fanden sich bei den untersuchten Zelllinien unterschiedliche Effekte der einzelnen Medikamentenkombinationen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

Zelllinie	GCV+TRD	BVDU+TRD	GCV+BrdU	GCV+IDU	GCV+BVDU (Hamel et al 2001)
9L-STK	+	+	+	O	+
PA317	O	O	O	O	+
C6-STK	O	+	O	-	O
A172-STK	(+)	(+)	O	O	+
SF295-STK	+	+	-	-	+
U87-STK	O	(+)	O	-	+
U251-STK	(+)	(+)	O	O	+
WiDR-STK	+	(+)	O	O	O
HCT116-STK	+	+	O	O	O

Tabelle 1: Interaktionen von Prodrugkombinationen *in vitro*; + = Wirkungsverstärkung; O = keine Interaktion; - = Wirkungsabschwächung; () = schwache Wirkung

3.2. Auswertung der Tierversuche

Für die Tierversuche entschied man sich für die SF295-STK Zelllinie. Die SF295 Zelllinie ist eine weit verwendete Zelllinie in subkutanen Mausmodellen und auch die STK-Variante wurde in Mausmodellen untersucht (Sturtz et al 1997). Aus den oben beschriebenen Ergebnissen und aus Voruntersuchungen zeigt sich zudem, daß diese Zelllinie *in vitro* besonders sensibel auf die Behandlung mit antiviralen Substanzen reagiert (Hamel et al 2001).

Allerdings konnte selbst unter Erhöhung der Zahl der injizierten Zellen auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/Tier kein konstantes subkutanes Tumorwachstum beobachtet werden. Daher wurden die Tierversuche schließlich mit 9L-STK Zellen durchgeführt, die zuverlässig zu großen subkutanen Tumoren wuchsen.

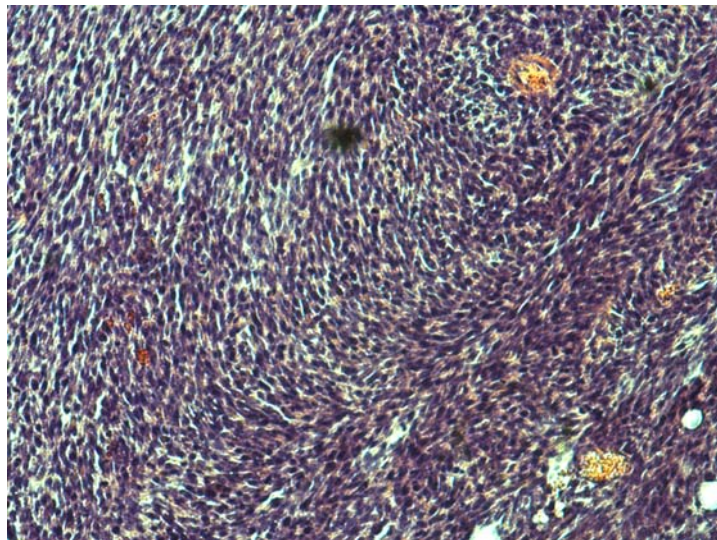


Abbildung 21: HE-Schnitt eines subkutanen 9L-STK Tumors, 10-fache Vergrößerung

3.2.1. Behandlung mit GCV

In einer ersten Versuchsanordnung sollte überprüft werden, ob GCV das Wachstum subkutan implantierter Tumoren dosisabhängig beeinflusst. Hierbei konnte anhand der in zweitägigen Abständen bestimmten Tumorumfänge eine

eindeutige Beziehung zwischen GCV-Dosis und Tumolvolumen festgestellt werden. Unter der Behandlung mit GCV verstarb keines der Tiere vorzeitig.

Bei den Tieren der mit 100µl NaCl 0,9% i.p. behandelten Kontrollgruppe kam es zu einem kontinuierlichen Tumorstadium. Ein durchschnittliches Tumolvolumen von über 1000mm³ wurde bei dieser Gruppe nach 20 Tagen post implantationem erreicht (Abb. 22).

Demgegenüber fand sich bei den Tieren, die mit GCV 30mg/kgKG i.p. ein verzögerter Anstieg der mittleren Tumorstadien. Ein durchschnittliches Tumolvolumen von über 1000mm³ wurde nach 33 Tagen post implantationem erreicht (Abb. 22).

