



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zum VP22-vermittelten interzellulären Transport
mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) und sezernierter
alkalischer Phosphatase (SEAP) als Reporterproteine**

Autor: Petra Kirsch
Institut / Klinik: Neurochirurgische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. L. Schilling

Bei der Bekämpfung von Glioblastomen sind beim Einsatz der herkömmlichen Behandlungen wie Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie die bislang erreichten Überlebenszeiten der Patienten immer noch sehr gering. Daher wird derzeit intensiv an der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gearbeitet, die auch gentherapeutische Methoden beinhalten. Einer dieser Ansätze beinhaltet die lokale Applikation von genetisch veränderten Zellen, die durch Freisetzung eines Proteins die Tumorzellen in der Umgebung abtöten sollen. Bisher sind die erreichten Effizienzen des Transfers allerdings nicht hoch genug, um einen ausreichenden therapeutischen Effekt auf solide Tumore zu erzielen.

Das interzelluläre Transportprotein VP22 aus Herpes Simplex Virus Typ-1 wurde hier verwendet, um nach Fusion an das pro-apoptotische Bax die Effizienz des Transfers in umliegende nicht transfizierte Zellen zu verbessern. Zur Beobachtung des interzellulären Transports wurde GFP (grün fluoreszierendes Protein) oder SEAP (sezernierte alkalische Phosphatase) eingesetzt. Die Transportfähigkeit und -effizienz der Fusionsproteine konnte mit transient transfizierten COS-1 Zellen in Kokultur-Experimenten mit C6 (transformierte Astrocytenzelllinie der Ratte) und HeLa (humane Zervixkarzinomzelllinie) Tumorzellen als auch mit Nervenzellen einer primären Neuronenkultur nachgewiesen werden. Weiterhin konnte mittels TUNEL-Assays gezeigt werden, dass das Fusionsprotein GFP-VP22-Bax in transfizierten Zellen und in nicht transfizierten C6 und HeLa Empfängerzellen Apoptose *in vitro* auslöst.

In Tierexperimenten wurde zunächst das Verhalten von C6 Zellen, die mit GFP oder dem Fusionsprotein GFP-VP22 transient transfiziert waren, in der Rückenhautkammerpräparationen bei Nacktmäusen untersucht. Mittels intravitraler Fluoreszenz-Mikroskopie konnte das Tumorwachstum durch über drei Wochen anhaltende GFP-Fluoreszenz *in vivo* verfolgt werden, allerdings war keine Differenzierbarkeit zwischen transfizierter Zellen und Empfängerzellen möglich. Nach Versuche konnte an den entnommenen Tumoren mittels indirekter Immunfluoreszenz eine hohe Expression des Fusionsproteins GFP-VP22 und ein Transport in das umliegende Gewebe nachgewiesen werden. Im Kontrolltumoren aus mit GFP transfizierten Zellen war die Expression von GFP deutlich geringer und ausschließlich auf Zellen im Randbereich des Tumors begrenzt. Der Einfluss von Bax auf das Tumorwachstum wurde in subkutan wachsenden Tumoren mit dem Reporterprotein SEAP untersucht. Mit Hilfe einer stabilen SEAP exprimierenden C6 Zelllinie konnte das Tumorwachstum durch wiederholte Bestimmung der SEAP-Aktivität im Serum von Versuchstiere verfolgt werden. Nach Implantation von Zellen, die mit dem Fusionsgen GFP-Bax oder GFP-VP22-Bax transfiziert waren, konnte keine Hemmung des Tumorwachstums im Vergleich zu nicht transfizierten Tumoren nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte ein effizienter VP22-vermittelter Transport von Fusionsproteinen in verschiedene Zellen *in vitro* gezeigt werden, der auch zur Induktion von Apoptose durch Bax führte. Allerdings konnte dieser direkte Apoptose-induzierende Effekt nicht bei Tumoren *in vivo* nachgewiesen werden, möglicherweise infolge einer zu geringen Dosis von interzellulär transportiertem Bax. Zur Klärung dieser Frage und weiterführenden Versuchen ist die hier etablierte C6 Zelllinie mit stabiler Expression von SEAP geeignet zum Nachweis des Tumorwachstums und auch einer eventuellen Tumorregression.