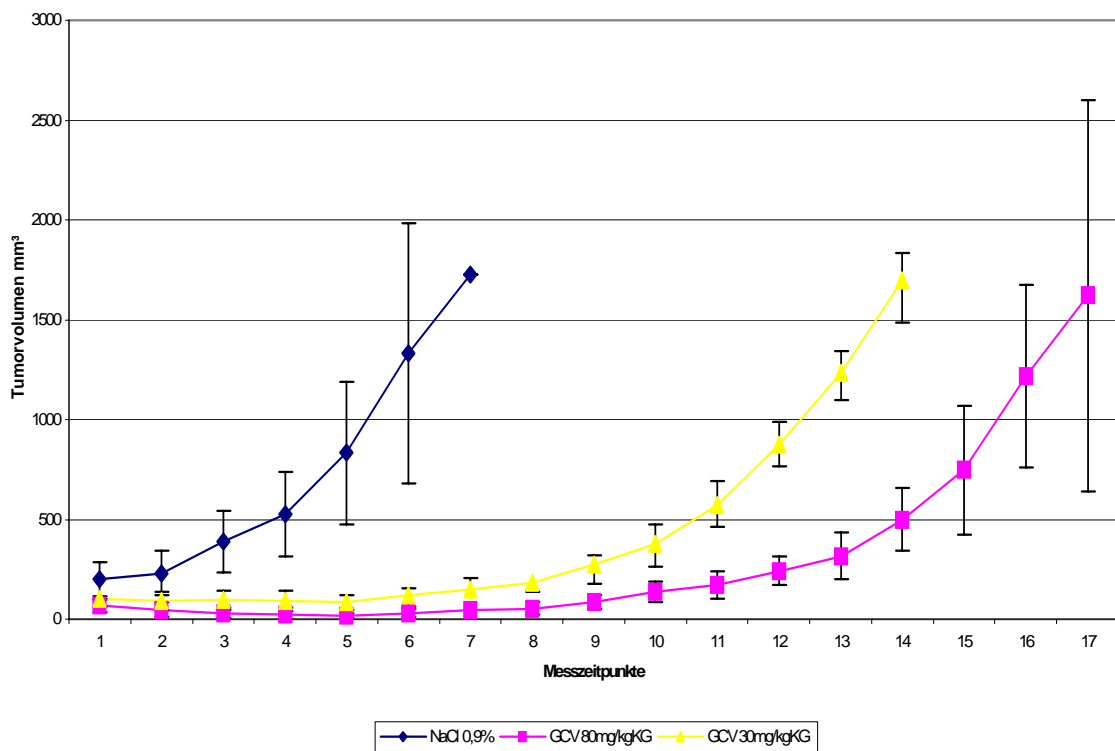


Abbildung 22: Mittelwerte der Volumina der subkutanen 9L-STK-Tumoren behandelt mit GCV und einer NaCl-Kontrolle im zeitlichen Verlauf, die Standardabweichungen sind als Balken dargestellt; erste Messung 6 Tage nach Behandlungsbeginn, Messungen alle zwei Tage.

Dieser proliferationshemmende Effekt des i.p. verabreichten GCV wurde bei Erhöhung der verabreichten Dosis auf 80mg/kgKG noch deutlicher. Ein durchschnittliches Tumolvolumen von über 1000mm³ wurde bei dieser Gruppe von Tieren erst nach 39 Tagen post implantationem erreicht (Abb. 22).

3.2.2. Behandlung mit GCV und BVDU

In einem folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe von BVDU 60mg/kgKG den Effekt der i.p. Gabe von GCV verstärken kann. Unter der Behandlung verstarb kein Tier vorzeitig an medikamentös-toxischen Wirkungen. Ein Tier aus der Gruppe der mit BVDU 60mg/kgKG und GCV 80mg/kgKG behandelten Tiere verstarb an Tag 3 der Behandlung aufgrund eines Applikationsfehlers.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es wie im Vorversuch zu einem sofortigen, stetigen Anstieg der Tumorumfänge. Ein mittleres Tumolvolumen von über 1000mm³ wurde nach 18 Tagen post implantationem erreicht (Abb. 23).

Entsprechend den Ergebnissen des vorangegangenen Tierversuches kam es bei der Behandlung der Tiere mit GCV 80mg/kgKG zu einem deutlich später einsetzenden und langsameren Anstieg der Tumorumfänge, nach 40 Tagen post implantationem betrug das mittlere Tumolvolumen erstmalig über 1000mm³ (Abb. 23).

Die alleinige perorale Verabreichung von BVDU 60mg/kgKG hatte keinen Effekt auf das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier lag das mittlere Tumolvolumen ebenfalls nach 18 Tagen post implantationem erstmalig über 1000mm³ (Abb. 23).

Auch bei kombinierter Gabe von BVDU 60mg/kgKG und GCV 80mg/kg KG zeigte sich keine signifikante Veränderung des Tumorstadiums im Vergleich zur alleinigen Gabe von GCV 80mg/kgKG. Das mittlere Tumolvolumen lag erstmalig nach 38 Tagen post implantationem über 1000mm³ (Abb. 23).

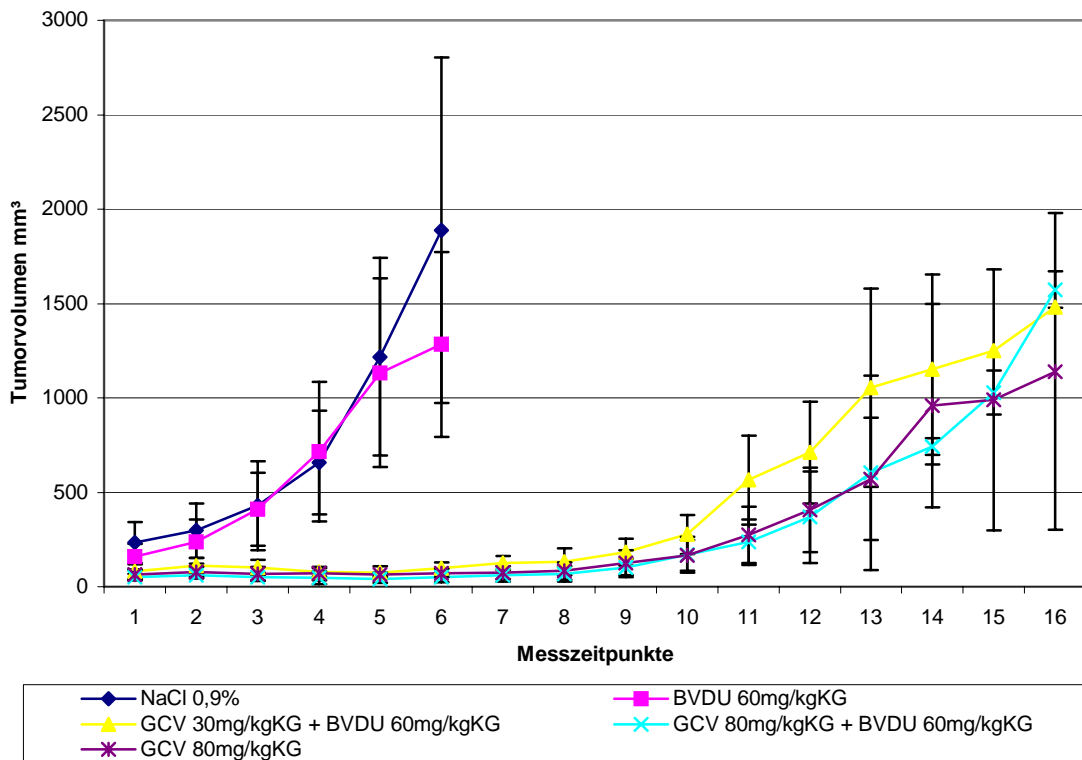


Abbildung 23: Mittelwerte der Volumina der subkutanen 9L-STK-Tumoren behandelt mit GCV, GCV + BVDU und einer NaCl-Kontrolle im zeitlichen Verlauf, die Standardabweichungen sind als Balken dargestellt; erste Messung 6 Tage nach Behandlungsbeginn, Messungen alle zwei Tage.

Bei der Kombination aus BVDU 60mg/kgKG und GCV 30mg/kgKG konnte ein mittleres Tumolvolumen von über 1000mm³ erstmalig nach 34 Tagen post implantationem beobachtet werden. Es fand sich damit keine signifikante Veränderung des Tumorwachstums im Vergleich mit dem Tumorwachstum bei alleiniger Gabe von CGV 30mg/kgKG, wie es im ersten Versuch beobachtet werden konnte (Abb. 23).

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Gabe unterschiedlicher Virustatikakombinationen einen proliferationshemmenden Effekt auf das Wachstum von malignen Gliomzellen hat, in die zuvor durch Transfektion die genetischen Informationen für die Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase eingebracht wurden.

Insgesamt konnte bestätigt werden, daß HSV-tk positive Zellen hochsensitiv gegenüber antiviralen Prodrugs sind, wie es zuvor in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Maleniak et al 2001, Grignet-Debrus et al 2000, Sturtz et al 1997, Rainov et al 1996).

4.1. *In vitro* Versuche

Die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die verwendeten Substanzen GCV, BVDU, BrDU, IDU und TRD auf die untersuchten, die Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase exprimierenden Zelllinien toxisch wirken.

Dabei waren GCV und BVDU über alle untersuchten Zelllinien betrachtet bereits in niedrigeren Dosierungen zytotoxisch als TRD, IDU oder BrDU. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, daß GCV und BVDU besonders effektive Substrate der Herpes Simplex Typ 1-Thymidinkinase sind (Balzarini et al 1993), wobei auch andere Mechanismen eine Rolle spielen mögen.

Darüberhinaus ließ sich auch auf die nicht transfizierte Zelllinie 9L-BTRC ein zytotoxischer Effekt von TRD und, in geringerem Maße, auch von IDU feststellen. Auffallend dabei ist, daß TRD auf die nicht transfizierte 9L-BTRC bereits in niedrigeren Dosen zytotoxisch war als auf die transfizierte 9L-STK Zelllinie.

Die zytotoxische Wirkung von TRD auch auf HSV-tk negative Zellen ist bereits oft beobachtet worden. TRD besitzt nur geringe strukturelle Unterschiede zu Thymidin und wird nicht nur durch die virale sondern auch die zelluläre

Thymidinkinase phosphoryliert und anschließend in die DNS auch nicht-transfizierter Zellen eingebaut (Temminck et al 2005, Wigdahl und Parkhurst 1981). Dies erklärt auch die myelosuppressiven, mutagenen und teratogenen Effekte, die nach systemischer TRD-Gabe beim Menschen beobachtet worden sind (de Clerq 1996).

Im Gegensatz zu den übrigen verwendeten Prodrugs wird IDU nicht nur durch die virale, sondern auch durch die zelluläre Thymidinkinase zum Monophosphat phosphoryliert (Schuerman et al 2003). Da die virale Thymidinkinase jedoch eine breitere Substratspezifität besitzt als die zelluläre (Spadari et al 1992), erfolgt die Phosphorylierung vorwiegend über die virale Thymidinkinase und der zytotoxische Effekt ist hauptsächlich in HSV-tk positiven Zellen zu finden (Schuerman et al 2003).

Die Tatsache, daß TRD auf die transfizierte Zelllinie 9L-STK weniger zyotoxisch war, liegt möglicherweise an einer erhöhten Aktivität der Thymidin-Phosphorylase in der transfizierten Zelllinie, wobei die Enzymaktivität im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Ziel einer kombinierten Behandlung mit verschiedenen Prodrugs ist das Ausnutzen möglicher wirkungsverstärkender Effekte, so daß durch eine jeweils niedrigere Dosis der Einzelsubstanzen auch die Nebenwirkungen reduziert werden können.

Nach den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen sind die Kombinationen aus GCV/TRD und TRD/BVDU besonders zur Behandlung HSV-tk transfizierter Zellen geeignet, denn Wirkungsverstärkungen waren bei diesen Prodrug-Kombinationen bei der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien zu beobachten: Die Kombination von BVDU und TRD führte zu einer Wirkungsverstärkung bei acht von neun untersuchten Zelllinien. Die Kombination von GCV und BVDU führte zu Wirkungsverstärkungen bei sechs von neun untersuchten Zelllinien.

Eine wirkungsverstärkende Interaktion zweier Prodrugs ist dann zu erwarten, wenn diese ihre zytotoxische Wirkung über unterschiedliche Mechanismen

entfalten. Der Effekt, den bei kombinierter Behandlung parallel ablaufende, mechanistisch unterschiedliche Einwirkungen auf den Zellteilungsmechanismus haben, ist dann so groß, daß die zellulären Kompensationsversuche zu einem höheren Prozentsatz scheitern als nach alleiniger Gabe einer Prodrug mit der Folge, daß vermehrt Zellen apoptotisch werden.

Erklärt werden kann die zytotoxische Wirkung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Prodrugs auf die transfizierten Zelllinien zumindest dadurch, daß diese Substanzen nach Phosphorylierung durch die virale Thymidinkinase zu Monophosphaten und durch weitere Phosphorylierung durch die virale und die zelluläre Thymidinkinase zu Triphosphaten als Antimetabolite in die DNS inkorporiert werden, so daß der DNS-Strang als Matrize nicht mehr funktionsfähig ist (Lüllmann und Mohr 1999).

Darüberhinaus ist bekannt, daß GCV seine zytotoxische Wirkung wenigstens über zwei unterschiedliche Mechanismen entfaltet: erstens, nach Phosphorylierung zum jeweiligen Triphosphat durch Einbau in die zelluläre DNS mit nachfolgenden Strangabbrüchen sowie zweitens, durch Hemmung der viralen und zellulären DNS-Polymerase (de Clerq 1997, Faulds und Heel 1990, Reardon 1989, Mar et al 1985).

Die Hemmung der DNS-Polymerase hat zur Folge, daß die zelluläre DNS Reparatur, z.B. nach Einbau falscher DNS-Bausteine, nicht suffizient ist, was den Zelltod nach sich ziehen kann.

Das durch die virale Thymidinkinase aktivierte BVDU greift ebenfalls auf unterschiedlichen Wegen in den zellulären Regelkreislauf ein: BVDU-MP hemmt die zelluläre Thymidilatsynthase und BVDU-TP wird in die DNS als Antimetabolit inkorporiert (Wildner et al 1999, Hamel et al 2001, Balzarini et al 1987, Balzarini et al 1993, Shigeta et al 1985).

Die Thymidilatsynthase ist das für die Thyminnukleotid-Synthese verantwortliche zelluläre Enzym, welches die Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat zu Thymidinmonophosphat katalysiert (Löffler 1997).

Neben BVDU kann aber auch TRD die zelluläre Thymidilatsynthese hemmen, nachdem es durch die virale, aber auch durch die zelluläre Thymidinkinase zum Monophosphat phosphoryliert worden ist. TRD-MP bindet kovalent an die Thymidilatsynthese und hemmt dadurch deren Aktivität (Temminck et al 2005).

Durch diese unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen kann die Wirkungsverstärkung, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit insbesondere bei Kombination der Prodrugs GCV, TRD und BVDU gesehen werden konnte, gut erklärt werden.

Unklar ist bislang allerdings, welcher der Mechanismen für die zytotoxische Wirkung von BVDU verantwortlich ist. Einerseits soll die Hemmung der Thymidilatsynthese der entscheidende BVDU-Effekt sein (Balzarini et al 1987), andererseits hemmt BVDU die Thymidilatsynthese, auch ohne daß es zu zytotoxischen Effekten kommt (Hamel et al 2001, Wildner et al 1999) . In einer Studie konnte zudem keine Beziehung zwischen den zytotoxischen Dosen und den die Thymidilatsynthese hemmenden Dosen gesehen werden (Hamel et al 2001).

Wenn die zytotoxische Wirkung von BVDU und auch TRD auf der Hemmung der Thymidilatsynthese beruhte und die Hemmung der Thymidilatsynthese der Grund für die Wirkungsverstärkung von GCV wäre, dann müssten Wirkungsverstärkungen, die bei der Kombination von GCV und BVDU gesehen werden, auch bei der Kombination von GCV und TRD zu beobachten sein.

Dies ist vorliegend jedoch nicht bei allen Zelllinien der Fall. Obwohl die Kombination aus GCV und BVDU zu einer Wirkungsverstärkung bei der PA317 und der U87-STK Zelllinie geführt hat (Hamel et al 2001), war bei kombinierter Behandlung dieser Zelllinien mit GCV und TRD keine Prodrug-Interaktion zu beobachten. Analog hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit bei der Kombination aus GCV und TRD eine Wirkungsverstärkung auf die Zelllinien WiDR-STK und HCT116-STK beobachtet werden, was bei der Kombination aus GCV und BVDU nicht der Fall war (Hamel et al 2001).

Demzufolge scheint, auch wenn BVDU, ebenso wie TRD, die Thymidilatsynthese hemmt, dies nicht der entscheidende Effekt für die Wirkung von BVDU zu sein. Letztendlich bleibt aber der Wirkungsmechanismus unklar.

Offensichtlich anders als bei den zuvor genannten Prodrug-Kombinationen verhielt es sich bei der Interaktion zwischen GCV und den beiden halogenierteren Desoxyribosiden IDU und BrDU.

Bei der Kombination von GCV und IDU kam es bei keiner der untersuchten Zelllinien zu einer Wirkungsverstärkung, sondern bei drei Zelllinien konnte sogar eine Wirkungsabschwächung beobachtet werden. Die Kombination von GCV und BrDU führte nur bei einer Zelllinie zu einer Wirkungsverstärkung und bei einer Zelllinie zu einer Wirkungsabschwächung.

Die strukturelle Verwandtschaft dieser beiden Prodrugs führte wahrscheinlich zu diesen ähnlichen Ergebnissen bei kombinierter Behandlung mit GCV. Sowohl IDU als auch BrDU können anstelle des Thymidins als Substrat der DNS-Polymerase I dienen und werden, ebenso wie GCV, als falscher Baustein in die DNS inkorporiert (Löffler 1997). Darüberhinaus dienen diese Substanzen sowohl der zellulären als auch der viralen Thymidinkinase als Substrate, mit einer höheren Affinität zur viralen Thymidinkinase (Spadari et al 1995). Sterische Effekte könnten der Grund für die leicht bessere Wirksamkeit von BrDU gegenüber IDU sein.

Zu erklären ist die Beobachtung, daß es bei den Kombinationen aus GCV und BrDU (mit Ausnahme der 9L-STK Zelllinie) sowie aus GCV und IDU keine Wirkungsverstärkungen gegeben hat, dadurch, daß über additive Effekte hinaus keine Wirkungsverstärkung zu erwarten ist, wenn zwei Prodrugs um dasselbe Enzym konkurrieren und sich gegenseitig kompetitiv hemmen.

Dadurch ist aber nicht erklärt, warum die Kombination GCV/BrDU bei der SF295-STK Zelllinie und die Kombination GCV/IDU bei den Zelllinien SF295-STK, C6-STK und U87-STK nicht nur zu keiner Wirkungsverstärkung, sondern sogar zu einer Wirkungsabschwächung von GCV geführt hat.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die hauptsächliche zytotoxische Wirkung von IDU und BrDU auf dem direkten Einbau dieser Substanzen in die zelluläre DNA resultiert, und diese beiden Prodrugs der Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase nicht nur als Substrat dienen, sondern das Enzym selbst kompetitiv hemmen können. Hohe Dosen GCV würden dann die inhibitorische Wirkung ihrerseits überwinden. Dieser Effekt konnte im Rahmen der Versuche auch beobachtet werden.

4.2. *In vivo* Versuche

Da es offenbar geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, die das Wachstum xenotransplantierte Tumore im Mausmodell beeinflussen können (Vincent und Nicholls 1967, Singh et al 2005), und da ausgeschlossen werden sollte, daß darüber hinaus mögliche geschlechts- oder altersspezifische Unterschiede, die Einfluß auf die Wirksamkeit der verabreichten Medikamente nehmen, die Aussagekraft der Ergebnisse der Tierversuche mindern, entschied man sich zur Verwendung ausschließlich weiblicher Tiere einer Altersgruppe. Es wurden junge Tiere verwendet, da Xenotransplantate bei älteren nu/nu-Nacktmäusen möglicherweise aufgrund endogen erhöhter IL-2 Produktion nicht immer sicher zu soliden Tumoren wachsen (Bubenik et al 1992).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die VDEPT auch *in vivo* ein geeignetes Instrument der Tumorthherapie sein kann. In beiden durchgeführten Tierexperimenten war das Tumorwachstum bei den mit GCV behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe dosisabhängig deutlich verzögert. Die Behandlung mit GCV führte verglichen mit den unbehandelten Tieren in beiden Versuchen zu einer Verdoppelung der Überlebenszeit.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den bisherigen Forschungsergebnissen (Culver et al 1992, Xu et al 1997, Grignet-Debrus et al 2000). Eine Effektivität von GCV im Rahmen der VDEPT konnte *in vivo* zudem ebenfalls in einem intracerebralen Tumormodell mit Gliomzellen nachgewiesen werden (Mizuno et al 1998).

Eine solche antitumoröse Wirkung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der alleinigen Gabe von BVDU *in vivo* nicht beobachtet werden. Auch konnte durch zusätzliche Gabe von BVDU das Tumorwachstum im Vergleich zur mit GCV behandelten Gruppe nicht weiter verlangsamt werden. Insofern konnte die Arbeitshypothese, daß sich die Toxizität von GCV durch zusätzliche Gabe von BVDU auch *in vivo* steigern lässt, nicht bewiesen werden.

Mögliche Ursachen für die fehlende *in vivo* Wirksamkeit von BVDU in der vorliegenden Arbeit könnten einerseits in einer zu niedrigen Dosierung und andererseits in der Applikationsform liegen, denn Grignet-Debrus et al ist es erfolgreich gelungen, subkutane 9L-STK Tumoren in athymischen Mäusen in ihrem Wachstum durch Behandlung mit BVDU zu hemmen. In dieser Untersuchung konnte ein zytotoxischer Effekt von BVDU gesehen werden, der allerdings unter dem Effekt von GCV auf Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase-positive Tumorzellen liegt (Grignet-Debrus et al 2000).

Die niedrigere Selektivität von BVDU für die Herpes Simplex Virus Typ 1-Thymidinkinase könnte höhere Dosierungen vonnöten machen. Grignet-Debrus et al applizierten nicht 60 mg/kgKG sondern 80 mg/kgKG. Es ist zudem möglich, daß die orale Applikation von BVDU die Bioverfügbarkeit reduziert. Grignet-Debrus et al applizierten BVDU über intraperitoneale Injektionen. Schließlich besteht noch die Möglichkeit, daß das Lösen des BVDU-Trockenpulvers in Olivenöl einen negativen Einfluß auf die Resorption des BVDU hatte.

Prinzipiell aber ist BVDU beim Menschen auch nach oraler Gabe gegen das Herpes Simplex Virus Typ 1 wirksam (Field und de Clerq 1981). Besser wirksam ist BVDU aber gegen das Varizella Zoster Virus. BVDU ist bereits zur oralen Therapie des Herpes Zoster beim Menschen zugelassen (Brivudin[®]). In mehreren klinischen Studien konnte hier eine Wirksamkeit nach oraler Gabe gezeigt werden (Wutzler et al 1995, Wassilew et al 2003, Wassilew et al 2005).

Allerdings konnten auch Grignet-Debrus et al keine *in vivo*-Wirksamkeit für BVDU auf Varizella Zoster Virus-Thymidinkinase-positive Tumorzellen feststellen, was insofern überrascht, als daß BVDU eine höhere Spezifität für

diese Thymidinkinase besitzt als für die des Herpes Simplex Virus Typ 1 (Andrei et al 1995) und eine *in vitro*-Wirksamkeit von BVDU auf Varizella Zoster Virus-Thymidinkinase-positive Tumorzellen besteht (Degrève et al 1997).

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch andere Arbeitsgruppen, die BVDU zur Behandlung des Herpes Simplex Virus Typ 1 untersuchten. Trotz einer nachgewiesenen, hohen *in vitro*-Wirksamkeit blieb die *in vivo* Anwendung im Mausmodell, unabhängig von der Applikationsform (oral/i.p.) ohne Effekt (Field et al 1984, Wutzler et al 1997).

4.3. Ausblick

Sollten die vorbeschriebenen Schwierigkeiten hinsichtlich der Applikationsform bei der VDEPT überwunden werden, dann könnten in Zukunft auch pharmakologische Optimierungsstrategien, z.B. durch Prodrug-Kombinationstherapien, von Bedeutung sein. Nach den *in vitro* Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheinen diese durchaus möglich.

Ein noch zu überwindendes Problem bliebe aber das im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete, variable Ansprechen der Zelllinien auf die Prodrug-Kombinationen sowie die hier nicht nachgewiesene Wirksamkeit von BVDU *in vivo*. Dieses unterschiedliche Ansprechen spiegelt nur einen Teil der Komplexität und Heterogenität der malignen Gliome wider, und ein variables Ansprechen der Tumoren dürfte sicherlich auch in klinischen Studien zu erwarten sein.

Die widersprüchlichen Ergebnisse betreffend den Wirkmechanismus und die Wirksamkeit von BVDU auf das Herpes Simplex Virus Typ 1 bzw. HSV-tk positive Zellen und die Tatsache, daß die Kombination von GCV und den halogenierten Desoxyribosen zu einer Wirkungsabschwächung von GCV auf HSV-tk positive Zellen geführt hat, sollten Anlaß zu weiterer Forschungsarbeit geben.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit verschiedener antiviraler Substanzen in kombinierter Gabe auf gentechnisch veränderte Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen an neun Zelllinien zeigen, daß die Kombination aus GCV und TRD sowie aus TRD und BVDU zu einer gegenüber der Einzelgabe verstärkten Hemmung der Tumorzellproliferation bei der Mehrzahl der behandelten Zelllinien führt. Diese verstärkte Hemmung konnte bei kombinierter Behandlung mit GCV und BrDU bzw. GCV und IDU nicht beobachtet werden.

In den *in vivo*-Untersuchungen konnte zwar eine proliferationshemmende Wirkung von GCV auf die Tumoren festgestellt werden, dieser Effekt ließ sich durch zusätzliche Gabe von BVDU nicht weiter steigern. BVDU selbst blieb *in vivo* ohne messbare antiproliferative Effekte.

Die Feststellungen, daß nicht alle Zelllinien in gleicher Weise auf die Behandlung reagieren und daß sich *in vivo* keine Wirkungsverstärkung einer *in vitro* wirkungsverstärkenden Substanzkombination beobachten ließ, sprechen dafür, daß bei Anwendung im Rahmen klinischer Studien wohl ähnliche unterschiedliche Effekte bei den Patienten gesehen werden könnten.

Weitere Studien hinsichtlich des komplexen Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene erscheinen daher wünschenswert.

6. Literaturverzeichnis

Andrei G, Snoeck R, Reymen D, Liesnard C, Goubau P, Desmyter J, de Clerq E (1995) Comparative activity of selected antiviral compounds against clinical isolates of varicella-zoster virus. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 14: 318-328

Balzarini J, De Clerq E, Verbruggen A, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T (1987) Thymidylate synthase is the principal target enzyme for the cytostatic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine against murine mammary carcinoma (FM3A) cells transformed with the herpes simplex virus type 1 or type 2 thymidine kinase gene. *Mol Pharmacol* 32 : 410-416

Balzarini J, Bohman C, De Clerq E (1993) Differential mechanism of cytostatic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxy-methyl)guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 or type 2. *J Biol Chem* 268: 6332-6337

Bennett AH, Godlee RJ (1884) Excision of a tumour from the brain. *Lancet* 2: 1090

Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995) The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15: 308-327.

Bubenik J, Kieler J, Jandlova T, Simova J (1992) Age-related decrease in transplantability of human tumours in nu/nu mice. *Anticancer Res* 12: 1695-1698

Cairncross G, Macdonald D, Ludwig S, Lee D, Cascino T, Bruckner J, Fulton D, Dropcho E, Steward D, Schold C (1994) Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. *J Clin Oncol* 12: 2013-2021

Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossmann RG, Woo SL (1994) Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3054-3957

Combs SE, Gutwein S, Schulz-Ertner D, van Kampen M, Thilmann C, Edler L, Wannemacher MM, Debus J (2005) Temozolomide combined with irradiation as postoperative treatment of primary glioblastoma multiforme phase I/II study. *Strahlenther Onkol* 181: 372-377.

Cordera S, Bottachi E, D'Alessandro G, Machado D, De Gonda F, Corso G (2002) Epidemiology of primary intracranial tumours in NW Italy, a population based study: stable incidence in the last two decades. *J Neurol* 249: 281-284

Counsell CE, Collie DA, Grant R (1996) Incidence of intracranial tumours in the Lothian region of Scotland, 1989-1990. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61: 143-150

Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552

de Clerq E (1995) Trends in the development of new antiviral agents for the chemotherapy of infections caused by herpesviruses and retroviruses. *Rev Med Virol* 5: 149-164

de Clerq E (1996) Chemotherapy of viral infections. In: *Medical Microbiology*, 4th Ed., Chapter 52

de Clerq E (1997) In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin Microbiol Rev* 10: 674-693

Degrève B, Andrei G, Izquierdo M, Piette J, Morin K, Knaus FE, Wiebe LI, Basrah I, Walker RT, de Clerq E, Balzarini J (1997) Varizella-zoster virus thymidine kinase gene and antiherpetic pyrimidine nucleoside analogues in a combined gene/chemotherapy treatment for cancer. *Gene Ther* 4: 1107-1114

Dethlefsen LA, Prewitt JM, Mendelsohn ML (1968) Analysis of tumor growth curves. *J Natl Cancer Inst* 40: 389-405

Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5716-5720

Faulds D, Heel RC (1990) Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* 39: 597-638

Field HJ, de Clerq E (1981) Effects of oral treatment with acyclovir and bromovinyldeoxyuridine on the establishment of maintenance of latent herpes simplex virus infection in mice. *J Gen Virol* 56: 259-265

Field HJ, Anderson JR, Efstathiou S (1984) A quantitative study of the effects of several nucleoside analogues on established herpes encephalitis in mice. *J Gen Virol* 65: 707-719

Fine HA, Dear KBG, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP (1993) Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 71: 2585-2597

Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB (1978) Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *J Biol Chem* 253: 8721-8727

Germano IM, Fable J, Gultekin SH, Silvers A (2003) Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 65: 279-289

Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M (2003) Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21: 1624-1636

Gil-Salu JL, Roman P, Benitez E, Maestro E, Perez-Requena J, Lopez-Escobar M (2004) Survival Analysis following the addition of temozolomide to surgery and radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Neurocirugia* 15: 144-150

Greenberg M (2001) Astrocytoma. In: *Handbook of Neurosurgery*, 5th Ed. Thieme, New York Stuttgart (S. 393-400)

Grignet-Debrus C, Cool V, Baudson N, Degreve B, Balzarini J, de Leval L, Debrus S, Velu T, Calberg-Bacq C-M (2000) Comparative in vitro and in vivo cytotoxic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and its arabinosyl derivate, (E)-5-(2-bromovinyl)-1-β-D-arabinofuranosyluracil (BVaraU), against tumor cells expressing either the Varizella zoster or the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Cancer Gene Ther* 7: 215-223

Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K (2005) Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidinkinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg* 102: 328-335

Hamel W, Zirkel D, Mehdorn M, Westphal M, Israel MA (2001) (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine potentiates ganciclovir-mediated cytotoxicity on herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing cells. *Cancer Gene Ther* 8: 388-396

Hess KR (1999) Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neuro-Oncol* 42: 227-231

James CD, Carlom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48: 5546-5551

Kaufman HE (1962) Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herplex simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 102:533-543

Kaufman HE, Heidelberger C (1964) Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 145: 585-586)

Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, Marro B, Boyer O, Mokhtari K, Diquet B, Salzmann JB, Philippon J (1998) A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase 'suicide' gene therapy for recurrent malignant glioblastoma. *Hum Gene Ther* 9: 2595-2604

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The New WHO Classification of Brain Tumors. *Brain Pathol* 3: 255-268

Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD (1997) Tumoren des Nervensystems. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.) *Pathologie. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore* (S. 300-313)

Kokoris M, Black M (2002) Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 thymidine kinase mutants engineered for improved ganciclovir or acyclovir activity. *Prot Science* 11: 2267-2272

Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M (2003) Radiochemotherapy of malignant glioma in adults. Clinical Experiences. *Strahlenther Onkol* 179: 219-232

Krauseneck P, Müller B (1995) Chemotherapy of malignant brain tumours. In: Thomas DGT und Graham DI (Hrsg.) *Malignant Brain Tumours Springer Berlin Heidelberg New York* (S. 329-353)

Lacroix M, Abi-Said D, Fourny DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme : prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198

Leibel SD, Sheline GE (1987) Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J Neurosurg* 66: 1-22

Levin VA, Wara WM, Daris RL, Vestnys P, Resser KJ, Yatsko K, Nutik S, Gutin PH, Wilson CB (1985) Phase III comparison of BCNU and the combination of procarbazine, CCNU, and vincristine administered after radiotherapy with hydroxyurea for malignant gliomas *J Neurosurg* 63: 218-223

Löffler G (1997) Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine. In: *Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York* (S. 582-598)

Lönn S, Klaboe L, Hall P, Mathiesen T, Auvinen A, Christensen HC, Johansen C, Salminen T, Tynes T, Feychting M (2003) Incidence Trends of Adult Primary Intracerebral Tumors in four Nordic Countries. *Int J Cancer* 108: 450-455

Lonser RR, Walbridge S, Vortmeyer AO, Pack SD, Nguyen TT, Gogate N, Olson JJ, Akbasak A, Bobo RH, Goffmann T, Zhuang Z, Oldfield EH (2003) Tumor Young Investigator Award: induction of glioblastoma multiforme in primates after fractionated whole-brain irradiation in the therapeutic dose range. *Clin Neurosurg* 50: 350-373

Louis DN, von Deimling A (1995) Hereditary tumor syndromes of the nervous system: overview and rare syndromes. *Brain Pathol* 2: 145-151

Lüllmann H, Mohr K (1999) Antivirale Arzneistoffe. In: *Pharmakologie und Toxikologie, 14. Auflage. Thieme Stuttgart New York* (S. 441-451)

Mahaley MS Jr, Mettlin C, Natarajan N, Laws ER Jr, Peace BB (1989) National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J Neurosurg* 71: 826-836

Maleniak TC, Darling JL, Lowenstein PR, Castro MG (2001) Adenovirus-mediated expression of HSV1-TK or Fas ligand induces cell death in primary human glioma-derived cell cultures that are resistant to the chemotherapeutic agent CCNU. *Cancer Gene Ther* 8: 589-598

Mar EC, Chiou JF, Cheng YC, Huang ES (1985) Inhibition of cellular DNA polymerase alpha and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin. *J Virol* 53: 776-780

Markham A, Faulds D (1994) Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 48: 455-484

Matthews T, Boehme R (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Inf Dis* 10: 490-494

Maudgal PC, de Clerq E (1991) Bromovinyldeoxyuridine treatment of herpetic keratitis clinically resistant to other antiviral agents. *Curr Eye Res* 10: 193-199

Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzman G (1989) Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration. *Jpn J Cancer Res* 89: 76-80

Moolten FL (1986) Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 46: 5276-5281

Muacevic A, Kreth FW (2003) Quality-adjusted survival after tumor resection and/or radiation therapy for elderly patients with glioblastoma multiforme. *J Neurol* 250: 561-568

Nieder C (2002) Treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 20:3179-3180

Oh J, Henry RG, Pirzkall A, Lu Y, Catalaa I, Cang S, Dillon WP, Nelson SJ (2004) Survival analysis in patients with glioblastoma multiforme: predictive value of choline-to-N-acetylaspartate index, apparent diffusion coefficient, and relative cerebral blood volume. *J Magn Reson Imaging* 19: 546-554

Poeck K, Hacke W (2001) Tumorkrankheiten des Nervensystems. In: *Neurologie, 11. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York* (S. 299-346)

Postma TJ, van Groeningen CJ, Witjes RJGM, Weerts JGE, Kralendonk JH, Heimans JJ (1998) Neurotoxicity of combination therapy with procarbazine, CCNU and vincristine (PCV) for recurrent glioma. *J Neuro-Oncol* 38: 69-75

Prados MD, Levin V (2000) Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 27 (3 Suppl 6): 1-10

Prados MD, Scott CB, Rotman M, Rubin P, Murray K, Sause W, Asbell S, Comis R, Curran W, Nelson J, Davis RL, Levin VA, Lamborn K, Philips TL (1998) Influence of bromodeoxyuridine radiosensitization on malignant glioma patient survival: a retrospective comparison of survival data from the Northern California Oncology Group (NCOG) and Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40: 653-659

Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, de Vroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH (1997) Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3: 1354-1361

Rainov NG, Kramm CM, Aboody-Guterman K, Chase M, Ueki K, Louis DN, Harsch IV GR, Chiocca EA Breakefield XO (1996) Retrovirus-mediated gene therapy of experimental brain neoplasms using the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir paradigm. *Cancer Gene Ther* 3: 99-106

Rainov NG (2000) A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* 11: 2389-2401

Reardon JE (1989) Herpes simplex virus type 1 and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate analogues. *J Biol Chem* 264: 19039-19044

Schaeffer HJ, Beauchamp L, de Miranda P, Elion GB, Bauer DJ, Collins P (1978) 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272: 583-585

Schlegel U, Weller M, Westphal M (2003) Primäre Tumoren des Gehirns und seiner Häute. Gliome. In: *Neuronkologie* 2. Auflage. Thieme, Stuttgart New York (S. 182-219)

Schuerman G, van Hecke K, van Meervelt L (2003) Exploration of the influence of 5-iodo-2'-deoxyuridine incorporation on the structure of d[CACG(IDU)G]. *Acta Cryst D* 59: 1525-1528

Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, Sorensen AG, Barbier N (1999) A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Hum Gene Ther* 10: 2325-2335

Shapiro WR (1999) Current therapy for brain tumors: back to the future. *Arch Neurol* 56: 429-432

Shapiro WR, Shapiro JR (1998) Biology and treatment of malignant glioma. *Oncology* 12: 233-240

Shigeta S, Yokata T, de Clerq E (1985) Therapy of varicella zoster virus infections: mechanism of action of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antiviral Res* 51: 35-44

Singh MP, Rai AK, Sing SM (2005) Gender dimorphism in the progressive in vivo growth of a T cell lymphoma: involvement of cytokines and gonadal hormones. *J Reprod Immunol* 65:17-32

Smitt PS, Driesse M, Wolbers J, Kros M, Avezaat C (2003) Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Mol Ther* 7: 851-858

Spadari S, Maga G, Focher F, Ciarrocchi G, Manservigi R, Arcamone F, Capobianco M, Carcuro A, Colonna F, Iotti S (1992) L-thymidine phosphorylated by herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and inhibits viral growth. *J Med Chem* 35: 4214-4240

Sterman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, Recio A, Knox L, Wilson JM, Albelda SM, Kaiser LR (1998) Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a Phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 9: 1083-1092

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996

Sturtz FG, Waddell K, Shulok J, Chen X, Caruso M, Sanson M, Snodgrass HR, Platika D (1997) Variable efficiency of the thymidine kinase/ganciclovir system in human glioblastoma cell lines: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 8 (16): 1945-53

VandenBerg SR, Hessler RB, Lopes MBS (1995) . Current Concepts of the Histopathological Classification of Tumours of the Central Nervous System. In: Thomas DGT, Graham DI (Hrsg.) *Malignant Brain Tumors, Springer Berlin Heidelberg New York* (S. 29-108)

Vincent PC, Nicholls A (1967) Comparison of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. *Cancer Res* 27: 1058-1065

Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic astrocytomas – a cooperative clinical trial *J Neurosurg* 49: 333-343

Wassilew SW, Wutzler P; Brivudin Herpes Zoster Study Group (2003) Oral brivudin in comparison with acyclovir for herpes zoster: a survey study on postherpetic neuralgia. *Antiviral Res* 59: 57-60

Wassilew S; Collaborative Brivudin PHN Study Group (2005) Brivudin compared with famciclovir in the treatment of herpes zoster: effect in acute disease and chronic pain in immunocompetent patients. A randomised, double-blind, multinational study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19: 47-55

Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jaaskelainen J, Ram Z (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncol* 5: 79-88

Wigdahl BI, Parkhurst JR (1981) Inhibition of Mouse LM Cell Replication by Trifluorothymidine: Role of Cytosolic Deoxythymidine Kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 19: 881-890

Wildner O, Blaese RM, Candotti F (1999) Enzyme prodrug gene therapy: synergistic use of the herpes simplex virus – cellular thymidine kinase/ganciclovir system and thymidylate synthase inhibitors for the treatment of colon cancer. *Cancer Res* 59: 5233-5238

Wutzler P, de Clerq E, Wutke K, Färber I (1995) Oral brivudin vs. intravenous acyclovir in the treatment of severe herpes zoster in cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 471-476

Wutzler P, Ulbricht A, Farber I (1997) Antiviral efficacies of famciclovir, valaciclovir, and brivudin in disseminated herpes simplex virus type 1 infection in mice. *Intervirology* 40: 15-21

Xu C, Zhang X, Jin Z (1997) Inhibitory effect of ganciclovir on the HSV1-tk-positive subcutaneous tumors transplanted with human ovarian cancer in nude mice. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 32: 709-711

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Westphal für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Experimente in seinem Labor durchzuführen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. med. W. Hamel für seine stets gewährte Hilfestellung während der Durchführung der Versuche und beim Schreiben dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die Technik und den Umgang mit Zellkulturen, insbesondere Frau S. Zapf.

Herrn Dr. med. vet. J. Dimigen danke ich für die Möglichkeit, Versuche an Tieren durchzuführen. Für die Einarbeitung und Hilfestellung beim Umgang mit den Tieren danke ich Frau R. Reusch.

Frau PD Dr. med. K. Lamszus danke ich für die Anfertigung des Tumorschnittes, Herrn S. Freist danke ich für die Erstellung der Fotos.

Schließlich danke ich meinen Eltern dafür, mich durch ihre immerwährende, liebevolle Unterstützung, die mich durch Schulzeit und Studium bis heute begleitet hat, in die Lage versetzt zu haben, diese Arbeit aufzunehmen.

Meiner Frau Kerstin danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis sowie dafür, mir mit ihrer Liebe immer Mut und Zuversicht gegeben zu haben, so daß ich diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende bringen konnte. Ohne sie wäre die Arbeit heute nicht fertig. Danke!

Lebenslauf

Name: Christian Alexander Senft
 Geburtstag: 29. Januar 1976
 Geburtsort: Hamburg
 Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schulbildung:

1982 – 1986 Kath. Grundschule Hochallee, Hamburg
 1986 – 1992 St.-Ansgar-Schule, Hamburg
 1992 – 1993 Overland High School, Aurora, Colorado/USA
 1993 – 1996 St.-Ansgar-Schule, Hamburg
 1996 Erwerb der allg. Hochschulreife; Note 1,1

Zivildienst:

1996 – 1997 Abt. für Thorax-, Herz-, Gefäßchirurgie, UKE

Studium:

1997 Beginn des Medizinstudiums, Universität Hamburg
 1999 Ärztliche Vorprüfung
 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 – 2003 Praktisches Jahr
 Wahlfach: Neurochirurgie, UKE
 Chirurgie, AK Harburg
 Innere Medizin, AK Altona
 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Gesamtnote 1,49

Beruf:

seit 1.12.2003 Arzt im Praktikum, Klinik für Neurochirurgie, UKE
 1.10.2004 Approbation als Arzt

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: