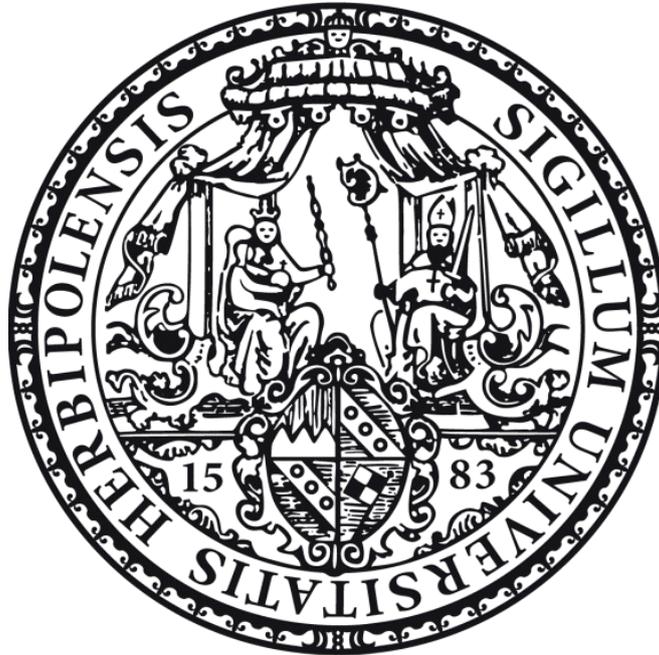


Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



Melanogene rekombinante Vaccinia-Viren als diagnostisches und therapeutisches Agenz zur Tumorbehandlung

Doktorarbeit

vorgelegt von Lorenz Kirscher

aus München

Würzburg, November 2014

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____
Prof. Dr. Engstler

Erstgutachter : _____
Prof. Dr. A. A. Szalay

Zweitgutachter: _____
Prof. Dr. Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Name: Kirscher

Vorname: Lorenz

Straße: Neubergstr. 19

Postleitzahl und Wohnort: 97072 Würzburg

1. ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich diese Thesis selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel benutzt habe.

Würzburg, den

(Lorenz Kirscher)

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung	13
2.1	Krebs	13
2.1.1	Krebsätiologie.....	13
2.1.2	Stand der Krebstherapie	16
2.2	Das Vaccinia-Virus	21
2.2.1	Charakteristika des Vaccinia-Virus	21
2.2.2	Replikationszyklus des Vaccinia-Virus.....	22
2.3	Tomographische Verfahren zur Krebsdiagnose	24
2.3.1	Computertomographie (CT)	25
2.3.2	Single photon emission computed tomography (SPECT).....	25
2.3.3	Positronen-Emission-Tomographie (PET)	26
2.3.4	Magnetresonanztomographie (MRT).....	26
2.3.5	(Multispektrale) optoakustische Tomographie (MSOT)	27
2.4	Melanin.....	28
2.4.1	Unterschiedliche Melaninformen	29
2.4.2	Melanin-Biogenese.....	30
2.5	Ziel dieser Arbeit.....	32
3	Material.....	34
3.1	Chemikalien und Enzyme	34
3.2	Puffer und Lösungen.....	35
3.3	Verwendete Antikörper	38
3.4	Verwendete Kits	39
3.5	Zelllinien und –Kulturmedien	39
3.5.1	Zelllinien	39
3.5.2	Zellkulturmedien	39

3.6	Versuchstiere	40
3.7	Rekombinante Viruskonstrukte	40
3.8	Geräte und sonstige Materialien	41
3.9	Verwendete Software	42
4	Methoden	43
4.1	Zellbiologische Methoden	43
4.1.1	Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien	43
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer	43
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
4.2	Virologische Methoden	44
4.2.1	<i>In vitro</i> Infektion eukaryontischer Zellen mit rVACV	44
4.2.2	Replikationsassay	45
4.2.3	Standard Plaque Assay	45
4.3	Mäuse	46
4.3.1	Implantation der Krebszellen	46
4.3.2	Injektion des rVACV	46
4.3.3	Tumorentnahme	47
4.3.4	Blutentnahme	47
4.3.5	Narkose	48
4.4	Diagnostische Methoden	48
4.4.1	Biomarker-Expressionsanalyse mittels Western Blot	48
4.4.2	MTT-Assay zur Bestimmung der Überlebensrate von eukaryontischen Zellen	49
4.4.3	Durchlusszytometrische Analyse rVACV-infizierter Zellen	50
4.4.4	beta-Glucuronidase Aktivitätsmessung	50
4.4.5	Bestimmung des Melaningehalts	51
4.4.6	Bestimmung der L-DOPA-Umsatzrate	51

4.4.7	Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen.....	51
4.4.8	Magnetresonanztomographie (MRT).....	52
4.4.9	Optoakustische Analyse	52
4.4.10	Elektronenmikroskopische Analysen	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Konstitutiv melanogene rekombinante Vaccinia-Viren (rVACV).....	55
5.1.1	Selektion und Charakterisierung in Zellkultur.....	55
5.1.2	Therapeutische Wirkung melanogener rVACV in Mäusen	69
5.1.3	Diagnostisches Potential melanogener rVACV	71
5.1.4	Diagnostik mit multispektraler optoakustischer Tomographie (MSOT).....	74
5.2	Doxycyclin-induzierbar melanogene rekombinante Vaccinia Viren	75
5.2.1	Charakterisierung in Zellkultur.....	75
5.2.2	Evaluierung im Mausmodell.....	83
5.2.3	Diagnostischer Tumornachweis mittels MSOT	86
5.3	Adjuvante Krebstherapie mittels Kombination aus melanogenen rVACV und NIR-Laser-vermittelten thermaler Ablation	90
6	Diskussion	95
7	Tabellen.....	104
8	Literaturverzeichnis	105
9	Abkürzungsverzeichnis.....	112
10	Publikationsliste	117
11	Lebenslauf	118
12	Danksagung	119

Zusammenfassung

Die gängigen therapeutischen Behandlungsmethoden für die verschiedensten Krebserkrankungen zeigen nach wie vor Mängel bezüglich der Effizienz sowie zahlreiche Nebenwirkungen während und nach der Behandlung. Maßgeblich für diese Defizite ist die teilweise geringe Sensitivität der meisten konventionellen diagnostischen Systeme und damit einhergehend die oftmals zu späte Identifikation entarteter Gewebereiche. Zur Lösung dieser Problematik bieten onkolytische Vaccinia-Viren einen Ansatz, sowohl die Effizienz der Therapie wie auch die Diagnostik zu verbessern. In beiden Fällen sind die Tumorzell-spezifische Vermehrung der Viren und die Möglichkeit entscheidend, die Viren als Vektorsystem zur Expression therapeutischer oder diagnostischer Fremdgenkassetten zu nutzen.

Um ein auf Vaccinia-Virus-basierendes Reportersystem zum diagnostischen Nachweis von Krebszellen mittels Tiefengewebstomographie bereit zu stellen, wurden die für die murine Tyrosinase (mTyr) und das Tyrosinase-Helferprotein 1 (Tyrp1) kodierenden Gene in das Genom eines onkolytischen Vaccinia-Virus inseriert. Die Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melaninsynthese. Bereits die solitäre Expression der Tyrosinase führt in der transformierten Zelle zur Melaninproduktion. Das Tyrosinase-Helferprotein 1 ist an der Prozessierung und Stabilisierung der Tyrosinase beteiligt. Bereits in verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Melanin als Reportermolekül für die Magnetresonanz sowie für die multispektrale optoakustische Tomographie einsetzbar ist. Es wurde deswegen angestrebt, die Kombination aus dem therapeutischen Potential des onkolytischen Vaccinia-Virus und der diagnostischen Anwendung des Melanins als Reporter auszunutzen. Sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten rekombinanten Vaccinia-Viren (rVACV) wurden von der Firma Genelux Corporation zur Verfügung gestellt und in dieser Arbeit hinsichtlich der therapeutischen Effizienz und des diagnostischen Potentials untersucht. In ersten Zellkultur-Versuchen wurde anhand verschiedener konstitutiv melanogener rVACV-Konstrukte festgestellt, dass die Kombination aus dem Vaccinia-Virus-spezifischen *synthetic early/late* Promotor und dem Enzym Tyrosinase (GLV-1h327) bzw. den Enzymen Tyrosinase und Tyrosinase-Helferprotein 1 (GLV-1h324) die höchste Melaninsynthese-Rate zeigte. Anschließend wurde mittels der Bestimmung der spektralen Absorption und der Enzymaktivität der viral kodierten Melanin synthetisierenden Enzyme sowie mikroskopischer Analysen gezeigt, dass es mit diesen auf

Vaccinia-Virus-basierenden melanogenen Reportersystemen möglich ist, die Melaninsynthese in nicht-melanogenen Zellen zu induzieren.

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen in Zellkultur und *ex vivo* konnte gezeigt werden, dass die nach rVACV-Infektion stattfindende Melaninsynthese in den Lysosomen der Wirtszelle abläuft. Eine Analyse der atomaren Zusammensetzung des viral vermittelten Melanins ergab, dass es sich um eine Mischform aus Eu- und Phäomelanin handelt. Dieser Melanin-Mix ähnelte dem Melanin aus Haut und Augen, jedoch lagen an Melanin-gebundene Metallionen in erhöhtem Maß vor.

Replikationsstudien mit melanogenen rVACV in Zellkultur, verglichen mit dem parentalen nicht Melanin produzierenden GLV-1h68, ergaben eine signifikant geringere Replikationsrate und damit einhergehend ein signifikant geringeres Ausmaß onkolytischer Aktivität nach Infektion mit Melanin synthetisierenden Vaccinia-Viren. Tumorwachstumsstudien in Xenotransplantat-tragenden athymischen Mäusen zeigten, dass sämtliche rVACV-behandelten Mäuse 28 Tage nach Virus-Injektion signifikant geringere Tumervolumina aufwiesen, verglichen mit den Tumor-tragenden Mäusen der unbehandelten Kontrollgruppe. Desweiteren wurde eine geringere Tumorregression bei den Tumor-tragenden Mäusen beobachtet, welchen melanogene rVACV injiziert worden waren, verglichen mit GLV-1h68-injizierten Xenotransplantat-tragenden Mäusen. Nach Virus-Infektion gebildetes Melanin lieferte *in vivo* spezifische Signale in Tiefengewebstomographischen Anwendungen, wie der multispektralen optoakustischen Tomographie (MSOT) und der Magnetresonanztomographie (MRT). Somit konnten Vaccinia-Virus-kolonisierte Primärtumor-Bereiche sowie rVACV-infizierte tumoröse Lymphknoten in lebenden A549- bzw. PC3-RFP-Tumor-tragenden athymischen Nacktmäusen tomographisch detektiert werden.

Um der Herabsetzung des therapeutischen Potentials melanogener Vaccinia-Viren entgegenzuwirken, wurde ein weiteres rVACV-Konstrukt hergestellt und für diese Studie zur Verfügung gestellt. Die Expression der murinen Tyrosinase wird in diesem Konstrukt (GLV-1h462) durch das Doxycyclin-induzierbare *tet*-System reguliert. Melanin wird also erst nach Zugabe von Doxycyclin gebildet. Western Blot-Analysen zeigten in der Tat, dass *tet*-System-regulierte Virus-kodierte Gene ausschließlich bei Doxycyclingabe exprimiert werden. Im Gegensatz dazu, wurden nicht *tet*-System-regulierte rVACV-kodierte Gene Doxycyclin-unabhängig exprimiert. Das *tet*-System ist demzufolge in diesen

rVACV-Konstrukten funktionsfähig. In einem weiteren Experiment konnte eine Doxycyclin-Konzentration von 0,05 µg/ml als Melaninsynthese-induzierend ermittelt werden. Außerdem wurde anhand eines L-DOPA-Assays die Funktionsfähigkeit der nach Induktion gebildeten Tyrosinase nachgewiesen. Desweiteren konnte in Zellkultur ein signifikant erhöhtes onkolytisches Potential der nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-Viren, verglichen mit den zur Melaninsynthese führenden Vaccinia-Viren mittels Größenmessungen viraler Plaques, Replikations- und MTT-Assays nachgewiesen werden. Dieses erhöhte therapeutische Potential nicht-induzierter nicht-melanogener GLV-1h462 Viren konnte ebenfalls *in vivo* in A549- und PANC-1-Tumor-tragenden Mäusen bestätigt werden. In beiden Karzinomtypen konnte eine verstärkte Tumorregression der nicht-induzierten, nicht Melanin produzierenden GLV-1h462-injizierten Versuchstiere ermittelt werden, verglichen mit Doxycyclin-induzierten Melanin synthetisierenden GLV-1h462-kolonisierten Tumoren. Weiterhin konnte ein höherer beta-Glukuronidasespiegel im Blutserum bei GLV-1h462-injizierten Tumor-tragender Mäuse im nicht-induzierten Zustande beider Krebstypen beobachtet werden. Da beta-Glukuronidase als Marker für die virale Replikation sowie für das Ausmaß der Onkolyse kolonisierter Tumorzellen dient, ist dieser erhöhte beta-Glukuronidasespiegel ein Indiz für eine erhöhte therapeutische Effizienz nicht-induzierter GLV-1h462, verglichen mit induzierten Tyrosinase-exprimierenden GLV-1h462. Ein diagnostischer Nachweis des, nach Doxycyclin-Induktion gebildeten Melanins mittels MRT und MSOT konnte mit vergleichbarer Spezifität und Signalintensität bei konstitutiv melanogenen Reportersystemen erbracht werden. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Nahinfrarot-Bestrahlung von Tumorgewebe, welches Melanin enthält, zu einem signifikanten Temperaturanstieg auf 60°C oder höher führte. Diese Temperaturerhöhung wurde hervorgerufen durch die Melanin-bedingte Absorption der Lichtenergie und deren Umwandlung in thermale Energie. Während Tumore, kolonisiert mit melanogenen rVACV, nach Bestrahlung einen signifikanten Temperaturanstieg aufzeigten, konnte bei Tumoren, infiziert mit nicht-melanogenen rVACV, keine signifikante Temperaturerhöhung beobachtet werden. Dieser drastische Temperaturanstieg führte in der Folge zum Absterben der Tumorzellen. Dies resultierte in einer signifikant erhöhten Tumorregression bei einer Kombination bestehend aus Infektion mit melanogenen rVACV und nachfolgender Nahinfrarotlaser-Bestrahlung, verglichen mit Versuchstieren, welche ausschließlich mit melanogenen rVACV behandelt wurden.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte somit aus verschiedenen Melaninsynthese induzierenden auf Vaccinia-Virus-basierenden Reportersystemen zur diagnostischen Anwendung mittels Magnetresonanz- und multispektraler optoakustischer Tomographie eine effiziente Kombination ermittelt werden. Dieses Reportersystem wurde bezüglich des therapeutischen und diagnostischen Potentials in Zellkultur sowie *in vivo* analysiert und verbessert. Im Hinblick auf die klinische Nutzung bietet ein derartiges Reportersystem erfolgsversprechende diagnostische Eigenschaften sowie die Möglichkeit unterschiedliche klinisch etablierte Melanom-Therapien, welche Melanin als Zielstruktur nutzen, auf nicht Melanin synthetisierende Krebsarten auszudehnen und mit der hohen Spezifität und therapeutischen Effizienz onkolytischer Viren zu kombinieren.

Summary

The common therapeutic approaches available to treat various cancers still have deficiencies concerning their efficiency and side effects. Decisive for these deficiencies is the poor sensitivity of most of the conventional diagnostic systems and associated with that the late, sometimes too late, identification of tumorous tissue. The oncolytic vaccinia virus is an opportunity to enhance the efficiency of both the therapy and the diagnosis of tumor tissue. In both cases, the specificity for tumor cells and the simplicity of inserting foreign gene cassettes into the viral genome are key factors.

The genes encoding murine tyrosinase (mTyr) and tyrosinase related protein 1 (Tyrp1) were inserted into the genome of an oncolytic vaccinia virus. Tyrosinase is the key enzyme during melanogenesis and expression of this enzyme alone can lead to melanin production. Tyrp1 is involved in processing and stabilizing tyrosinase. Various studies have demonstrated melanin to be an excellent reporter molecule for MRI (magnetic resonance imaging) and MSOT (multispectral optoacoustic tomography). Therefore, melanogenic oncolytic vaccinia viruses were constructed to combine the therapeutic potential of this virus with diagnostic abilities of melanin. All recombinant vaccinia viruses (rVACV) mentioned were kindly provided by Genelux Corporation. In this thesis, we tested for their therapeutic efficiency and diagnostic potential. Initial cell culture experiments have shown that the combination of vaccinia virus-specific synthetic early/late promoter and the melanogenic enzyme tyrosinase (GLV-1h327) or the enzymes mTyr and Tyrp1 (GLV-1h324) have the highest melanin synthesis rate. It was observed that the infection of non-melanin producing cells with an rVACV-based melanogenic reporter system resulted in melanogenesis. Electron microscopy showed that the viral associated melanogenesis is localized in the lysosomes of the infected host cell. The atomic composition analysis of the virus-mediated melanin molecules revealed a mixture of eu- and pheomelanin. The virus-associated melanin is comparable to that in the skin and eye but showed higher amounts of melanin-bound metal ions.

Replication studies in cell culture revealed significantly lower replication rates of melanogenic rVACV compared to the parental vaccinia virus GLV-1h68, which resulted in a significantly weaker oncolysis rate of these melanogenic rVACV strains. Tumor growth studies have shown a reduced tumor volume in rVACV-injected mice compared to untreated mice 28 days post

injection. Additionally, a slower tumor regression was found in mice treated with melanogenic rVACV compared to those injected with the parental rVACV strain GLV-1h68. The virus-mediated melanin synthesis produced a specific signal in the deep tissue imaging modalities MSOT and MRI *in vivo*. To dampen the attenuation of the therapeutic potential of the melanogenic rVACV, a novel construct GLV-1h462 was designed. In this construct the mTyr expression is regulated by the doxycycline inducible *tet*-system and hence melanin is only synthesized in the presence of doxycycline. It was observed that *tet*-regulated genes are only expressed in the presence of doxycycline, which means the viral-encoded *tet*-system is functional. In another experiment, the inducing doxycycline concentration was determined as 0.05 µg/ml. In addition, the functionality of tyrosinase generated after doxycycline induction was confirmed by a L-DOPA assay. Furthermore, a significant higher oncolytic rate in cell cultures of uninduced non-melanogenic compared with induced melanin producing GLV-1h462 was observed in plaque size measurements, replication and MTT assays. These results could be confirmed *in vivo* in A549 or PANC-1 bearing athymic nude mice. In both cancer types a better tumor regression of the uninduced not melanin producing GLV-1h462 colonized tumors compared to the doxycycline induced melanogenic counterpart was observed. Also, a higher viral activity in blood-sera of GLV-1h462-injected mice not treated with doxycycline and therefore not induced could be detected compared to the induced melanogenic GLV-1h462 treated mice. A diagnostic analysis of the viral associated melanogenesis with MRI and MSOT revealed a comparable specificity and signal intensity compared to the constitutively melanin synthesizing reporter systems. In another experimental set up we could demonstrate that a combination of melanin production within the tumor after infection with melanogenic rVACV and the radiation of these areas with near infrared laser beams lead to a significantly better tumor regression.

In conclusion, we were able to construct a melanin synthesis inducing vaccinia virus-based reporter system for diagnostic use via MRI or MSOT. Also, we could evaluate and improve this system concerning diagnostic and therapeutic potential both in cell cultures and *in vivo*. In the clinic, such a reporter system could offer excellent diagnostic properties as well as the opportunity to use the majority of already established melanoma therapies on different naturally not melanogenic cancer types in combination with the high specificity and the high therapeutic efficiency of the oncolytic vaccinia virus.

2 Einleitung

2.1 Krebs

Im Allgemeinen bezeichnet Krebs eine maligne Tumorbildung. Diese unterscheidet sich von der benignen Neoplasie durch die Fähigkeit in andere Gewebereiche zu invadieren und Metastasen zu bilden. Nach wie vor ist Krebs mit 8,2 Millionen Toten in 2012 [1] eine der Hauptursachen krankheitsbedingter Todesfälle.

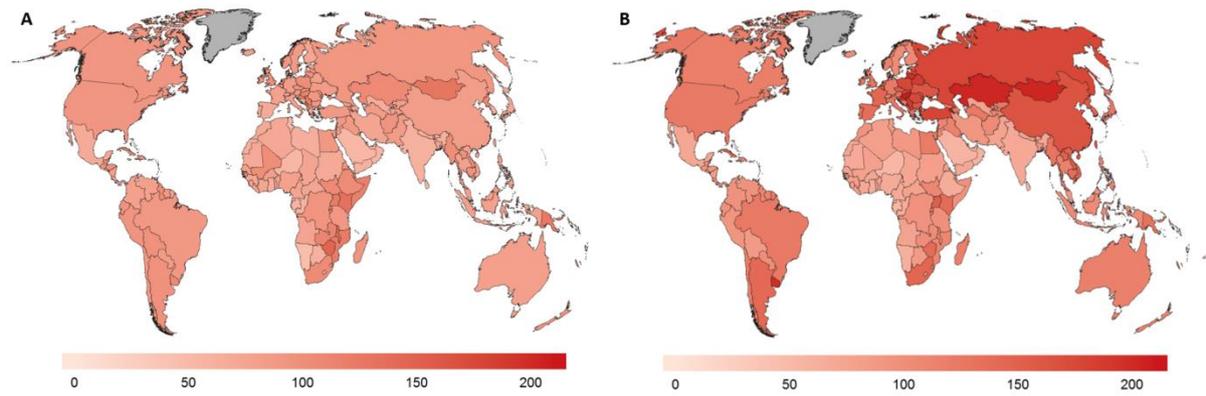


Abbildung 1: Krebs als Todesursache 2012. Dargestellt als Heatmap per 100.000. A) Todesrate der Frauen B) Todesrate der Männer. Graphische Darstellung nach [1].

Betrachtet man die 2008 global erfasste Zahl der Krebs-bedingten Todesfälle (7,6 Millionen [2]), so fällt der deutliche Anstieg der Opfer auf. Anhand dieser Zahlen ist ersichtlich, dass die moderne Medizin nach wie vor nur bedingt in der Lage ist, Krebs zu therapieren. Ein Ziel der modernen Wissenschaft muss also auch weiterhin die Entwicklung neuer Methoden sein, mit deren Hilfe Krebs zu einer kontrollierbaren Krankheit wird. Zu Anfang einer wissenschaftlichen Entwicklung steht jedoch das Verständnis einer Sache.

2.1.1 Krebsätiologie

Nach heutigem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis resultiert Krebs aus einer Akkumulation genetischer Alterationen. Diese kanzerogenen Mutationen treten häufig in Tumorsuppressor- und/oder Protoonkogenen auf. Tumorsuppressorgene wie p53 [3], *adenomatous-polyposis-coli* (APC) [4] oder Retinoblastom-Protein (RB) [5] haben meist regulatorische Wirkung auf den Zellzyklus sowie auf die Apoptose. Protoonkogene hingegen regulieren das Zellwachstum (MYC [6], B-RAF [7]), die mitotische Teilung und Zelldifferenzierung [8]. Vergleichende Studien genetischer Alterationen zwischen frühen und späteren Tumorstadien ergaben eine schrittweise Akkumulation weiterer Mutationen. Eine

sich erhöhende Mutationszahl führt demzufolge zu einer Progression der Tumorgenese bis zur Metastasierung des Primärtumors [9]. Hanahan und Weinberg postulierten in diesem Zusammenhang 2011 sechs Hauptkennzeichen eines malignen Tumors [10].

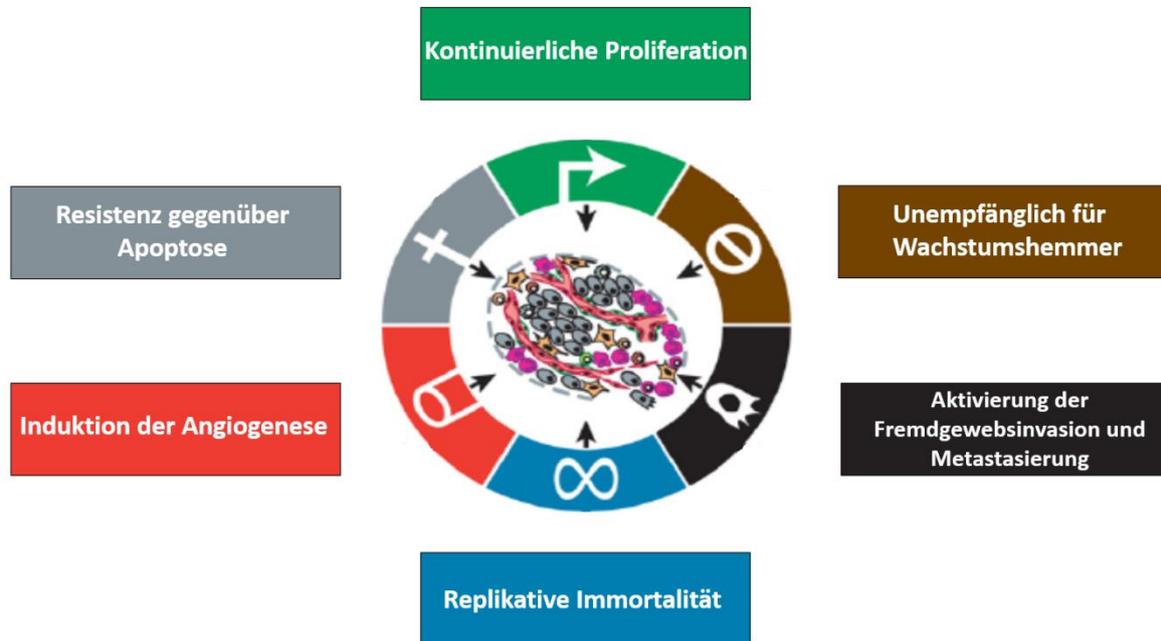


Abbildung 2: Hauptkennzeichen eines malignen Tumors. Schematische Abbildung nach Hanahan und Weinberg [10].

Die Proliferation gesunder Zellen ist strikt durch die Produktion und Freisetzung von Wachstum fördernden Faktoren und deren Rezeption reguliert. Hierdurch wird die Homöostase des Zellzyklus gewährleistet. Im Gegensatz dazu sind Zellwachstum und Zellteilung entarteter Krebszellen kaum oder gänzlich unreguliert. Dies führt meist zu einer kontinuierlichen Proliferation der betroffenen Zelle. Verursacht wird dies beispielsweise durch autokrine Proliferationsstimulation, durch Aktivierung Tumor-assoziiertes Zellen zur Freisetzung proliferativer Wachstumsfaktoren, durch hypersensitive Reaktion auf wachstumsstimulierende Faktoren, bedingt durch herabgesetzte Rezeptorexpression oder mutationsbedingte Rezeptormodifikation oder auf Grund einer Unterbrechung einer negativen Rückkopplungsschleife zur Attenuierung proliferationsaktivierender Signale. Weiterhin ist zur Aufrechterhaltung der Homöostase proliferierender Zellen die Sensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren unabdingbar. Durch mutationsbedingten Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, die maßgeblich den Zellzyklus regulieren, kann ein Sensitivitätsverlust gegenüber Wachstumsfaktoren bei malignen Tumorzellen ausgelöst werden. Ein weiteres Kennzeichen krebserregender Zellen ist deren Potential in andere Gewebsschichten zu invadieren und Metastasen zu bilden. Bei gesunden Zellen wird dies

durch Kontaktinhibition [11,12] verhindert. Auch hier kann es durch Mutation zum Funktionsverlust und damit zu einer Inhibition der Singaltransduktion führen, wodurch ein proliferativer Stimulus nicht unterdrückt wird und der tumoröse Zellhaufen in neue Gewebeschichten invadiert. Ein Faktor, der für die Metastasierung von entarteten Zellen eine wichtige Rolle spielt, ist das E-Cadherin. Dieses Protein vermittelt adhärente Zell-Zell und Zell-extrazelluläre Matrix-Verbindungen. Wird die E-Cadherin-Expressionrate herabgesetzt oder inhibiert, kommt es in der Folge zur Auflösung der starken Zell-Zell bzw. Zell-extrazelluläre Matrix-Verknüpfungen. Neben anderen Faktoren wie Snail, Slug, Twist und Zeb1/2, führt der Verlust des E-Cadherin zu Epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT), wodurch epitheliale Krebszellen einen mesenchymalen Charakter annehmen. Zellen mit mesenchymalem Charakter sind in der Lage zu migrieren und die Basallamina zu durchdringen. Diese Hypothese liefert eine mögliche Erklärung, wie es Krebszellen möglich ist zu invadieren und Metastasen zu bilden [13]. Der genaue Mechanismus, welcher zur Invasion und Metastasierung führt, ist bis heute jedoch unbekannt. Eine weitere Eigenschaft, welche Krebszellen von gesundem Gewebe unterscheidet, ist deren Immortalität. Normalerweise steht jeder Zelle eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen zur Verfügung. Anschließend tritt diese entweder in die Seneszenz oder in die Apoptose ein. Reguliert wird dieser Mechanismus hauptsächlich durch das bei jeder Zellteilung kürzer werdende Telomer. Das Enzym Telomerase, welches die Telomerlänge im Zuge der DNA-Replikation wiederherstellt, ist ausschließlich während der Embryogenese oder in Stammzellen aktiv. In der Mehrheit immortalisierter Zellen, wie Krebszellen, wird es jedoch exprimiert und verhindert die progressive Erosion der Telomere [14]. Das wiederum verhindert den Eintritt in die Seneszenz oder in die Apoptose. Desweiteren ist sowohl die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung wie auch der Abtransport der metabolischen Abfallprodukte und des Kohlendioxids für Tumorgewebe, wie für gesundes Gewebe, essentiell. Dies wird durch die Vaskulatur gewährleistet. Die Vaskulogenese findet normalerweise während der Embryogenese statt und fällt im Adulten weitestgehend in einen Ruhezustand. In der Tumorgenese ist die Angiogenese hingegen meist dauerhaft aktiviert. Dies führt zu kontinuierlich wachsenden und sich verzweigenden Blutgefäßen [15]. Proangiogene Faktoren, deren Regulation in Tumorgewebe häufig fehlt, werden meist konstant exprimiert. Beispiele für Moleküle, die die Angiogenese stimulieren sind die *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [16] oder die *fibroblast growth factor* (FGF) Familie [17]. Neben Angiogenese-aktivierenden Faktoren wird diese in gesundem Gewebe auch durch

suppressive Signale wie dem *thrombospondin-1* (TSP-1) [18] reguliert. Diese sind in tumorösen Gewebe häufig inaktiviert. Durch die unkontrollierte Vaskulogenese in Tumoren ist die phänotypische Ausprägung der Gefäße sehr verschachtelt, übermäßig verzweigt, deformiert und teilweise durchlässig. Das kann zu einem unregelmäßig Blutfluss und sogar zu Mikrohämmorrhagien führen [19]. Weiterhin wurde festgestellt, dass es bei intravenöser oder intraarterieller Applikation von pharmakologischen Stoffen zu einem sogenannten EPR- (*enhanced permeability and retention*) [20] Effekt in Tumorgewebe kommt. Das sechste von Hanahan und Weinberg postulierte Hauptmerkmal maligner Tumore ist die erworbene Resistenz gegenüber dem eigenen Zelltod. Hierfür verantwortlich sind beispielsweise der Verlust der TP53- [21] Tumor-suppressiven Wirkung, die erhöhte Expression antiapoptotischer Regulatoren (Bcl-2, Bcl-X_L) oder herabgesetzte Transkription und/oder Translation proapoptotischer Faktoren (Bax, Puma) [22]. Diese tumorspezifischen Merkmale sind Ziele sowohl vorklinischer neuerartiger krebstherapeutischer Ansätze als auch bereits etablierter Therapien. Weitere von Hanahan und Weinberg postulierte Merkmale eines Tumors sind die Fähigkeit die Zerstörung des Tumorgewebes durch das Immunsystem zu verhindern und ein inflammatorisches Umfeld zu fördern. Weiterhin zeichnen sich Krebszellen meist durch genetische Instabilität sowie einem deregulierten Metabolismus aus [10].

2.1.2 Stand der Krebstherapie

Die Vielfalt an Zielstrukturen sowie die Heterogenität des Tumorgewebes [23] und die Interaktion zwischen Krebszellen und Tumorstroma [24] bietet eine Vielzahl an möglichen Zielstrukturen für einer krebstherapeutische Behandlung. Diese Heterogenität bedingt jedoch meist die Notwendigkeit den Patienten mit verschiedenen therapeutischen Ansätzen zu behandeln, um verschiedene Aspekte der Krankheit zu therapieren. Die Problematik der Resistenzbildung unterschiedlicher Krebsarten, sowie ein tieferes Verständnis der Krankheit Krebs führen außerdem zu einer ständigen und notwendigen Weiterentwicklung etablierter Therapien und zu der Entwicklung neuartiger Ansätze. Im Folgenden werden einige etablierte sowie neuartige vorklinische Methoden zur Krebstherapie beschrieben.

2.1.2.1 Chirurgische Tumorthherapie

Die chirurgische Entfernung von entartetem Gewebe zählt nach wie vor zu den gängigsten therapeutischen Maßnahmen. Bei nicht-metastasierenden Tumoren der Frühphase ist die operative Entfernung meist die erfolgsversprechenste Behandlungsform. In den letzten

Jahren wurde die technische Umsetzung des operativen Eingriffs weiter verbessert. So wird heute standardmäßig minimal invasiv (minimal invasive Chirurgie MIC) mittels Endoskop operiert (z.B. Laparoskopie). Es werden neue, unmittelbar kauterisierende Schneidewerkzeuge bzw. Laser verwendet, die Operation im Vorfeld anhand von 3D-Modellen der Tiefengewebe-Tomographie (z.B. MRT) geplant oder sogar der Eingriff in Echtzeit diagnostisch überwacht [25]. Neben der teilweisen oder vollständigen Entfernung von entartetem Gewebe, dient der operative Eingriff zusätzlich der schnellen Diagnose in Form von Biopsien oder der Entnahme von Wächterlymphknoten [26]. Limitiert ist diese Therapieform jedoch durch die Lokalisation des Tumors. Würde eine Gewebsentfernung zu einer starken gesundheitlichen Beeinträchtigung oder sogar zum Tod des Patienten führen, kann ein Eingriff nicht vorgenommen werden.

2.1.2.2 Lokoregionale Behandlung

Als Alternative zur operativen Entfernung wird die Technik der MIC genutzt, um gezielt Gewebe-zerstörende Reize in das Tumorgewebe zu applizieren. Behandlungen dieser Art sind die Radiofrequenz-Ablation, bei welcher über einen Emitter Radiowellen in den Tumor für eine bestimmte Dauer übermittelt werden. Dies hat die Zerstörung des Tumorgewebes zur Folge [27]. Desweiteren kann mittels Mikrowellen-Ablation, bei welcher gerichtet die Tumormasse erhitzt wird, eine letale Zellschädigungen herbeigeführt werden [28]. Eine andere lokoregionale Behandlungsmethode kleiner Krebsgeschwüre ist deren Exposition gegenüber hochintensiver fokussierter Ultraschallwellen, bei der Gewebe durch Applikation gebündelter Schallwellen gezielt erhitzt wird. Dies führt zu koagulativer Nekrose [29]. Auch durch Cryoablation kann Krebsgewebe zerstört werden [30]. Bei dieser Behandlung führen ein oder mehrere Einfrier-Auftau-Zyklen zu Membranschädigungen, welche zum Zelltod führen. Eine weitere minimal invasive Tumorthherapie ist die photodynamische Therapie, bei der ein Photosensibilisator meist systemisch appliziert wird. Dieser akkumuliert im Tumorgewebe und bildet nach Exposition mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zytotoxische Produkte [31]. Neben den klinisch untersuchten Therapieansätzen gibt es eine Vielzahl vorklinischer minimal invasiver Behandlungsmethoden, wie die Tumorbehandlung mittels Nahinfrarot-Laser-vermittelter thermaler-Ablation (NIR-LATA). Hierbei wird im Vorfeld der Behandlung ein starker Absorber in die Tumorzellen eingebracht und anschließend bestrahlt. Die stark erhöhte Absorption des NIR-Lasers in der Absorber-enthaltenden Region resultiert in einer

drastischen Temperaturerhöhung, die wiederum zu Proteindenaturierung und folglich zu Nekrose führt [32].

2.1.2.3 Chemotherapeutische Tumorbehandlung

Chemotherapien werden solitär oder adjuvant zu einem chirurgischen Eingriff oder der Strahlentherapie eingesetzt. Meist sind Chemotherapeutika Zytostatika, deren Zielstrukturen DNA oder Tubuline sind. Auf Grund einer Interaktion der jeweiligen Agenzien mit diesen Zielstrukturen werden das Zellwachstum und die Zellteilung inhibiert. Durch die stark erhöhte Proliferationsrate der Krebszellen verglichen mit gesunden Zellen werden Tumorzellen durch Zytostatika stärker betroffen und somit eine Selektivität dieser Medikamentenklasse gewährleistet [33]. Chemotherapeutische Pharmaka sind beispielsweise alkylierende Stoffe, wie Temozolomid [34] oder Mephalan [35], welche eine Quervernetzung der DNA-Doppelstränge verursachen, Antibiotika gegen Tumorzellen, wie Doxorubicin, das die Topoisomerase II stabilisiert, wodurch es zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommt [36] oder SN-38 (Irinotecan), welches die Topoisomerase I stabilisiert und somit DNA-Einzelstrangbrüche verursacht [37]. Weitere Agenzien sind DNA-Struktur-bindende Substanzen wie Actinomycin D, welches in der kleinen Furche der DNA bindet und die RNA-Synthese inhibiert [38] oder Cisplatin, das an Guanin-Reste der großen Furche der DNA bindet, wodurch die DNA gebogen wird. Dies setzt wiederum verschiedenste DNA-Bindemoleküle fest, wodurch deren Funktion inhibiert wird [39]. Neben DNA-Interaktionspartnern werden ebenfalls Chemotherapeutika gegen die Tubulin-Polymerisation, wie Comberstatatine, zur Krebstherapie eingesetzt. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das CA-4P [40], das an die beta-Untereinheit des Tubulins bindet und deren Polymerisation verhindert. Ein Nachteil dieser Therapieform ist, dass die Selektivität hauptsächlich auf einer erhöhten Teilungsrate beruht, wodurch neben Krebszellen auch andere sich schnell teilende Gewebe in Mitleidenschaft gezogen werden, wie Haarfollikel, Schleimhäute, im Besonderen das Darmepithel, und Blutkörperchen. Diese Schädigung führt zu Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Schleimhautentzündung und Blutbildveränderungen bis hin zur Anämie [41].

2.1.2.4 Strahlentherapeutische Tumorbehandlung

Die strahlentherapeutische Tumorbehandlung gehört neben der operativen Dissektion und der Chemotherapie zu den am häufigsten angewandten Verfahren der onkologischen Klinik. Während einer Strahlentherapie wird der Patient ionisierender hochenergetischer Strahlung

(Röntgen-, gamma-, alpha- oder beta-Strahlung) ausgesetzt. Dies resultiert in der Bildung hoch energetisch geladener Teilchen im bestrahlten Gewebe. Diese schädigen entweder direkt Zellbestandteile, vor allem die DNA, oder erzeugen in einer Folgereaktion reaktive Sauerstoffspezies, welche DNA-, Protein- und/oder Lipidmembranschäden verursachen. Diese führen wiederum zur Inhibition der Proliferation oder zum Zelltod der bestrahlten Zellen [42]. Ein Nachteil der Strahlentherapie ist, dass eine Zellschädigung nicht selektiv auf Krebszellen beschränkt ist. Dies birgt eine Mutationsgefahr für bestrahltes gesundes Gewebe, wodurch eine Transformation in malignes Gewebe verursacht werden kann oder Krebszellen im Anfangsstadium weiter evolvieren [43]. Die Strahlentherapie ist untergliedert in zwei Therapieformen. Eine Methode ist, den zu therapierende Bereich mit einer externen Strahlenquelle zu bestrahlen. Eine andere Anwendungsform ist die Brachytherapie. Hierbei wird dem Patienten eine radioaktive Substanz appliziert, welche im tumorösen Bereich akkumuliert und eine lokal eingegrenzte Strahlendosis vermittelt.

2.1.2.5 Immuntherapie

Bereits im späten 19 Jh. beobachtete William B. Coley nach Injektion bakterieller Produkte in Tumorgewebe dessen Rückgang bis hin zum völligen Verschwinden [44]. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden bis heute verschiedene Ansätze zur Krebstherapie entwickelt. Eine Möglichkeit ist die Gabe immunstimulierender Fremdsubstanzen wie BCG (Bacille Calmette-Guérin [45]), immunstimulierende Cytokine (IL-2 [46] oder Interferon- α [47]), die Vakzinierung gegen kanzeröse Viren (HPV-16 und 18 [48]), die adaptive T-Zell Therapie [49], die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen immunsupprimierende Epitope wie CTLA-4 [50] oder die onkolytische Virustherapie (OncoVEX [51] oder GL-ONC1 [52]). Die meisten dieser therapeutischen Ansätze sind jedoch nach wie vor in der Entwicklungsphase oder werden meist als adjuvante Therapie verabreicht.

2.1.2.6 Tumorthherapie mittels onkolytischer Viren

Die onkolytische Virustherapie liefert einen therapeutischen Ansatz, welcher bei hoher Effektivität spezifisch Krebszellen schädigt. Der Einsatz von Viren in der Krebstherapie ist bereits seit dem frühen 20 Jh. bekannt. Diese Behandlungsmethode wurde jedoch wieder verworfen, da die Virusinfektion schwere Nebenwirkungen verursachte. Eine Renaissance erlebte die onkolytische Virustherapie in den 90iger Jahren als der Fortschritt biotechnologischer Methoden es ermöglichte, pathogene cytotoxische Virusmerkmale zu

modifizieren, die onkolytischen Viren zu attenuieren und zusätzlich mit Genen für therapeutisch wirksame Moleküle auszustatten [53]. Onkolytische Viren replizieren und töten mit hoher Spezifität Krebszellen, verbreiten sich im Tumorgewebe ohne gesundes Gewebe zu schädigen und stimulieren und sensibilisieren das Immunsystem gegenüber sich selbst sowie gegen Tumorzellen [54]. Die Spezifität der onkolytischen Viren für Krebszellen wurde auf zwei alternative Wege erreicht. Zum einen durch eine veränderte Virusoberfläche, wodurch spezifische Wirtszellrezeptormoleküle erkannt werden und so eine virale Infektion nur dieser spezifischen Zellen ermöglicht wird, oder durch den Verlust der viralen Bindeproteine, wodurch die Infiltration in gesunde Zellen verhindert wird. Zum anderen durch Modifikation essentieller Gene der Virus-Replikation. Hierdurch kann das onkolytische Virus nur in Zellen effizient repliziert, welche inaktivierte Tumorsuppressorgenen und/oder aktivierte Onkogene tragen. Vertreter der onkolytischen Viren, welche in der klinischen Entwicklung bereits weit fortgeschritten sind, sind zum einen das *Herpes simplex Virus* T-Vex der Firma Amgen [55], welches eine Deletion in ICP34.5 und ICP47 trägt sowie den genomisch inserierten humanen Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF). Dieses onkolytische Virus hat 2014 die klinische Phase III in Melanompatienten abgeschlossen [56]. Das *Adenovirus* ONYX-15 (Shanghai Sunway Biotech), das durch eine E1B-55kDa-Deletion selektiv in p53-abnormen Zellen replizieren und diese spezifisch lysieren sollte [57], ist in China bereits als Krebstherapeutikum zugelassen. Es wurde jedoch gezeigt, dass andere adenovirale Faktoren, wie z.B. E1A, ebenfalls in der Lage sind, p53 zu inhibieren, wodurch keine ausschließliche Selektivität gewährleistet ist [58]. Ein weiteres onkolytisches Virus ist das auf dem Reovirus-basierende Produkt Reolysin [59] der Firma Onkolytics Biotech, welches sich in klinischer Phase III befindet [60]. Ein weiteres Beispiel ist das von der Firma Genelux patentierte Vaccinia-Virus GL-ONC1, in welchem drei Expressionskassetten in drei unterschiedlichen Genloki inseriert wurden. Es wurde ein Fusionsgen aus *Renilla* Luciferase- und dem grün fluoreszierendem Protein aus *Aequora* in den F14.5L Locus, das für die *E. coli* beta-Galaktosidase und das für den humanen Transferinrezeptor kodierende Gen in den J2R-Locus und das Gen der *E. coli* beta-Glucuronidase in den A56R Locus inseriert [61]. Dieser Vertreter onkolytischer Viren befindet sich aktuell in der klinischen Phase I [62] [63] bzw. I/II [52].

Eine große Vielfalt unterschiedlicher onkolytischer Viren könnte den Onkologen also bald zu Verfügung stehen und als Einzeltherapeutikum oder in Kombination mit Chemo-, Strahlen- oder anderen Behandlungsformen von großem Nutzen sein.

2.2 Das Vaccinia-Virus

Rekombinante Konstrukte des Vaccinia-Virus (Familie der Pockenviren) wurden im Zuge dieser Arbeit analysiert, weswegen an dieser Stelle Informationen über dessen Bedeutung und einige Charakteristika beschrieben werden sollen.

Die Pocken-Erkrankung ist eine schwere Infektionskrankheit, verursacht durch Variola-Viren, welche zur Familie der Poxviridae zählen. Dessen hohes Infektionspotential und die Schwere der resultierenden Erkrankung wird allein durch die Millionen Pocken-bedingten Todesfälle weltweit im 20. Jh. deutlich [64]. Bereits vor mehr als 200 Jahren konnte Edward Jenner, nach Verabreichung eines Lysats aus Pockenmaterial einer an Kuhpocken erkrankten Frau, einem Jungen Immunität gegen Variola-Viren-verursachte Pocken vermitteln [65]. Diese immunologische Kreuzreaktion ermöglichte die Patienten-Immunisierung gegen Pocken. Auf Basis dieser Beobachtungen, Untersuchungsreihen der WHO (*world health organisation*) und einer weltweiten Impfpflicht mit dem nicht-human-pathogenen Vaccinia-Virus konnte die WHO schließlich 1980 die Ausrottung der Pocken bekannt geben [66]. Eine erneute Epidemie durch Poxviridae ist jedoch nicht völlig auszuschließen. So sind bereits pathogene Fälle von Pocken, bedingt durch Zoonosen, aufgetreten, wie ein Ausbruch der Affenpocken bei Menschen in den Vereinigten Staaten 2003 [67]. Auch die Gefahr einer Verwendung der Pockenviren als biologische Waffe ist nach wie vor gegeben, da auch weiterhin an unterschiedlichen Standorten Variola-Reservoirs gelagert werden. Das Vaccinia-Virus (VACV) dient jedoch nicht nur als Vakzin gegen Pocken, sondern auch als cytosomaler Expressionsvektor in eukaryontischen Zellen, zur Untersuchung biologisch aktiver Proteine rekombinant exprimiert durch VACV, zur Erforschung der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen Infektionskrankheiten und als onkolytisches Virus in der Krebstherapie.

2.2.1 Charakteristika des Vaccinia-Virus

Erstmalig wurde das VACV wahrscheinlich aus Kuhpocken isoliert und als Vakzin verwendet. In der weiteren Entwicklung wurde dem Impfstoff Pockenmaterial von Pferden und anderen Isolaten beigefügt, um dessen Wirksamkeit zu erhöhen [68]. Genetische Analysen zeigten, dass die heutzutage genutzten Vaccinia-Virus Isolate eine nahe Verwandtschaft zu Variola-

Virus, Kuhpocken-Virus, Pferdepocken-Virus und anderen Mitgliedern der Poxviridae aufweisen [69]. Die Poxviridae werden in zwei Unterfamilien unterteilt, die Chordopoxvirinae, welche Vertebraten als Wirtsorganismus bevorzugen, und Entomopoxvirinae, welche Insekten infizieren [64]. Die Chordopoxvirinae unterteilen sich wiederum in mehrere Genera, das Ortho-, das Para-, das Mollusci- und das Yatapoxvirus. Diese Genera sind in der Lage Menschen zu infizieren, entweder ausschließlich (Variola-Virus und Molluscum-Contagiosum-Virus) oder als Zoonose (*Parapoxvirus ovis* und *Orthopoxvirus simiae*) [64]. Poxviren gehören zu der Klasse der doppelsträngigen-DNA-Viren und zählen zu den größten bekannten Viren (200-400 nm). Ihr Genom kodiert für ca. 200 Gene. Die virale Replikation findet ausschließlich im Cytoplasma der Wirtszelle statt, wodurch das Risiko einer Geninsertion viraler Gene ins Wirtgenom verringert wird [64].

2.2.2 Replikationszyklus des Vaccinia-Virus

Das Vaccinia-Virus liegt in zwei infektiösen Hauptformen vor, dem IMV (*intracellular mature virus*) und dem EEV (*extracellular mature virus*). Diese binden an die Oberfläche einer Wirtszelle und fusionieren mit dieser, wodurch der Infektionszyklus initiiert wird. Der Eintritt des Virions in die Wirtszelle wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Virion-Proteine (z.B. D8L, H3L und A27L) mit Glykosaminoglykanen auf der Zelloberfläche und Komponenten der extrazellulären Matrix vermittelt [70-72]. Die Fusion zwischen Virion und Wirtszellmembran ist nicht vollständig geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass das Virionprotein VV-A28L während der Fusion mit der Wirtszellmembran und der Freisetzung des Virions in das Wirtszellzytoplasma eine essentielle Rolle spielt [73]. Nach Eintritt des viralen Kerns in das Zytoplasma beginnt die frühe Phase der Replikation. In dieser werden frühe virale Gene durch die virale RNA-Polymerase mit Hilfe von im Viruskern-enthaltenen Transkriptionsfaktoren prozessiert. Diese werden anschließend translatiert und sind beteiligt in den nächsten Schritten des Infektionszyklus. Anschließend an die frühe Phase des viralen Zyklus wird durch bisher nicht identifizierte Wirts- und Virusfaktoren die virale Kernstruktur aufgelöst und die virale DNA in das Zytoplasma freigesetzt. Dies initiiert die Replikation der viralen DNA. Im weiteren Verlauf kommt es zur Expression intermediärer und später viraler Gene. Es wird angenommen, dass für die Transkription der intermediären sowie der späten viralen Gene das Zusammenspiel mit wirtseigenen Transkriptionsfaktoren notwendig ist [74,75]. Die Akkumulation später viraler Genprodukte initiiert den Zusammenbau infektiöser viraler Partikel und deren Morphogenese. Hierbei wird zuerst das IMV gebildet, welches mittels

Mikrotubuli migriert und nach Ummantelung mit einer Golgi-Hüllmembran als IEV (*intracellular enveloped virus*) bezeichnet wird. Fusioniert das IEV mit der äußeren Zellmembran der Wirtszelle, verliert es dabei seine äußere Membran und es entsteht das CEV (*cell-associated enveloped virus*). Dieses kann entweder durch Aktinfilament-Polymerisation in benachbarte Wirtszellen transportiert oder als EEV direkt freigesetzt werden. Die Formen CEV und EEV sind von großer Bedeutung für die Verbreitung von Zelle zu Zelle *in vivo*, während IMVs hauptsächlich durch Zellyse oder Wirtsmembranschädigung freigesetzt werden [76].

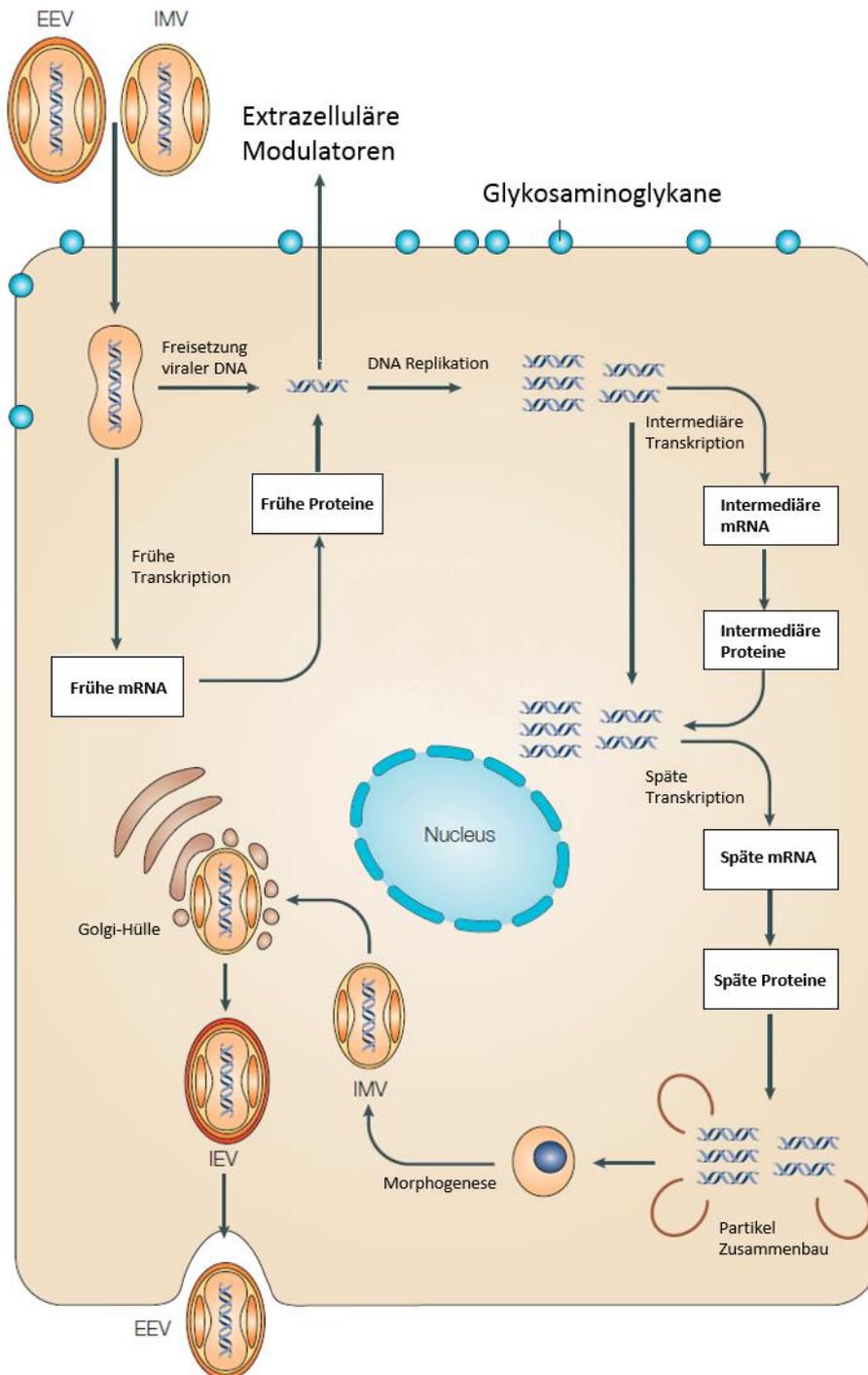


Abbildung 3:
Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Vaccinia-Viren nach McFadden [67].

2.3 Tomographische Verfahren zur Krebsdiagnose

Trotz der Vielfalt an Krebstherapien spielt die frühzeitige Diagnose von entartetem Gewebe eine essentielle Rolle für den therapeutischen Erfolg. Die Weiterentwicklung etablierter Systeme zur Krebsdiagnostik wie Computertomographie (CT), *single positron emission computed tomography* (SPECT), Positronenemissionstomographie (PET) oder

Magnetresonanztomographie (MRT) und die Entwicklung neuer Methoden, wie die optoakustische Tomographie, ist daher ebenfalls entscheidend für eine Verbesserung der Krebstherapie.

2.3.1 Computertomographie (CT)

Im Gegensatz zur herkömmlichen Röntgentechnik, in der eine zweidimensionale Aufnahme erzeugt wird, wodurch es zu Überlagerungen verschiedener Gewebsschichten kommt, wird in der CT das zu untersuchende Objekt aus mehreren Winkel aufgenommen. Jeder Messwinkel repräsentiert hierbei ein eindimensionales Absorptionsprofil. Die jeweiligen gemessenen Absorptionsprofile werden mittels Computer zusammengefügt, um den Absorptionsgrad der jeweiligen Volumeneinheit (Voxel) zu bestimmen. Diese Voxel werden zu den untersuchten komplexen Objekten, z.B. Organe, Instrumente oder Materialteile, zusammengesetzt und meist als Horizontalschnitt dargestellt. Diese werden zu dreidimensionale Volumendarstellungen zusammengefügt. Da für diese Anwendung eine singuläre Röntgenstrahlenexposition nicht ausreicht, sondern eine Vielzahl an Bestrahlungen aus unterschiedlichen Winkeln nötig ist, ist die Strahlenbelastung dieser tomographischen Anwendung höher verglichen mit herkömmlichen Röntgenaufnahmen. Diese Strahlenbelastung führt zu einem erhöhten Krebsrisiko für den Patienten [77].

2.3.2 Single photon emission computed tomography (SPECT)

Im Vorfeld der tomographischen Analyse wird dem Patienten ein Gammastrahler injiziert. Die Gammastrahlung wird von dreidimensional um den Patienten angeordneten Detektoren aufgenommen und, nach Computer-basierter Korrektur und Verrechnung der detektierten Linienintegrale, zuerst zu einem Schnittbild und anschließend zu einer dreidimensionalen Aufnahme verrechnet. Anhand dieser Daten kann die Verteilung bzw. die Aufnahme des Radiotracers in verschiedenen Bereichen, Geweben oder Organen ermittelt werden. Dies ermöglicht Aussagen über Stoffwechselabläufe in den untersuchten Bereichen. SPECT zählt zu den funktionellen bildgebenden Verfahren und liefert keine Aussage über die Körpermorphologie. Deshalb wird SPECT in der medizinischen Anwendung häufig mit CT-Aufnahmen kombiniert, um Aufschluss über metabolische und anatomische Fragestellungen zu erlangen. Nachteile dieses tomographischen Verfahrens sind eine schlechtere Auflösung im Vergleich mit der PET und ein Restrisiko für den Patienten, da durch die emittierte

Gammastrahlung das Krebsrisiko steigt und eine allergische Reaktion auf das Radiopharmakon nie auszuschließen ist [78].

2.3.3 Positronen-Emission-Tomographie (PET)

Neben SPECT, zählt auch PET zu den bildgebenden Verfahren der Nuklearmedizin. Anstatt eines Gammastrahlers wird jedoch ein Positronenemitter verwendet, welcher dem Patienten injiziert wird. Die abgestrahlten Positronen kollidieren im Gewebe mit Elektronen. Diese Kollision führt zu Annihilation beider Teilchen und zur Entstehung zweier Gammaquanten, welche sich nahezu im 180° Winkel voneinander entfernen. Diese Quanten werden durch Koinzidenzdetektion durch Detektoren nachgewiesen, welche in 360° Orientierung um den Patienten positioniert sind. Vorteile der PET gegenüber der SPECT ist die geringere Strahlenbelastung für den Patienten bedingt durch geringere Halbwertszeiten der verwendeten Radiopharmaka. Weiterhin erreicht diese tomographische Anwendung eine höhere Auflösung verglichen mit der SPECT. Nachteile sind die höheren Kosten des Verfahrens, das Risiko einer allergischen Reaktion gegen das verwendete Radiopharmakon und eine Krebsrisiko-steigernde Strahlenbelastung des Patienten [79].

2.3.4 Magnetresonanztomographie (MRT)

Durch die Magnetresonanztomographie lassen sich sowohl Struktur als auch Funktion von Geweben, Organen oder Organismen untersuchen. Bei dieser Applikation wird das Prinzip der Kernspinresonanz ausgenutzt. Diese besagt, dass Atomkerne mit ungerader Protonen- und Neutronenzahl in konstanten Magnetfeldern elektromagnetische Wechselfelder absorbieren oder emittieren. Um ein Objekt mittels MRT zu analysieren, wird dieses in einem magnetischen Feld positioniert. Dies führt zu homogener Ausrichtung sämtlicher magnetischer Dipolmomente (MDM) der geladenen Teilchen des zu analysierenden Objekts. Weiterhin werden die MDM der untersuchten Atomkerne in eine Kreisbewegung versetzt. Die Anzahl der nach dem Hauptmagnetfeld ausgerichteten MDM sowie die Frequenz der Kreisbewegung sind proportional zur Feldstärke des Hauptmagnetfelds. Außerdem unterscheiden sich die MDM-Frequenzen unterschiedlicher Atome in einem konstanten Magnetfeld. In dem nächsten Schritt der Analyse wird ein kurzer elektromagnetischer Impuls in 90° Orientierung (90° RF-Impuls) zum Hauptmagnetfeld induziert, welcher die MDM aus der momentanen Orientierung (z-Achse) in die x-y-Fläche verschiebt. Die Frequenz des 90° RF-Impuls muss der Frequenz der jeweiligen Kreisbewegung entsprechen, um diese selektiv

auszulenken. Anschließend wird die Relaxation bestimmt. Diese beschreibt das Zeitintervall, das die MDM benötigen um in die ursprüngliche Orientierung zurückzukehren. Dieser Vorgang kann mathematisch mit zwei Parametern beschrieben werden. Zum einen die MDM-Amplitude in z-Achse und zum anderen die MDM-Amplitude in x-y-Fläche. Im Ruhezustand ist die Amplitude in z-Achse maximal während diese in x-y-Fläche 0 beträgt. Bei Auslenkung durch den 90° RF-Impuls nimmt die Amplitude in der z-Achse den Wert 0 an und ist maximal ausgeprägt in der x-y-Fläche. Während der Relaxation nimmt die Amplitude in z-Achse wieder zu und in x-y-Fläche ab. Die Amplituden-Zunahme in der z-Achse wird als T1-Relaxation und die Amplituden-Abnahme in der x-y-Fläche als T2-Relaxation bezeichnet. Komplexe Strukturen, wie Organe oder ganze Organismen, unterscheiden sich in der atomaren Zusammensetzung oftmals signifikant [80]. Dadurch lassen sich deutliche Unterschiede in der T1- bzw. T2-Relaxation in unterschiedlichen Geweben erkennen und somit Aussagen über die Morphologie treffen [32]. Durch die Applikation und den Umsatz geladener Kontraststoffe ist es mittels MRT ebenfalls möglich funktionelle Aussagen über die Aufnahme und die Verbreitung des Kontrastmittels in Patienten zu treffen. [81].

2.3.5 (Multispektrale) optoakustische Tomographie (MSOT)

Die optoakustische Tomographie basiert auf dem Prinzip des photoakustischen Effekts. Dieser besagt, dass bei Bestrahlung eines Materials mit Licht ein Teil der Lichtenergie absorbiert und in Wärmeenergie umgewandelt wird. Dies führt zu einem Temperaturanstieg im Material. Dieser resultiert in einer Volumenvergrößerung. Wird das Material mit Lichtimpulsen bestrahlt, führt der Wechsel von Erwärmung und Abkühlen zu alternierender Volumenzu- und Abnahme. Diese Schwingung erzeugt Ultraschallwellen [82], die wiederum die Detektion lichtabsorbierender Strukturen ermöglichen [83]. Ein Vorteil gegenüber anderen optischen bildgebenden Verfahren ist die langsamere Abnahme der Ultraschall-Signalstärke pro zurückgelegter Strecke, verglichen mit optischen Signalen. Hierdurch wird eine bessere Auflösung in tieferen Regionen ermöglicht. Weiterentwickelte Formen der optoakustischen Tomographie sind die multispektral optoakustische Tomographie (MSOT) [83] und die funktionelle photoakustische Mikroskopie (fPAM) [84]. Hierbei werden die zu analysierende Strukturen mit Lasern verschiedener Wellenlängen im Nahinfrarot-Bereich bestrahlt.

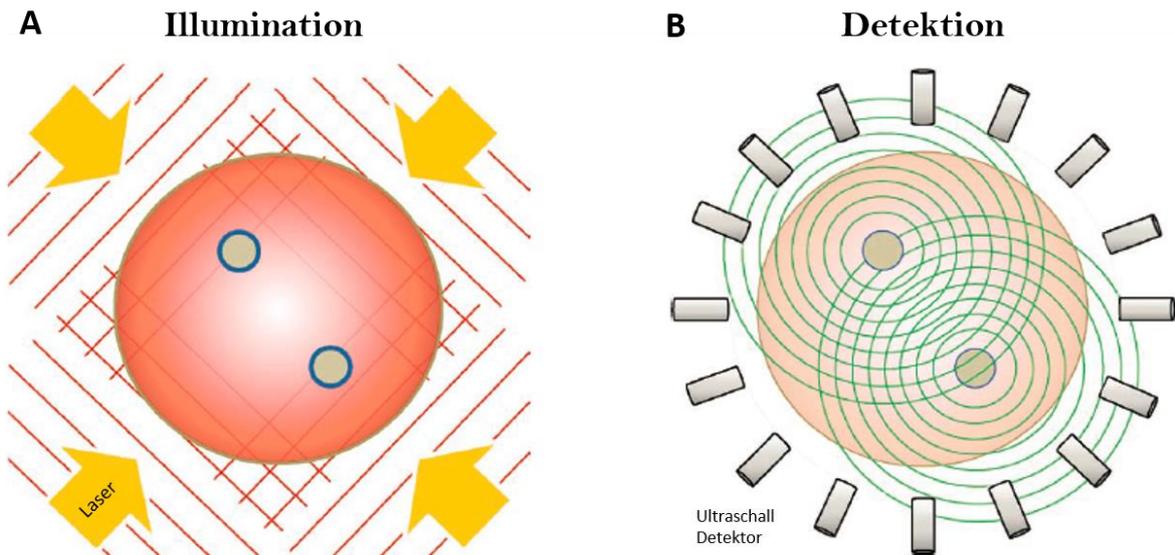


Abbildung 4: Schematische Darstellung der optoakustischen Tomographie. A) schematischer Gewebeausschnitt mit verstärkt absorbierenden Einschlüssen (blau eingekreist). Radiale Illumination des Gewebeausschnitts führt zu erhöhter Lichtenergieaufnahme dieser verstärkt absorbierenden Regionen und somit zu einer erhöhten thermoplastischen Expansion. Dies führt zu einem stärkeren Ultraschallsignal verglichen mit der weniger stark absorbierenden Umgebung. B) Die dreidimensional um das Objekt positionierten Detektoren erfassen diese Ultraschallwellen und bestimmen durch Koindizenzberechnung den Ursprung der starken Absorber. Abbildung nach Nitzachristos [83].

Durch die Illumination mit verschiedenen Wellenlängen und Kenntnis der spektralen Eigenschaften bestimmter Zielmoleküle oder Strukturen, können optische Reporter wie Fluorochrome [85] oder chromophore Moleküle [32,86] spezifisch detektiert werden. Durch die Belichtung mit verschiedenen Wellenlängen und die damit verbundene erhöhte Informationsmenge, wird das Verhältnis, Signal zu Hintergrund, deutlich verbessert und die Korrektur der Photonenattenuation erleichtert [87]. Dies resultiert in einer verbesserten Auflösung der Zielstrukturen.

2.4 Melanin

Durch Transformation des L-Tyrosins über mehrere katalytische Schritte wird das Pigment Melanin gebildet. Das Polymer ist polymorph, unlöslich in wässrigen und organischen Flüssigkeiten [88] sowie relativ resistent gegenüber enzymatischem oder biologischem Abbau. Das Makromolekül Melanin wurde bereits in mehreren Studien als Reportermolekül oder Zielstruktur verschiedener tomographischer Anwendungen verwendet. Durch die Applikation der Substanz ^{123}I -BZA2, welches an Melanin bindet und ein Gammastrahlenemitter ist, können Melanin-enhaltende Strukturen durch die SPECT visualisiert werden [89]). Der Positronenstrahler ^{18}F ICF01006 markiert spezifisch Melanin-enhaltende Melanomzellen

[90], wodurch diese in der Positronenemissionstomographie detektiert werden können. Durch die an Melanin gebundenen Metallkationen ist es möglich, anhand der Magnetresonanztomographie, Melanin-positive Bereiche zu erkennen [32,91]. Weiterhin zeichnet sich Melanin durch hohe absorbierende Eigenschaften aus. Dies ermöglicht die Detektion Melanin-enthaltender Strukturen durch die multispektrale optoakustische Tomographie [92,93]. Die Melaninsynthese ist durch das spezifische Intermediate 5-S-Cysteinyl-DOPA serologisch nachweisbar und kann bei Überschreitung eines individuellen Grenzwertes eine erste Indikation für mögliche Melanome liefern [94]. Neben der Vielfalt tomographischer Verfahren zur Melanin-Detektion, werden, hauptsächlich bei der Behandlung von schwarzem Hautkrebs, unterschiedliche therapeutische Ansätze angewandt, welche Melanin als Zielstruktur verwenden. Beispielsweise werden im Zuge einer Brachytherapie ^{125}I -gekoppelte Radionuklide [95] oder andere radioaktive Stoffe wie $^{64}\text{CuCl}_2$ [96], welche vermehrt in Melanin-synthetisierenden Zellen akkumulieren, eingesetzt. Als chemotherapeutische Agenz wurden cytotoxische Tyrosinase-Substrate wie 4-Cysteaminylphenol entwickelt [97]. Die Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melaninsynthese. Somit sind durch den Einsatz cytotoxischer Tyrosinase-Substrate hauptsächlich Zellen betroffen, die dieses Enzym überexprimieren. Dies ist bei schwarzem Hautkrebs größtenteils der Fall. Eine weitere Behandlung Melanin-haltiger Karzinome ist die Bestrahlung mit einem Nahinfrarot-Laser. Die hohe Absorption der Lichtenergie und deren Umwandlung in thermale Energie durch Melanin resultiert in einer starken Wärmeentwicklung. Dies führt zu Koagulation und zu Nekrose in den behandelten Bereichen [32]. Melanin findet also in unterschiedlichen Bereichen der Onkologie als Reporter oder Zielstruktur Anwendung.

2.4.1 Unterschiedliche Melaninformen

Natürlicherweise existiert Melanin in drei Hauptformen, dem bräunlich bis schwarzen Eumelanin, dem rötlich-gelben Phäomelanin und dem ebenfalls bräunlich-schwarzen Neuromelanin. Während Eu- und Phäomelanin hauptsächlich in Haut, Haarbulben und Augen synthetisiert werden, ist das Neuromelanin bei Menschen in der *Substantia nigra* zu finden. Das Ausgangsmolekül für die Synthese der drei unterschiedlichen Melaninformen ist L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welches in der Eu- und Phäomelaninsynthese zu DOPACHINON oxidiert bzw. in der Neuromelaninsynthese zu Dopamin decarboxyliert, hydroxiliert und anschließend methyliert wird. Diese drei Melaninpigmente bestehen aus

mehreren Untereinheiten, welche über Kohlenstoffbrückenbindungen untereinander verbunden sind. Diese starke Bindung erklärt auch den hohen Stabilitätsgrad dieser Polymere. So konnte sogar Eumelanin in Fossilien aus dem Jura nachgewiesen werden [98]. Die unterschiedlichen Melaninformen unterscheiden sich jedoch in ihrer chemischen Zusammensetzung sowie den strukturellen und physikalischen Eigenschaften. Eumelanine sind bräunlich-schwarz, polymorph, schwer löslich und eng über kovalente Bindungen mit Proteinen assoziiert. Sie haben Polyanion-Charakter und sind in der Lage Kationen, Anionen und Polyamine an freie Carboxygruppen des Makromoleküls zu binden und sind aus Dihydroxyindol-Untereinheiten aufgebaut. Im Gegensatz dazu ist Phäomelanin aus Benzothiazin-Untereinheiten aufgebaut, worauf der rötlich-gelbe Phänotyp zurückzuführen ist. Auch Phäomelanin ist eng mit Proteinen verbunden, es ist jedoch photolabil. Hierdurch bilden sich bei Lichtexposition Superoxide, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid. Neuromelanine sind Makropolymere aus Aminochrom. Sie sind bräunlich-schwarz und ebenfalls unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Andere Melaninformen können durch enzymatische Oxidation von Serotonin, Tryptophan oder Opioidpeptiden entstehen, welche sich strukturell von den klassischen Melaninformen unterscheiden [88]. Während alle Melaninformen in der Lage sind Metallionen zu binden [91], wodurch diese detoxifiziert werden, zeichnen sich die in der Haut lokalisierten Eu- und Phäomelanine hauptsächlich durch ihren photoprotektiven Effekt aus [88]. Hierbei wird durch Melanin die UV-Strahlung in thermische Energie umgewandelt und so die DNA-schädigende Wirkung abgeschwächt.

2.4.2 Melanin-Biogenese

Die Melaninsynthese findet beim Menschen hauptsächlich in der Haut, den Augen, den Haarfollikeln und der *Substantia nigra* statt. Die Synthese des Neuromelanins ist jedoch eher ein Nebenprodukt dopaminergischer Neuronen, wohingegen Eu- und Phäomelanin direkt und gezielt synthetisiert werden. Die Bildung dieser beiden kutanen Melaninformen ist auf Grund des hohen Energieverbrauchs und der teilweise cytotoxischen Wirkung stringent reguliert.

Die Melaninproduktion findet in speziellen Zellen, den Melanocyten, und dort in spezialisierten Zellorganellen, den Melanosomen, statt. Neben Organell-spezifischen Proteinen [100], zeichnet sich das Melanosom durch einen niedrigen pH-Wert aus. Dieser ist notwendig, um die melanogenen Enzyme zu aktivieren [101]. In den Melanosomen wird durch die Membran-gebundenen Enzyme Tyrosinase (Tyr), Tyrosinase-Helferprotein 1 (Typr1) und

Dopachrom-Tautomerase (DCT) aus L-Tyrosin das Polymer Melanin geformt. In einem ersten Schritt wird L-Tyrosin durch Tyrosinase hydroxiliert, wodurch L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) entsteht. Dem folgt die Oxidation des L-DOPA zu L-DOPachinon (DQ) [102], ebenfalls katalysiert durch Tyrosinase. Cooksey et al. [103] zeigten, dass DQ auch direkt durch Oxidation von L-Tyrosin durch die Tyrosinase gebildet wird. Ist eine Schwefelquelle, wie Cystein verfügbar, wird bevorzugt Phäomelanin produziert. Erst wenn dieses verbraucht ist oder das schwefelhaltige Intermediat 5-S-CysteinylDopa über einem bestimmten Grenzwert [104] liegt, beginnt die Dopachrom-Synthese, welche in der Produktion von Eumelanin resultiert.

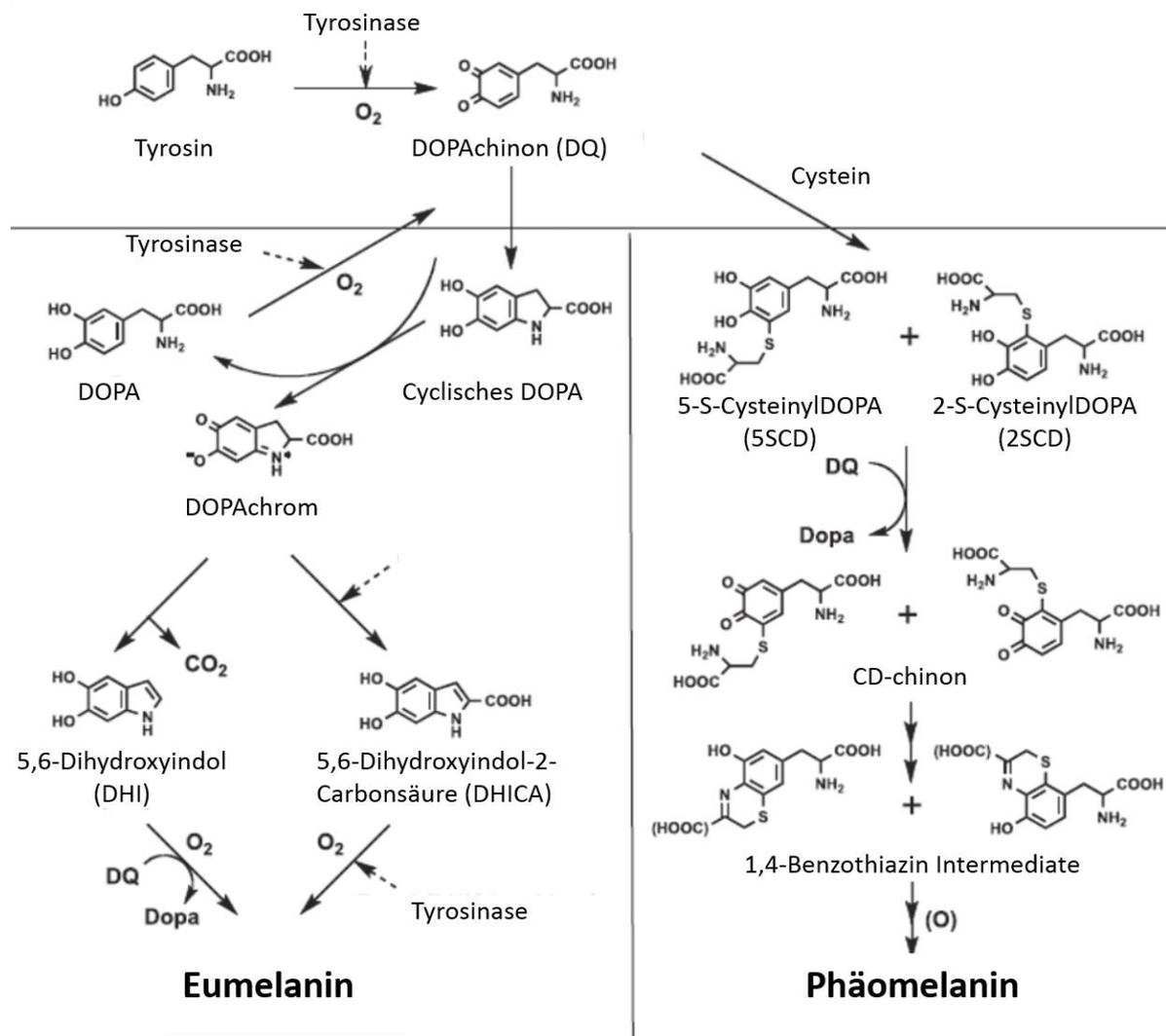


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Melanin-Biogenese nach Simon et al. [102].

Ist Cystein verfügbar, führt dies zu Phäomelanogenese. Hierbei wird aus DQ im Verhältnis 5:1 das 5-S-CysteinylDopa (5SCD) und das 2-S-CysteinylDopa (2SCD) gebildet. Nach einem

Redoxaustausch zwischen 5SCD und DQ wird DOPA und Cysteinyl-dopachinon (CD-chinon) gebildet. Durch Dehydrierung und darauf folgenden Ringschluss wird im Verhältnis von 85:15 7-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-5-Hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin (BT) und 7-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-5-Hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin-3-Carbonsäure (BTCA) gebildet. BT und BTCA sind die monomeren Vorstufen des Phäomelanins [102].

Steht kein Cystein zur Verfügung läuft Eumelanogenese ab. Dabei wird aus DOPA bzw. cyclischem DOPA DOPACHROM gebildet. Bei neutralem pH zerfällt dieses durch Decarboxylierung zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) und 5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure (DHICA). In Gegenwart der DCT, also im Melanosom, entsteht vorzugsweise DHICA durch Tautomerie. DHI und DHICA sind die monomeren Vorstufen des Eumelanins. Die DHI-Monomere werden durch Redoxaustausch mit DQ untereinander vernetzt. Die DHICA-Monomere werden hingegen durch Oxidation, katalysiert durch Tyrosinase, miteinander verbunden [102]. Das humane Tyrp1 hat keine bisher bekannten katalytischen Aufgaben während der Eumelanogenese. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein am gerichteten Transport der Tyrosinase zum Melanosom entscheidend beteiligt ist und im Melanosom als stabilisierender Kofaktor der Tyrosinase fungiert [105].

2.5 Ziel dieser Arbeit

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Melanin eine geeignete Zielstruktur für verschiedene tomographische Anwendungen [83,89-91,94], wie auch für unterschiedliche therapeutische Ansätze [95-97] ist.

Diese Eigenschaften des Melanins sollten mit den onkolytischen Eigenschaften des Vaccinia-Virus kombiniert werden, um ein auf Vaccinia-Virus-basierendes melanogenes Reportersystem für eine diagnostische und therapeutische Anwendung in onkologischen Studien bereitzustellen. Hierzu sollte das Schlüsselenzym der Melanogenese, die Tyrosinase, solitär oder in Kombination mit dem Tyrosinase-Helferprotein 1 (Tyrp1) unter der Kontrolle unterschiedlich starker Vaccinia-Virus-spezifischer Promotoren in den TK-Lokus des viralen Genoms inseriert werden. Im Zuge dieser Arbeit sollten in einem ersten Ansatz die geeignetsten rekombinanten Vaccinia-Virus-Konstrukte (rVACV) bezüglich melanogener und onkolytischer Eigenschaften in Zellkultur ermittelt. Diese sollten anschließend *in vivo* in Tumor-Xenotransplantat-tragenden Mäusen bezüglich Melaninproduktion und anti-Tumor-Effekt analysiert werden. Zusätzlich sollte der Ort der viral vermittelten Melaninsynthese

ermittelt sowie das nach rVACV-Infektion gebildete Melanin auf atomarer Ebene analysiert werden. Desweiteren sollte das durch Infektion mit melanogenen rVACV in Krebszellen synthetisierte Melanin als mögliches Reportermolekül für die optoakustischen Tomographie *in vivo* evaluiert werden. Falls möglich, sollte das therapeutische Potenzial des melanogenen rVACV-Systems bei gleichbleibendem tomographischen Potential auf genetischer Ebene verbessert werden. Hierzu sollte ein rVACV-Konstrukt mit *tet*-System regulierter Tyrosinase-Expression bezüglich dessen therapeutischen und diagnostischen Potentials evaluiert werden. Dies sollte die energieaufwändige Melaninsynthese ausschließlich nach Induktion ermöglichen. Desweiteren sollte durch eine Kombinationstherapie aus Nahinfrarot-Laser-assoziiertes thermaler Ablation (NIR-LATA) und onkolytischer Virustherapie, die therapeutische Effizienz melanogener rVACV erhöht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin aus Rinderserum	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxiddisulfat	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Blastizidin	PAA, A-Pasching
1x Balanced Salt Solution	PAA, A-Pasching
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM High Glucose (4,5 g/L)	PAA, A-Pasching; Sigma-Aldrich, Steinheim; XX
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethylendiamintetraessigsäure	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Ethanol (p.a.)	Riedel deHaen, Seelze
Flüssigkeitsbeutel Whirl-Pak	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum	PAA, A-Pasching Material; XX
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hygromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumferrocyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhexacyanoferrat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Melanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Orthophosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
1x Phosphate Buffered Saline)	PAA, A-Pasching; Sigma-Aldrich, Steinheim
Phusion Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
10x Phusion Polymerase Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Germany
Penicillin/Streptomycin	PAA, A-Pasching Material; Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteaseinhibitoren-Mix Complete Mini	Roche, US-Indianapolis
RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching; XX
Saccharose	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Fluka, CH-Buchs
Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide	Fluka, CH-Buchs
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA, A-Pasching; Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Tyrosinase (Pilzlichen Ursprungs)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Darmstadt

3.2 Puffer und Lösungen

Einfriermedium

900 µl Kulturmedium

100 µl DMSO

Infektionsmedium

DMEM oder RPMI 1640

2% FKS

1% Penicillin/Streptomycin

Paraformaldehyd (PFA)

4 g PFA in warmem ddH₂O lösen

NaOH zugeben bis Lösung sich klärt

1 mL 10x PBS

Add ddH₂O auf 100 mL

pH 7,4

1x PBS

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄ • 12 H₂O
1,5 mM KH₂PO₄

Bestimmung des Substratumsatzes

1 x Bradford-Lösung

50 mg Coomassie Brilliant Blue G250
25 mL Ethanol (96%)
50 mL Phosphorsäure (85 %)
Add ddH₂O auf 550 mL

KH₂PO₄-Stammlösung

9,078 g Kaliumhydrogenphosphat
Add 1 L ddH₂O

Na₂HPO₄-2H₂O-Stammlösung

11,876 g Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
Add 1 L ddH₂O

Phosphatlysepuffer

49,2 mL Na₂HPO₄-2H₂O-Stammlösung
51,8 mL KH₂PO₄-Stammlösung
1 % Triton X 100
pH 6,8

RIPA Lysepuffer

50 mM Tris
150 mM NaCl
0.1% SDS
0.5% Natrium-deoxycholat
1% Triton X 100 oder NP-40
Protease Inhibitor
pH 7,4

MTT-Medium

2,5 mg/mL MTT in farblosem FKS freiem
Wachstumsmedium gelöst, anschließend
sterilfiltriert (0,45µm Filter)

Plaque Assay

CMC-Medium

15 g CMC

Add 1 L DMEM 10 % FBS 1 % Antibiotika

Infektionsmedium

98 % DMEM

2 % Fötales Kälberserum (FKS)

900 µl Aliquot

Kristallviolett-Lösung

1,3 g Kristallviolett

50 mL Ethanol (96 %)

300 mL Formaldehyd (37 %)

650 mL ddH₂O

Western Blot

1,5 M Tris Puffer pH 8,8

180 g Tris

Add ddH₂O auf 1 L

pH einstellen mit HCl

0,5 M Tris Puffer pH 6,8

30 g Tris

Add ddH₂O auf 0,5 L

pH einstellen mit HCl

10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)

5 g SDS

50 ml ddH₂O

10% APS (Ammonium Persulfat)

1 g APS

10 mL ddH₂O

in 0.5 mL Aliquots und bei -20 °C aufbewahrt

ECL

Lösung 1 90 mM (0,5 mL) p-Cumarsäure

Lösung 2 250 mM (1 mL) Luminol

Lösung 3 1 M (20 mL) Tris-HCl, pH 8,5

Add ddH₂O auf 200 mL

Vor Gebrauch 3 μl H_2O_2 zu 10 mL ECL-Lösung geben

5x Laemmlipuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8
 25 % (v/v) SDS
 5 mM Na₂EDTA
 0,5 % β -Mercaptoethanol
 1 % Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer

440 mM Tris-HCl, pH 6,8
 2 M Glycin
 1,5 % (w/v) SDS
 pH 8,2

1x Towbin-Puffer

25 mM Tris-Base
 192 mM Glycin
 20 % (v/v) Methanol

3.3 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Anbieter
Anti-humane Tyrosinase (sc7833)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA
Anti-beta-Glucuronidase (G5420)	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany
Anti-beta-Aktin (ab6276)	Maus	Abcam, Cambridge, UK
Anti-RFP (AB231)	Kaninchen	Evrogen, Moskau, Russland
Anti-GFP (sc8334)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA
Anti-TetR (Clone 9G9)	Maus	Clontech, Mountain View, USA
Anti-Tyrp1 ??	Kaninchen	Aviva System, San Diego, USA
Sekundäre Antikörper (HRP gekoppelt)		
Anti-Maus (ab6728)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Hase (ab6721)	Ziege	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Ziege (ab6741-1)	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK

3.4 Verwendete Kits

Plasmid Miniprep Classic	Zymo Research
DNA Clean and Concentrator	Zymo Research
Wizard SV-Gel and PCR Clean Up	System Promega
GeneCellin (Tranfektions-Reagenz)	BCC (Bio Cell Challenging), FR-Toulon

3.5 Zelllinien und -Kulturmedien

3.5.1 Zelllinien

A549	adhärent wachsende humane Lungenkarzinomzellen
CV-1	adhärent wachsende Fibroblasten ähnliche Nierenzellen der grünen Meerkatze
PANC-1	adhärent wachsende humane Pankreaskarzinomzellen
PC-3-RFP-Zellen	Rot fluoreszierendes Protein- (RFP) exprimierende PC-3-Zellen (Hergestellt von U. Donat)

3.5.2 Zellkulturmedien

A549	500 mL RPMI 1640 High Glucose (4,5 g/L) 50 mL FKS 5,5 mL Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
CV-1	500mL DMEM High Glucose (4,5 g/L) 50mL FKS 5,5 mL Penicillin/Streptomycin
PANC-1	500 mL DMEM High Glucose (4,5 g/L) 50 mL FKS 5,5 mL Penicillin/Streptomycin

PC3-RFP	500 mL RPMI 1640 High Glucose (4,5 g/L)
	50 mL FKS
	5,5 mL Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)
	1 µg/mL Blasticidin

3.6 Versuchstiere

Für sämtliche *in vivo* Versuche wurden athymische Nacktmäuse der Firma Harlan, Rossdorf, Deutschland bzw. Livermore, USA verwendet. Die Hsd:Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*-Mäuse zeichnen sich durch eine autosomal rezessive Mutation im *Foxn1_{nu}*-Lokus auf Chromosom 11 aus. Diese führt zu einem haarlosen Phänotyp und zu einer dysfunktionalen rudimentären Entwicklung des Thymus, woraus eine T-Zell-Suffizienz resultiert. Auf Grund derer kommt es zu keiner Abstoßungsreaktion bei Implantation eines Xenotransplantats. Da die Verwendung von Krebsmodellen menschlichen Ursprungs unerlässlich für die Erforschung onkolytischer Viren ist, eignet sich dieser Maustyp als ideales Versuchstier.

Alle Versuchstiere wurden als Gruppen in separaten, sterilen Käfigen mit steriler Einstreu und bestrahltem Nagetierfutter nach den Richtlinien der Regierung von Unterfranken und der *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) von Explora Biolabs (San Diego, USA) gehalten.

3.7 Rekombinante Viruskonstrukte

In dieser Arbeit wurden verschiedene rekombinante Viruskonstrukte verwendet, welche freundlicherweise von Genelux zur Verfügung gestellt wurden. Der genetische Hintergrund der unterschiedlichen Konstrukte wird im Folgenden aufgezählt. GLV-1h68 wurde mittels zielgerichteter Mutagenese des ursprünglichen Vaccinia-Virus LVP konstruiert [61]. Das rekombinante Vaccinia-Virus (rVACV) GLV-1h68 diente allen weiteren hier aufgeführten rVACV (Abb. 6) als parentales Konstrukt. Während in die rVACV GLV-1h322, und GLV-1h324 das murine Hauptenzym der Melaninsynthese, die Tyrosinase (mTyr), und das humane Tyrosine-Helferprotein 1 (Tyrp1) in den Thymidinkinase-Lokus (TK-Lokus) inseriert wurden, wurde bei den Konstrukten GLV-1h326 und GLV-1h327 nur die murine Tyrosinase in den TK-Lokus eingefügt. Die Expression der genannten Gene wird reguliert durch die Vaccinia-Virus-

spezifischen Promotoren P_{SE} und P_{SEL} [32]. Weiterhin wurde ein Doxycyclin-induzierbar melanogener rVACV generiert (GLV-1h462). Als parentales Konstrukt wurde das Konstrukt GLV-1h312 verwendet. Dieses Vaccinia-Virus Konstrukt kodiert für den Tet-Repressor unter Kontrolle des Vaccinia-Virus-spezifischen Promotors $P_{7.5}$ im F14.5L-Lokus. Im TK-Lokus ist ein Fusionsgenkonstrukt aus *Luciferase/RFP* inseriert, das durch den P_{SL} -Promotor mit nachgeschalteter *tet*-Operatorsequenz reguliert wird. In dem Konstrukt GLV-1h462 wurde das Fusionsgenkonstrukt *Luciferase/RFP* im TK-Lokus durch die Gensequenz der murinen Tyrosinase ersetzt. Als Kontrollvirus wurde GLV-1h460 erzeugt, welches anstatt des *tetR*-Gens im F14.5L-Lokus für das Fusionsgenprodukt *Ruc-GFP* kodiert und somit *mTyr* konstitutiv exprimiert [Kirscher *et al. submitted* 2014].

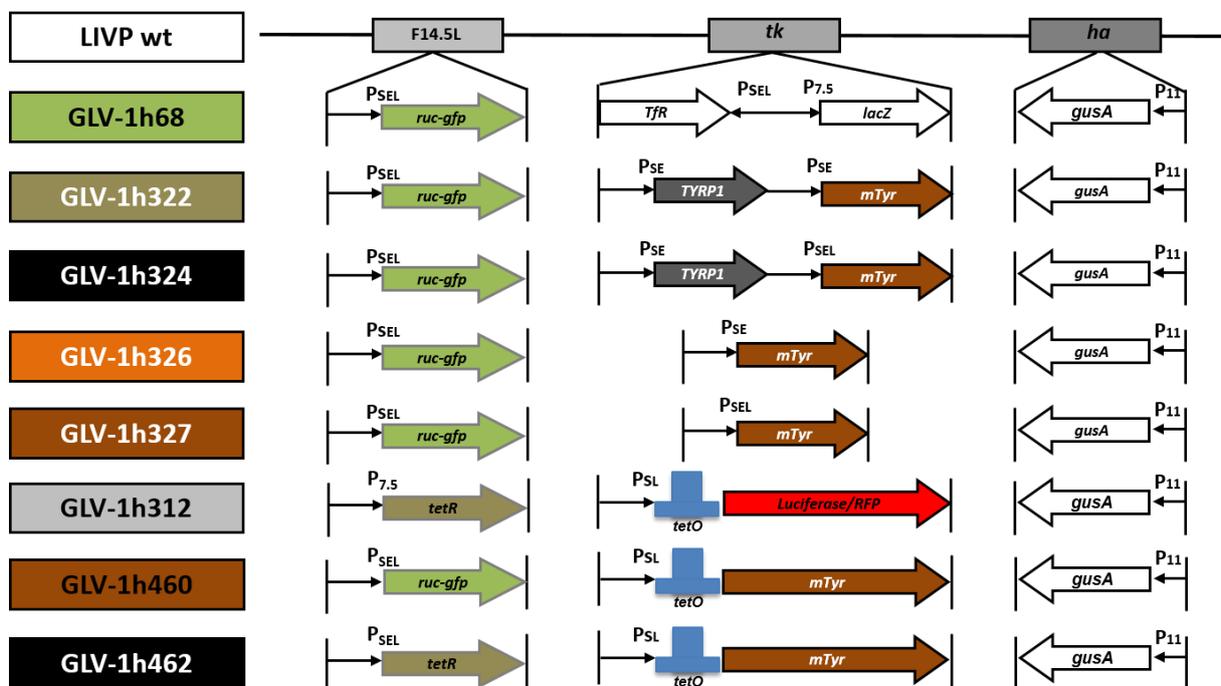


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Expressionskassetten der verwendeten rekombinanten Vaccinia-Viren

3.8 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Hersteller
37 °C Inkubationsschrank	Memmert, Schwabach
37 °C Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen CH
ChemiDox XRS+	BioRad, München
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filmkassette	Dr. Goos suprema, Heidelberg
Filterspitzen	Hartenstein, Würzburg

Flow-Hood	LaminAir Kendro, Langenselbold
Geldokumentation	PeqLab, Erlangen
Glaswaren	Schott, VWR Brand
Kanülen	Braun, CH-Emmenbrücke
Cryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco Heraeus, Hanau
Maestro EX Imaging System CRI,	US-Woburn Material
Mini-PROTEAN Elektrophoresis System	BIO-RAD, München
Inverses Mikroskop (Axiovert 200M)	Zeiss, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Power-Pac Basic	BioRad, München
Reagenzgefäße: 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße: 15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilme	Konica, München
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Semi-Dry Blotapparatur	Peqlab, Erlangen
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
Infinite 200 PRO NanoQuant	Absorbance Reader Tecan, Crailsheim
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Schüttler	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Vortex Labinco,	NE-Breda
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturinkubatoren	RS Biotech, UK-Irvine
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Schwerin

3.9 Verwendete Software

Axiovision 4.5	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Zeiss)
C Flow Plus	Auswertung FACS-Ergebnisse
Microsoft Excell 2013	Diagramme und Statistik
Microsoft Word 2007/2013	Textverarbeitung
Magellan	Auswertung der Absorbations- und Kinetikmessungen am Tecan

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood durchgeführt. Die Kultivierung aller eukaryontischen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen und -platten verschiedener Größe in einem sensorgesteuerten Inkubator, welcher optimale Wachstumsbedingungen (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) garantierte. Alle Gegenstände wurden vor der Verwendung unter der Sterilbank mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zudem wurde zur Vorbeugung gegen bakterielle Kontamination den Medien ein Antibiotikum zugefügt (Penicillin/Streptomycin). Alle verwendeten Zelllinien wurden bis zum Erreichen der Konfluenz inkubiert und anschließend passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Zellkulturflaschenboden adhärent wachsenden Zellen mit Hank's BSS gewaschen, wodurch abgestorbene Zellen und Mediumreste entfernt wurden. Daraufhin wurde Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und bis zu deren Ablösung bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet Peptidbindungen hinter den Aminosäuren Lysin, Arginin oder modifiziertem Cystein, wodurch die proteolytische Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche hervorgerufen wird. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von frischem Medium gestoppt, da dieses die Trypsin-Inhibitoren Calcium und Magnesium enthält. Zellkontakte wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Die so entstandene Zellsuspension konnte nun weiter kultiviert werden. Dafür wurde je nach Bedarf in einem bestimmten Verhältnis die Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Der im Medium enthaltene pH-Indikator zeigt durch einen Farbumschlag von rot nach gelb den fortschreitenden Verbrauch der Nährstoffe im Medium an. Jede Zelllinie wurde in einem, für diese optimalem Medium, kultiviert.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Für verschiedene Versuche sowie das Passagieren der Zellen war eine genaue Bestimmung der Zellzahl notwendig. Zu diesem Zweck wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt, ein Objektträger, welcher über ein eingeeätztes Gitternetzwerk verfügt. Mit dem aufgelegten

Deckgläschen ergibt sich ein definiertes Flüssigkeitsvolumen, in welchem sich die Zellen befinden. Das Gitter besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate eingeteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wurde aus jedem großen Quadrat jeweils eine Reihe aus 4 kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor der Suspension}$$

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Bei Konfluenz von 90-100 %, wurden die Zellen mit Hank's BSS gewaschen und mittels Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl ermittelt und die Zellsuspension bei 2000 x rpm, für 5 min zentrifugiert. Durch Aufnahme des Zellpellet in einem entsprechendem Volumen Einfriermedium, wurden Aliquots mit 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/mL in Cryoröhrchen gefüllt. Diese wurden über Nacht bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Zellen für ca. 30 s in einem Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nachdem die Zellsuspension angetaut war, wurde diese in eine bereits mit Kulturmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

4.2 Virologische Methoden

4.2.1 *In vitro* Infektion eukaryontischer Zellen mit rVACV

Im Vorfeld einer Infektion wurden die Zellen auf das Gefäß (6, 12 oder 24 Well Platte) ausgesät und inkubiert bis sich eine Konfluenz $>90 \%$ einstellte. Am Tag der Infektion wurde ein Well mittels Tyrpsinierung geerntet und gezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde anschließend verwendet um die benötigte Virus-Menge (in μl) für unterschiedliche MOIs (*multiplicity of infection*) zu ermitteln. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Virusmenge} = \frac{\text{ermittelte Zellzahl} \times \text{MOI} \times \text{Anzahl der Wells}}{\text{viralen Titer} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right)}$$

Die virale Stammlösung wurde vor Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut, 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und die berechnete Menge der viralen Stammlösung anschließend in das benötigte Volumen Infektionsmedium überführt. 250 µl/Well dieser Lösung wurden, nach Entfernen des Wachstumsmediums, auf den Zellrasen gegeben. Anschließend wurde nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ das Infektionsmedium abgenommen und durch Wachstumsmedium ersetzt.

4.2.2 Replikationsassay

Zur Analyse der replikativen Eigenschaften der verwendeten rVACV-Konstrukte in unterschiedlichen Tumorzelllinien wurden diese kultiviert und nach Aussaat in 24 Well Platten infiziert. Zu den Zeitpunkten 2, 6, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Infektion (hpvi) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Zellrasen durch 250 µl 1 x Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, die Reaktion mit 750 µl Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Mikrogefäß mit Verschluss überführt. Diese Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Vor der Titrierung der jeweiligen Probe wurde diese dreimal einem Auftau-Einfrier-Zyklus unterzogen und je dreimal 30 s sonifiziert. Zu jedem Zeitwert wurden Triplikate untersucht.

4.2.3 Standard Plaque Assay

Mittels des Standard Plaque Assay wird der virale Titer, definiert als *plaque forming units* pro Milliliter (pfu/mL), einer Probe ermittelt. Hierfür wurde ein einschichtiger Zellrasen CV-1-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert und anschließend mit seriellen Verdünnungen einer viralen Probe infiziert. Nach Inkubation für ein definiertes Zeitintervall wurde jedes Well mit halbfestem Medium (z.B. CMC) überschichtet. Hierdurch wurde die Diffusion der viralen Partikel durch das Medium verhindert, wodurch eine Verbreitung ausschließlich von Zelle zu Zelle möglich ist. Die nahezu radiale Ausbreitung der viralen Partikel, ausgehend von der primär infizierten Zelle und die damit einhergehende Zellyse ist als Plaque definiert. Dieser wird nach Färbung mit Kristallviolett visuell sichtbar. Zur Bestimmung des viralen Titers wurde angenommen, dass ein Plaque auf einen einzigen Viruspartikel zurückzuführen ist. Es wurden 1×10^5 CV-1-Zellen 24 h vor Versuchsstart bzw.

3×10^4 3 Tage zuvor in 24-Well-Platten ausgesät. Die zuvor gesammelten viralen Proben wurden 1:10 in Infektionsmedium (DMEM, 2 % FKS) seriell bis zu einer gewünschten Stufe verdünnt. 250 μ l jeder Verdünnung wurde im Duplikat auf CV-1-Zellen gegeben, 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit CMC-Medium überschichtet. Nach 2tägiger Inkubation wurde mit 300 μ l Kristallviolett gefärbt, gewaschen mit H₂O und die Anzahl der Plaques bestimmt. Der jeweilige Titer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Titer} = \frac{\text{gezählte Plaques [pfu]}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{eingesetztes Volumen (mL)}}$$

4.3 Mäuse

4.3.1 Implantation der Krebszellen

Sämtliche Tierversuche wurden an 5-6 Wochen alten, athymischen Nacktmäusen durchgeführt. Die zu implantierenden Karzinomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Zum Zeitpunkt der Implantation wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und durch Zentrifugation (800 x rpm, 5 min) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden je Maus 5×10^6 A549, 2×10^6 PC3-RFP bzw. 4×10^6 PANC-1 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert. Nach Desinfektion mit Alco-Preps wurde die Zellsuspension subkutan in die rechte, hintere Flanke der Maus injiziert. Die Injektion wurde mit einer 29G_{1/2} Insulinspritze durchgeführt. Unter zu Hilfenahme einer digitalen Schublehre wurde das Tumorwachstum sowie das Gewicht als Marker des Gesundheitszustandes in regelmäßigen Abständen kontrolliert und dokumentiert. Die Tumorgroße wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorvolumen} = (\text{Länge} \times \text{Breite}^2) \times 0,52$$

4.3.2 Injektion des rVACV

Durch die Injektion des jeweiligen rVACV sollte *in vivo* zum einen die therapeutische Wirkung auf verschiedene Tumormodelle untersucht und zum anderen das diagnostische Potential des neu entwickelten melanogenen Reportersystems evaluiert werden. Hierzu wurde einmalig 5×10^6 pfu/Maus in 100 μ l PBS des jeweiligen rVACV intravenös (i.v.) in die Schwanzvene oder retroorbital (r.o.) in den Retro-orbitalen Venensinus injiziert. Die Injektion erfolgte ca. 5-6 Wochen nach Implantation der PC3-RFP-Tumorzellen oder bei einem Tumorvolumen von

~200mm³ bei A549- oder PANC-1-Tumor-Xenotransplantaten. Der zu untersuchende rVACV wurde vor Injektion aufgetaut und, um Virusaggregate zu lösen, 30 s gevortext. Die Mäuse wurden vor der Virus-Injektion 10 min mit einer Infrarot-Wärmelampe aufgewärmt um die Gefäße zu weiten. Anschließend wurde die Injektionsstelle mit Alco-Preps desinfiziert und 100 µl der Virus-Suspension i.v. in die Schwanzvene injiziert. Vor und während der r.o. Injektion wurden sämtliche Mäuse mit Isofluran narkotisiert.

4.3.3 Tumorentnahme

Am Ende eines Mausversuchs wurden die Mäuse durch CO₂ Inhalation euthanasiert und anschließend die Tumore entnommen. Diese wurden bei -80 °C gelagert oder über Nacht in 4 % Pfa fixiert, anschließend 3-5 h 3malig mit PBS gewaschen und bei 4 °C gelagert.

4.3.4 Blutentnahme

Um die virale Aktivität *in vivo* zu bestimmen wurde die *E. coli* beta-Glucuronidase-Aktivität im Blutserum der behandelten und der Kontrollmäuse gemessen. Hierzu wurde die Vena-saphena am hinteren linken Bein, nach Desinfektion mit Alco-Preps, durch Punktion geöffnet und 10-100 µl Blut mit BD Microtainer SST Tubes aufgefangen.

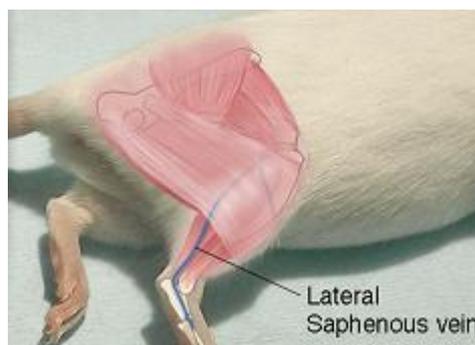


Abbildung 7: Schematisch anatomische Darstellung der lateralen Vena-saphena [106]

Nach Koagulation erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x rpm für 20 min bei 4 °C. Anschließend wurde das Plasma von den Blutzellen getrennt und bei -80 °C gelagert.

4.3.5 Narkose

Die Mäuse wurden durch Inhalationsbetäubung mit 1,5-3 % Isofluran narkotisiert. Isofluran ist ein leichtflüchtiges Anästhetikum mit hypnotischer und muskelrelaxierender Wirkung. Isofluran wurde den Versuchstieren in eine Inhalationskammer verabreicht, in welcher das Narkosemittel-Sauerstoff-Gemisch in Gasform eingelassen wurde. Da Isofluran einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten hat, findet eine rasche Reaktion auf steigende oder sinkende Isofluran-Konzentration statt.

4.4 Diagnostische Methoden

4.4.1 Biomarker-Expressionsanalyse mittels Western Blot

Das zu untersuchende Material wurde mittels RIPA-Puffer lysiert. Anhand eines Bradford-Tests [107] wurde die Proteinkonzentration ermittelt und mit Lysepuffer equilibriert. Die gewünschte Proteinmenge wurde im Verhältnis 5:1 mit 5x Laemmli-Puffer gemischt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Diese Proben wurden anschließend entweder sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert. Zur Analyse der im Lysat enthaltenen Proteine wurden diese über ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Herstellung der SDS-PAGE wurde die Mini-PROTEAN Tetra Cell verwendet. Die Gele wurden nach folgender Rezeptur angefertigt:

Reagenz	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
ddH ₂ O	4,1 ml	3,05 ml
30% Acryl/Bisacryl	3,3 ml	0,65 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml	--
0,5M Tris pH 6,8	--	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Nach Polymerisation der Gele wurden diese in das Mini-PROTEAN-Elektrophoresis-System eingespannt, die Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt, die zu untersuchenden Proben in die Gel-Taschen geladen und bei 110 V 1-2 h aufgetrennt. Zur späteren Größenbestimmung der Proteine wurde eine Gel-Tasche pro Gel mit dem Page Ruler Prestained Proteinmarker (10 –

170 kDa, Fermentas) befüllt. Zur genaueren Analyse wurden die in der Gelmatrix fixierten Proteine elektrophoretisch in einer Semi-Dry-Blotapparatur auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran übertragen, wo diese durch hydrophobe Wechselwirkung haften [108]. Die Nitrocellulosemembran wurde auf zwei Towbin-Puffer-getränkte Whatman-Filterpapiere derselben Größe gebettet. Auf die Transfermembran wurden die Gelmatrix und oben auf wiederum zwei Towbin-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt. Anschließend wurden die Proteine aus der Gelmatrix elektrophoretisch auf die Membran übertragen (1-2 h). Die anzulegende Stromstärke für den Proteintransfer hängt von der Größe des Gels ab und berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Stromstärke } I \text{ (mA)} = \text{Fläche des Gels (cm}^2\text{)} \times 0,8$$

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurden die Proteine durch Immundetektion nachgewiesen. Zuerst wurden freie Antikörper-Bindestellen blockiert, indem die Membran mindestens 1 h in 5 % Milchpulver/PBS bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBST (0,1 % Tween 20) gewaschen. Nach diesem Schritt wurde ein antigenspezifischer Primär-Antikörper, welcher an Epitope des gesuchten Proteins bindet, nach Herstellerinformationen in PBST verdünnt und die Membran in dieser Primär-Antikörperlösung 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Transfermembran wieder dreimalig je 10 min mit PBST gewaschen. Nach dem Waschschrift, wurde ein Sekundär-Antikörper-PBST-Gemisch, welches nach Herstellerangaben hergestellt wurde, über die Membran gegeben und 1,5 – 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundär-Antikörper bindet an den konstanten Bereich des Primär-Antikörpers und ist ein HRP- (*horseradish peroxidase*) gekoppelter Antikörper. Das Enzym HRP oxidiert Luminol zu 5-Aminophtalsäure in Gegenwart von H₂O₂ als Oxidationsmittel. Dies führt zu einer Lichtemission. Zum Proteinnachweis wurde eine ECL-Lösung auf die Membran gegeben und die Lichtemission nach 1minütiger Inkubation durch den BioRad Detektor ChemiDox XRS+ nachgewiesen.

4.4.2 MTT-Assay zur Bestimmung der Überlebensrate von eukaryontischen Zellen

Ein MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]-Assay dient zur Bestimmung der Überlebensrate von Zellen. Es lassen sich Aussagen über Proliferation und Aktivität von Zellen sowie die Cytotoxizität von Stoffen treffen [109]. Hierzu wurden 1x10⁴ Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden unter optimalen

Wachstumsbedingungen (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert und je nach Versuchsaufbau, das Medium zu einem definierten Zeitpunkt durch 0,25 ml MTT-Lösung ersetzt. Anschließend folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 2-4 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach dieser Inkubation wurde die MTT-Lösung abgenommen. Die 24-Well-Platte wurde bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt oder das Sediment sofort in 1 ml 1N HCl/Isopropanol gelöst. Die optische Dichte bei 570 nm jener Lösung wurde in einem TECAN SUNRISE ELISA-Reader ermittelt.

4.4.3 Durchflusszytometrische Analyse rVACV-infizierter Zellen

A549-Krebszellen wurden auf eine 6-Well-Platte ausgesät, bis ~90 % Konfluenz inkubiert und mit den zu untersuchenden rVACV-Konstrukt mit einer MOI 1,0 im Triplikat infiziert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mit 500 µl HBSS gewaschen, mit 500 µl 1xTrypsin/EDTA trypsinisiert und mit 500 µl Wachstumsmedium abgestoppt. Anschließend wurde 2 min bei 4000 x rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 500 µl HBSS gewaschen. Diese Zellsuspension wurde wiederum bei 4000 x rpm 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl 4 % Pfa resuspendiert und für 7 min bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde 3mal mit 500 µl HBSS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Zellsuspension bei 4000 x rpm für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Pfa-fixierten Zellen in PBS 2 % FKS aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C gelagert. Die Fluoreszenzintensität, der zu den jeweiligen Zeitpunkten fixierten Proben, wurde mit dem BD Accuri Flow Cytometer und der C-Flow Plus Software bestimmt. Die GFP-Fluoreszenzintensität wurde mit dem Filter 530/30 nm ermittelt.

4.4.4 beta-Glucuronidase Aktivitätsmessung

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten rVACV-Konstrukte tragen das *Escherichia coli* beta-Glucuronidase-Gen *gusA*. Dessen Genprodukt wird nicht sekretiert und ausschließlich durch Zelllyse freigesetzt. Aus diesem Grund lassen sich anhand der *E. coli* beta-Glucuronidase-Konzentration Rückschlüsse auf die virale Replikation und die Onkolyse ziehen. Die Messung der GusA Aktivität wurde nach Hess *et al.* [110] durchgeführt.

4.4.5 Bestimmung des Melaningehalts

Zur Bestimmung des Melaningehalts wurde Melanin-enthaltendes Material nach einem modifizierten Protokoll nach Hirosaki *et al.* [105] analysiert. Hierzu wurde das zu untersuchende Material in 1 M NaOH aufgenommen und bei 99 °C inkubiert bis zur vollständigen Lösung des Materials. Diese Lösung wurde abgekühlt und 200 µl in eine 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 475 nm mittels eines Sunrise Absorbance Reader (Tecan) ermittelt. Die, nach Abzug der Hintergrundabsorption des zu untersuchenden Materials, ermittelte optische Dichte bei 475 nm wurde als Maß des Gesamtmelaningehalts angesehen.

4.4.6 Bestimmung der L-DOPA-Umsatzrate

Um die Aktivität der exprimierten murinen Tyrosinase zu bestimmen, wurde der Substratumsatz des L-Dihydroxyphenylalanin ermittelt. Durch den katalytischen Umsatz dieses Tyrosinase-Substrats wird Melanin gebildet. Daraus resultiert ein Anstieg der optischen Dichte bei 475 nm über die Zeit. Die Messung der ΔOD_{475} über ein Zeitintervall dient demzufolge als ein Maß der Tyrosinase-Aktivität. Zur Bestimmung der Enzym-Aktivität wurden rVACV-infizierte Tumorzellen zum Zeitpunkt der Messung in Phosphat-Lysepuffer lysiert und in ein 1,5 ml-Reagenzglas überführt. Um Zellbestandteile zu entfernen wurde für 2 min bei 10.000 x rpm zentrifugiert. Anschließend wurde mittels Bradford-Test die Proteinkonzentration ermittelt und jeweils angeglichen. 180 µl des jeweiligen Zelllysats wurden in eine 96-Well-Platte überführt und mit 20 µl einer 10 mM L-DOPA Phosphat-Lysepuffer-Lösung bei Raumtemperatur koinkubiert. Die ansteigende OD_{475} wurde über 2 h in 10 Minuten Intervallen an einem Absorptions-Messgerät detektiert. Die enzymale Umsatzrate (V_{max}) wurde definiert als der Anstieg der OD bei 475 nm über das gemessene Zeitintervall.

4.4.7 Fluoreszenz-Mikroskopie von Zellen

Deckgläschen wurden mit 1 N HCl vorbehandelt und bei 100 °C über Nacht desinfiziert. Diese wurden auf eine 12-Well-Platte verteilt, mit der gewünschten Zellzahl der zu untersuchenden Zellen in Wachstumsmedium überschichtet und für 24 h bei 37 °C 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit den Vaccinia-Viren GLV-1h68, GLV-1h324 oder GLV-1h327

infiziert. A549-Zellen wurden mit einer MOI 0,5 infiziert und für 4 Tage in einem Brutschrank inkubiert. PC3-RFP-Zellen wurden mit einer MOI 0,1 infiziert und für 5 Tage in einem Brutschrank belassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl 4 % Paraformaldehyd ersetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Um das Paraformaldehyd zu entfernen wurde mit 1x PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die fixierten Zellbewachsenen Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol eingebettet. Diese Präparate wurden an einem Inverse-Mikroskop (Axiovert 200M) mit Fluoreszenzfiltern (RFP und GFP) sowie im Durchlicht analysiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Zeisskamera Typ MRm und Farbaufnahmen mit einer Zeisskamera Typ MRc5 aufgenommen und mit der Software Axiovision 4.5 bearbeitet.

4.4.8 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die in dieser Arbeit beschriebenen MRT-Analysen wurden von J. Stritzker in Kooperation mit M. Scadeng durchgeführt und zur Auswertung für diese Arbeit freigegeben. Diese Daten wurden als Standard der Tiefengewebe-Tomographie verwendet um einen Vergleich mit der neuartigen Anwendung, der multispektralen optoakustischen Tomographie (MSOT), zu ermöglichen.

4.4.9 Optoakustische Analyse

Alle optoakustischen Messungen wurden am Helmholtz Zentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt) in Zusammenarbeit mit dem *Institute of Biological and Medical Imaging* (IBMI) durchgeführt.

4.4.9.1 Multispektrale optoakustische Tomographie (MSOT)

Die tomographischen Daten wurden, wie bei Stritzker *et al.* [32] beschrieben, anhand des *inVision128 small animal imaging system* (iThera) mit einer Auflösung von 150 µm aufgenommen. Mittels eines Nd:Yttrium-Aluminiumgranat Lasers werden kurze, im Nanosekunden-Bereich liegende, Laserimpulse aus dem Nahinfrarot-Spektrum erzeugt mit denen der zu untersuchende Bereich bestrahlt wurde. Um diesen Bereich wurde ein bogenförmiger tomographischer Ultraschalldetektor mit 128 Messelementen (270° Detektionsabdeckung, zentrale Frequenz 5 MHz) positioniert. Das detektierte

Ultraschallsignal bewegt sich im μV Bereich und kann in digitale Einheiten mit einer Genauigkeit von 12-bit umgewandelt werden. Für jede Position und jede Wellenlänge wurden 25 Messungen gemittelt. Die gesamte Messzeit für jede individuelle Aufnahme betrug 2,5 s. Anhand der tomographischen Rekonstruktions-Algorithmen konnte die Verteilung des akustischen Signals innerhalb des analysierten Bereichs ermittelt werden. Für die *in vivo* Messungen wurde mit Wellenlängen von 700 – 850 nm in 15 nm Schritten bestrahlt, um ein akustisches Signal im Gewebe zu erzeugen. Durch Bilddaten-Prozessierung wurden die Hintergrund Absorption, hauptsächlich verursacht durch oxygeniertes und desoxygeniertes Blut, von der Melanin-bedingten Absorption separiert und die Melaninverteilung bestimmt. Der identische Algorithmus zur Bilddaten-Prozessierung wurde auf sämtliche Datensätze angewandt, um Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten. Während der Messung wurde das Versuchstier mit Isofluran sediert, in eine Haltevorrichtung eingehängt und zur verbesserten Schallweitergabe in ein Wasserbad gesetzt. Um die Maus zu schützen wurde diese mit einer dünnen Polyethylenfolie wasserdicht umschlossen und durch eine Atemmaske mit einem Luft/Isofluran-Gemisch versorgt. Gemessen wurden PC3-RFP- und A549-Tumor-tragende athymische Nacktmäuse 2- 3 bzw 4 Wochen nach Virusinjektion. Für Zellkultur-Analysen wurden 10^7 Zellen in 100 μl PBS resuspendiert, transferiert in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße und mittels MSOT die Absorption der jeweiligen Lösung bestimmt. Als Kontrolle diente eine *black India* Tintenlösung mit bekannten optischen Eigenschaften ($\mu_a = 0,5$ und 1 cm^{-1} , $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$). Die Zellsuspensionen wurden in einem Wellenlängenbereich von 690 - 900 nm vermessen und die Absorption, nach Normalisierung der Pixel-Intensitäten durch die Tintenlösung und den Hintergrunde, bestimmt.

Zur Bestimmung des Melaningehalts in homogenisierten Tumoren wurde das optoakustische Signal bei 700 nm bestimmt. Das jeweilige Homogenisat wurde in ein Agarosephantom platziert, wobei an zweiter Stelle in diesem Agarosephantom eine homogenisierte Tumorprobe positioniert wurde, welche kein Melanin enthielt. Diese Hintergrundkontrolle wurde bei jeder Messung parallel analysiert. Zur Bestimmung der Absorption des jeweiligen zu untersuchenden Homogenisats wurde an 24 verschiedenen Positionen das MSOT-Signal detektiert. Das jeweilige Signal jeder Schnittebene wurde bestimmt und anschließend die Signale aller Schnittebenen gemittelt, um das MSOT-Signal des jeweiligen Tumorphomogenisats zu bestimmen.

4.4.9.2 Volumetrische multispektrale optoakustische Tomographie (vMSOT)

Die volumetrische MSOT-Messung der herauspreparierten Tumore wurde wie bei Kirscher *et al.* (zum Druck eingereicht 2014) beschrieben *ex vivo* durchgeführt. Das vMSOT System erlaubt eine schnellere Aufnahme des gesamten Tumors durch simultane Signaldetektion mit 256 Sensoren. Tumoraufnahmen wurden nach Bestrahlung mit den Wellenlängen 740, 760 und 780 nm erstellt. Die erhaltenen Daten wurden bei der jeweiligen Wellenlänge zur Hintergrundsignalreduktion 200mal gemittelt. Die Rekonstruktion des dreidimensionalen Bildes spiegelt die optische Absorption aller verwendeten Wellenlängen bei einer Auflösung von nahezu 200 µm wieder. Die Melaninverteilung wurde anschließend ermittelt durch lineares „un-mixing“ der multispektralen Daten. Als Kontrolle diente hierbei deoxygeniertes Hämoglobin. Dadurch dass die Melanin-bedingte Absorption proportional von dessen Konzentration abhängt, ist es möglich den Melaningehalt aus den prozessierten Daten abzuleiten.

4.4.10 Elektronenmikroskopische Analysen

A549-Lungenkarzinomzellen wurden mit GLV-1h324 (MOI 0,5) infiziert, 2 Tage inkubiert, mit Karnovsky-Fixans fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Die Fixierung und EM-Analyse erfolgte in Tübingen (Universitätsklinik Tübingen, AG Schaller). Schnitte wurden mit Primärantikörpern gegen die Zielstrukturen Tyrosinase (#GTX73916, GeneTex), Melanin (HMB45, #M0634, Dako) und Lysosom (PG-M1, #M0876, Dako) behandelt. Durch anschließende Antikörperreaktion gegen die konstanten Bereiche der Primärantikörper mit 12 nm Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörpern (#715-205-150-87 und #115-205-146-84, Jackson) wurde die Primärantikörper-Bindung an die Zielstrukturen visualisiert.

Die EDX-EELS Analyse zur Bestimmung der atomaren Zusammensetzung des nach Virusinfektion gebildeten Melanins wurde anhand der oben erwähnten fixierten GLV-1h324 infizierten A549 Zellen und an 4% Pfa-fixierten GLV-1h324 kolonisierten A549-Tumore in Zusammenarbeit mit dem Institut für Augenklinik durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Konstitutiv melanogene rekombinante Vaccinia-Viren (rVACV)

5.1.1 Selektion und Charakterisierung in Zellkultur

Zur Selektion der effizientesten Kombinationen zwischen Vaccinia-Virus-spezifischen Promotoren (P_{SE} und P_{SEL}) und Melanin synthetisierender Enzyme, wurden verschiedene rekombinante Vaccinia-Virus-Konstrukte (rVACV) in Zellkultur auf melanogenes und onkolytisches Potential getestet.

Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen bzw. CV-1-Zellen kultiviert und bei 90-100% Konfluenz mit den unterschiedlichen melanogenen rVACV (GLV-1h322, -324, -326 und -327; Abb. 8) sowie dem parentalen rVACV GLV-1h68 als Kontrollvirus mit einer MOI 0,1 bzw. 1000 pfu/Well in einer 24 Well-Platte infiziert. Abbildung 8 A) zeigt fotografische Aufnahmen von viralen Plaques. Durch quantitative Auswertung ($n > 100$) des maximalen Plaque-Durchmessers mittels der *OpenSource* Software ImageJ konnte für GLV-1h68 (grün) ein durchschnittlicher max. Plaque-Durchmesser von $373 \pm 146 \mu\text{m}$, für GLV-1h322 (grau) $460 \pm 150 \mu\text{m}$, für GLV-1h324 (schwarz) $255 \pm 138 \mu\text{m}$, für GLV-1h326 (hellbraun) $465 \pm 168 \mu\text{m}$ und GLV-1h327 (braun) $219 \pm 93 \mu\text{m}$ ermittelt werden (Abb. 8 B). Es zeigte sich, dass GLV-1h68, GLV-1h322 und GLV-1h326 signifikant ($p < 1 \times 10^{-8}$) größere Plaques bildeten als die Konstrukte GLV-1h324 und -327.

In einem weiteren Experiment wurde das melanogene Potential, also das Potential zur Melaninsynthese, ermittelt. Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen mit den genannten rVACV infiziert (MOI 0,5). Nach dreitägiger Inkubation wurde die Absorption rVACV-infizierter Zellen über ein Spektrum von 400 - 700 nm ermittelt. Die höchste optische Dichte (OD) über das vermessene Spektrum wurde bei GLV-1h327 und GLV-1h324 detektiert, gefolgt von GLV-1h322 und GLV-1h326. Die geringste OD wurde bei der Negativ-Kontrolle GLV-1h68 gemessen (Abb. 8 C). Weiterhin wurde die enzymale Umsatzrate (V_{max}) des Substrats der Melaninsynthese (L-DOPA) durch Lysate GLV-1h322, -324, -326, -327 und -68 infizierter A549-Zellen bestimmt. Eine signifikant geringere Umsatzrate ($p < 0,001$) wurde bei den Lysaten GLV-1h322 ($0,3 \pm 0,02 \Delta\text{mOD}/10 \text{ min}$) und GLV-1h326 ($0,2 \pm 0,02 \Delta\text{mOD}/10 \text{ min}$)-infizierter Zellen gegenüber GLV-1h324 ($2,3 \pm 0,14 \Delta\text{mOD}/10 \text{ min}$) und GLV-1h327 ($2,1 \pm 0,24 \Delta\text{mOD}/10 \text{ min}$)-

infizierter A549-Zellen festgestellt (Abb. 8 Einlassung C). L-DOPA Koinkubation mit Lysaten der GLV-1h68 infizierten A549-Zellen führte zu keiner Zunahme der optischen Dichte. Anhand dieser ersten Analyse wurden die rVACV-Konstrukte GLV-1h324 und GLV-1h327 wegen des höchsten melanogenen Potentials ausgewählt, wengleich eine vergleichsweise langsamere Replikation ermittelt wurde. Im Folgenden wurde mit diesen Konstrukten weiterverfahren.

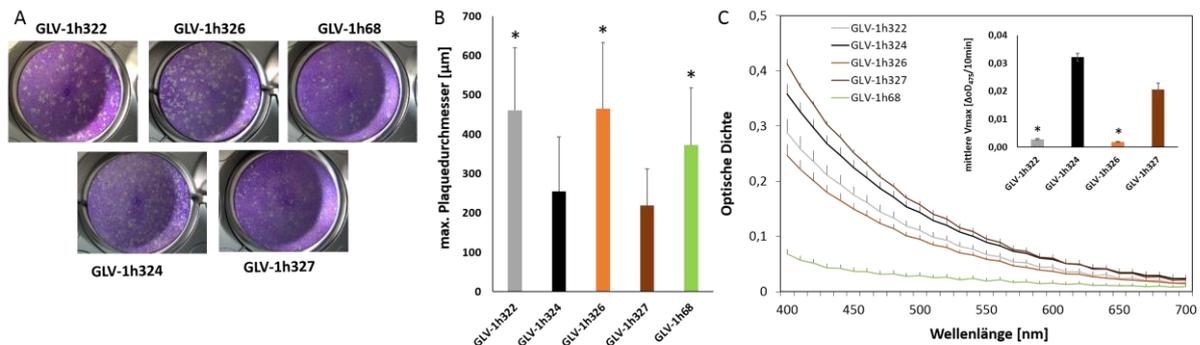


Abbildung 8: A) Lichtmikroskopische Aufnahme rVACV-verursachter Plaques bei infizierten CV-1-Zellen. B) Quantitative Auswertung des maximalen Plaque-Durchmessers nach Infektion mit dem jeweiligen rVACV-Konstrukt (ImageJ; $n > 100$). GLV-1h322, GLV-1h326 und GLV-1h68 zeigten signifikant größeren max. Plaque-Durchmesser als GLV-1h324 und GLV-1h327 ($p < 10^{-8}$). C) Spektrale Analyse (400 – 700 nm) rVACV-infizierter A549-Zellen (MOI 0,5) nach dreitägiger Inkubation. GLV-1h68 diente als Melaninsynthese Negativ-Kontrolle. Einlassung C) Mittlere maximale Umsatzrate (V_{max}) des Melaninsynthese-Substrats (L-DOPA) durch Lysate GLV-1h322, -324, -326, -327 infizierter A549-Zellen (MOI 0,1, 24 hpi; $n = 3$). Lysate GLV-1h322 und GLV-1h326 infizierter A549 Zellen signifikant geringere L-DOPA-Umsatzrate ($p < 0,001$).

5.1.1.1 Expression rVACV-kodierter Biomarker

Anhand einer Western Blot-Analyse wurde die Expression der jeweiligen viral kodierten Gene in GLV-1h68, -324 und -327 infizierten A549-Zellen (MOI 0,1; 24 hpi) getestet (Abb. 9). Lysate GLV-1h68 infizierter A549-Krebszellen zeigten weder Tyrosinase (mTyr) noch Tyrosinase Helferprotein 1 (Typr1) Expression. Hingegen Lysate aus GLV-1h324 wie auch GLV-1h327 infizierter Zellen zeigten nachweislich mTyr-Expression. Typr1 konnte ausschließlich in GLV-1h324-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Alle drei verwendeten rVACV-Konstrukte zeigten GFP-Expression. Die Antikörper-Reaktion gegen humanes beta-Aktin diente als Ladungskontrolle. Somit konnte gezeigt werden, dass die getesteten viral kodierten Marker exprimiert wurden.

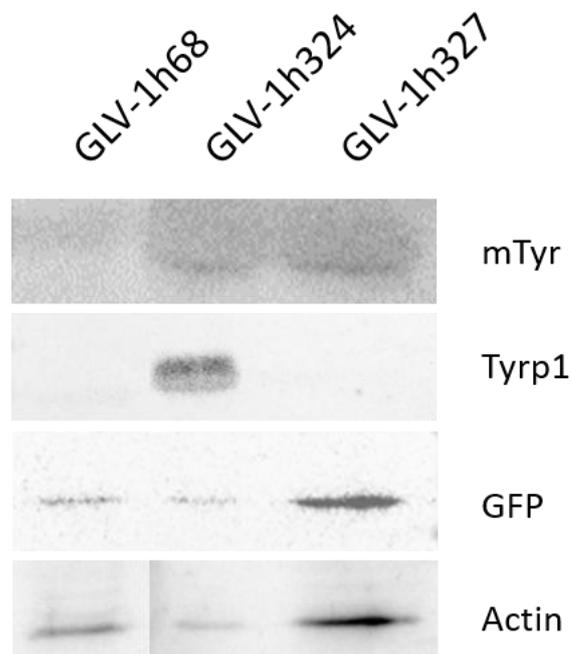


Abbildung 9: Expressionsanalyse der viral kodierten Marker-Gene. Murine Tyrosinase (*mTyr*), Tyrosinase Helferprotein 1 (*Tyrp1*) und grün fluoreszierendes Protein (*GFP*) exprimiert von rVACV (GLV-1h68, -324 und -327; MOI 0,1; für 24 h nach Infektion inkubiert) infizierten A549 Krebszellen. Humanes beta-Aktin diente als Ladungskontrolle.

5.1.1.2 Zeitlicher Verlauf der konstitutiv viral vermittelten Melaninsynthese

Zur weiteren Evaluierung der viral vermittelten Melaninsynthese wurden A549-Krebszellen mit dem nicht melanogenen Kontrollvirus GLV-1h68 und den melanogenen Konstrukten GLV-1h324 und GLV-1h327 infiziert (MOI 0,05). Zu den Zeitpunkten 2, 6, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Infektion (hpvi) wurden die infizierten Zellen geerntet, in 1 M NaOH gelöst und die Absorption bei 500 nm gemessen (Abb. 10). Drei Tage nach Infektion wurde eine signifikant höhere OD_{500} (optische Dichte bei 500 nm) beider Melanin produzierender Gruppen (GLV-1h324 und GLV-1h327) verglichen mit der GLV-1h68 infizierten Kontrolle gemessen. Nach 24-48 hpvi konnte eine leichte Steigerung der OD_{500} beobachtet werden. Dies ließ auf eine anfängliche Melaninproduktion schließen. Die GLV-1h68 infizierte Kontrolle hingegen zeigte keinen OD_{500} Anstieg über das gemessene Zeitintervall. Im Vergleich der beiden melanogenen rVACV-Konstrukte konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies ließ sowohl eine ähnliche Melaninsynthese-Geschwindigkeit als auch ein ähnliches maximales Melaninsynthese-Potential vermuten.

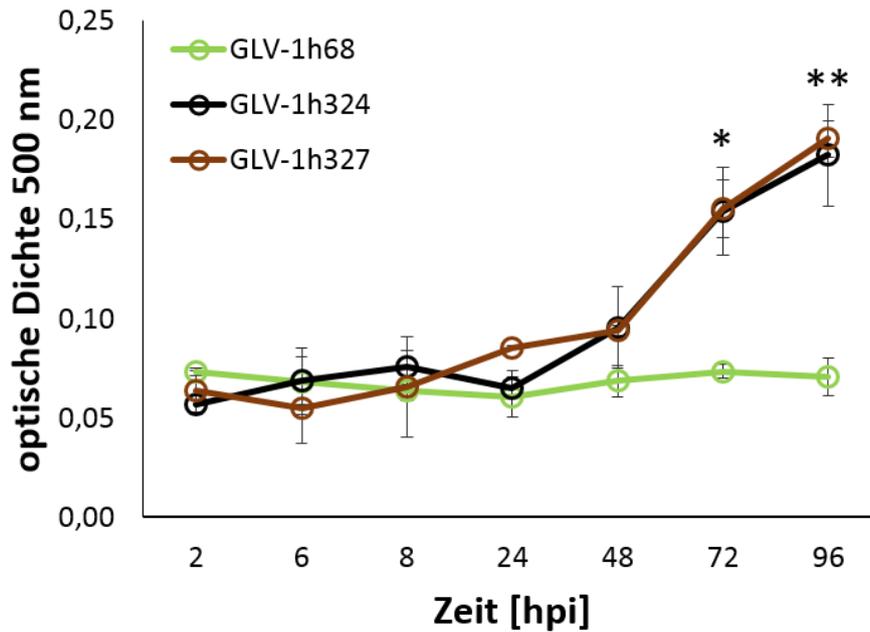


Abbildung 10: Bestimmung der optischen Dichte melanogener rVACV infizierter A549 Krebszellen. GLV-1h68 (grün) diente als nicht melanogene Kontrolle. GLV-1h324 (schwarz) und GLV-1h327 (braun) wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihres melanogenen Potentials auf. 72 und 96 hpi konnte eine signifikant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) höhere OD_{500} der melanogenen Gruppen verglichen mit der GLV-1h68 infizierten Kontrolle ermittelt werden.

5.1.1.3 Evaluierung des onkolytischen Potentials melanogener rVACV

Um das Replikationsverhalten melanogener rVACV Konstrukte zu charakterisieren wurden A549-Lungenkarzinomzellen mit dem Kontrollvirus GLV-1h68 sowie den melanogenen rVACV GLV-1h324 und GLV-1h327 infiziert. 2, 6, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Infektion (hpi) wurden jeweils Überstand und infizierte Zellen getrennt gesammelt. Der virale Titer dieser Proben wurde mittels Standard Plaque Assay ermittelt. Analyse der Titererhöhung der viralen Partikel im Überstand (Abb. 11 A) ergab für GLV-1h68 infizierte A549-Zellen (grün) 48 hpi ein $1,34 \pm 0,61$ -faches des initialen Titers, 72 hpi das $21,1 \pm 3,41$ -fache und 96 hpi das $90,1 \pm 27,4$ -fache. Zu den früheren Zeitpunkten wurde der initiale Titer nicht überschritten. Überstände der GLV-1h324 infizierten A549-Zellen (schwarz) zeigten eine Erhöhung in Relation zum initialen Titer ab den Zeitpunkten 48 hpi von $4,65 \pm 0,86$, 72 hpi von $4,24 \pm 0,4$ und 96 hpi von $3,96 \pm 1,97$. Eine Titererhöhung in Überständen GLV-1h327 infizierter Lungenkarzinomzellen konnte 72 hpi nach viraler Infektion festgestellt werden. Diese betrug das $4,6 \pm 0,68$ -fache und nahm zum nächsten gemessenen Zeitpunkt (96 hpi) leicht ab ($2,67 \pm 0,83$ -fach). Die Titer des parentalen nicht Melanin-produzierenden Vaccinia-Virus GLV-1h68

waren zu den Zeitpunkten 72 und 96 hpi signifikant ($p < 0,001$) höher, verglichen mit den melanogenen rVACV. Diese zeigten keine signifikant unterschiedlichen replikativen Eigenschaften. In Abbildung 11 B wurde der Titer GLV-1h68 (grün), GLV-1h324 (schwarz) und GLV-1h327 (braun) infizierter A549-Zellen 2, 6, 8, 24, 48, 72 und 96 h nach Infektion dargestellt und anschließend die Erhöhung zum initialen Titer der Infektion berechnet. Hieraus ergab sich ein Vielfaches für GLV-1h68-infizierte Zellen ab dem Zeitpunkt 48 hpi von 166 ± 90 , 72 hpi von $263 \pm 78,8$ und 96 hpi von $113 \pm 39,6$. Eine Steigerung des anfänglichen Titers GLV-1h324 infizierter Zellen konnte bereits 24 hpi um $2,38 \pm 1,14$ festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 48 hpi wurde eine Steigerung um das $2,85 \pm 0,78$ fache, 72 hpi von $38,4 \pm 11,5$ und 96 hpi von $14,4 \pm 1,75$ ermittelt. Bei der Betrachtung GLV-1h327-infizierter A549-Zellen konnte eine erste Erhöhung des Infektionstiters 24 hpi festgestellt werden, welche sich zu den späteren Zeitpunkten weiterhin steigerte (24 hpi: $1,22 \pm 0,36$; 48 hpi: $30,9 \pm 4,7$; 72 hpi $43 \pm 9,33$ und 96 hpi $10 \pm 2,4$). In den infizierten Zellen konnte ebenfalls eine signifikant (**; $p < 0,01$ und ***; $p < 0,001$) höhere Replikation des parentalen GLV-1h68 im Vergleich mit den melanogenen rVACV (GLV-1h324 und GLV-1h327) 48, 72 und 96 hpi festgestellt werden. Die melanogenen rVACV zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem replikativen Verhalten. Der jeweilige Abfall des viralen Titers 96 hpi in infizierten Zellen wurde wahrscheinlich durch die weit fortgeschrittene viral-bedingte Onkolyse verursacht.

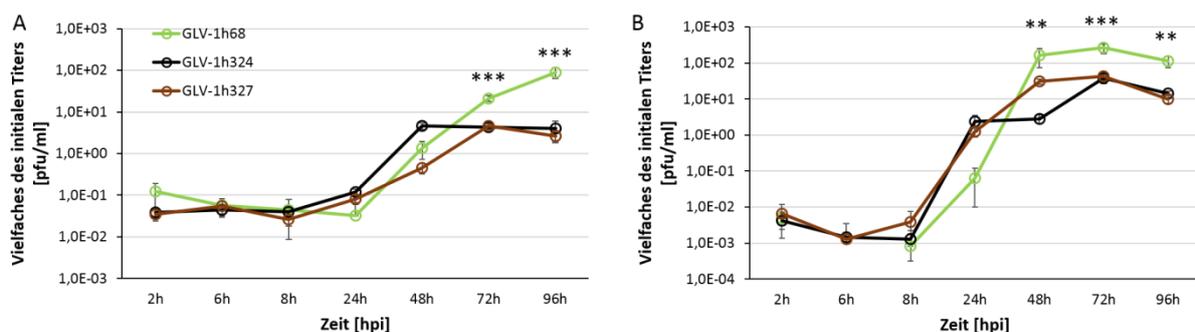


Abbildung 11: Titer GLV-1h68 und mel rVACV infizierter (GLV-1h324 und GLV-1h327) A549-Zellen im Überstand A) und in den Zellen B). Im Überstand signifikant ($p < 0,001$) höhere Steigerung des Titers GLV-1h68 infizierter A549-Zellen 72 und 96 hpi. Signifikant (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) höhere Titersteigerung GLV-1h68 infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 hpi.

Neben der viralen Replikation wurde das onkolytische Verhalten melanogener rVACV (GLV-1h324 und GLV-1h327) in A549-Lungenkarzinomzellen verglichen, um festzustellen ob das zusätzliche Tyrp1-kodierende Gen im TK-Lokus des GLV-1h324 zu einer weiteren Attenuierung

der viralen Replikation führt. Hierzu wurden A549-Karzinomzellen mit GLV-1h324 (schwarz) und GLV-1h327 (braun) infiziert (MOI 0,05) und mittels MTT-Assay 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Infektion analysiert. Die Überlebensrate wurde relativ zu unbehandelten A549-Zellen (blau) bestimmt (Abb. 12 A). Für beide Melaninsynthese vermittelnden rVACV (GLV-1h324 und GLV-1h327) wurde eine exponentielle Abnahme der Überlebensrate festgestellt. Für GLV-1h324-infizierte A549-Zellen wurde eine letale Dosis, bei der 50 % der Zellen abgetötet waren (LD_{50}), von 57,2 hpi und für GLV-1h327-infizierte Zellen von 57,6 hpi ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede des onkolytischen Potentials beider melanogener rVACV-Konstrukte beobachtet werden. Das zusätzliche viral-kodierte melanogene Enzym Tyrp1 beeinflusste die Onkolyse demzufolge weder positiv noch negativ.

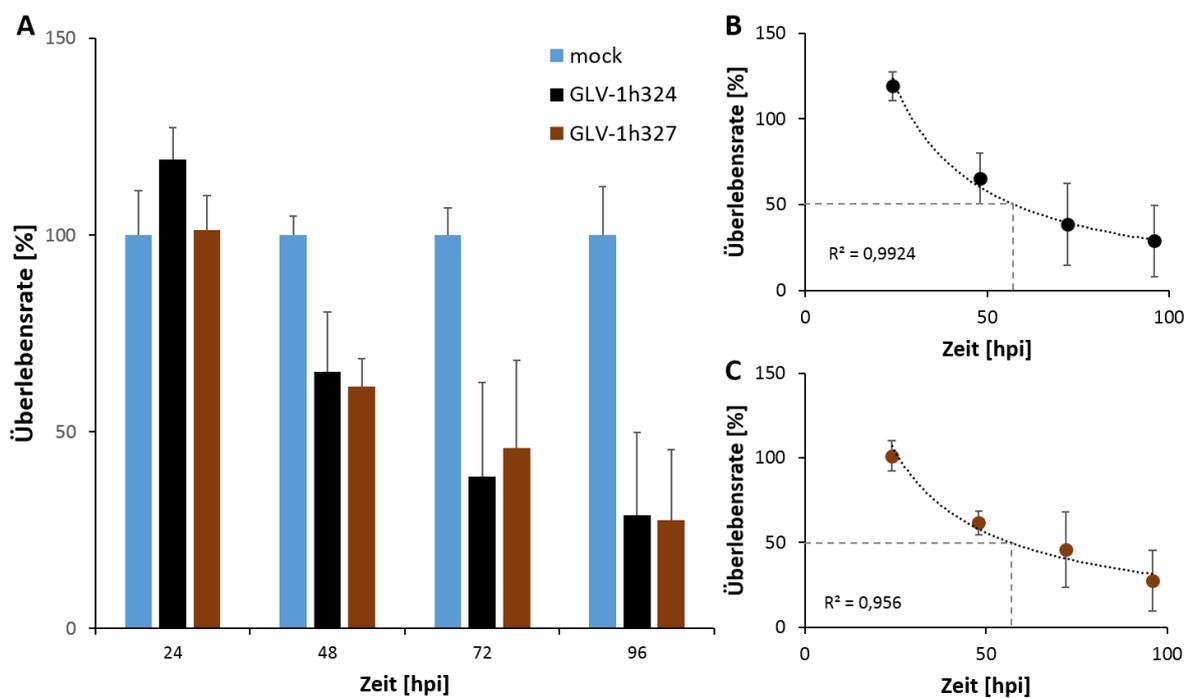


Abbildung 12: Überlebensrate GLV-1h324- und GLV-1h327-infizierter A549-Krebszellen. A) Relative Überlebensrate GLV-1h324- (schwarz) und GLV-1h327- (braun) infizierter (MOI 0,5) zu unbehandelten (mock; hellblau) A549-Krebszellen. Exponentielle Abnahme der Überlebensrate GLV-1h324-infizierter A549-Zellen; $LD_{50} \sim 57,2$ hpi B) und GLV-1h327-infizierter A549-Zellen; $LD_{50} \sim 57,6$ hpi C).

5.1.1.4 Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Analyse rVACV-infizierter A549- und PC3-RFP-Zellen

Im Zuge licht- und fluoreszenzmikroskopischer Analysen sollte die Funktionalität des viral kodierte GFP in rVACV-infizierten Krebszellen nachgewiesen, sowie die rVACV-vermittelte Melaninsynthese visualisiert werden. Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen (Abb. 13)

und PC3-RFP-Prostatakarzinomzellen (Abb. 14) mit GLV-1h68, GLV-1h324 und GLV-1h327 infiziert (MOI 0,5) bzw. als Negativkontrolle unbehandelt belassen. 3 Tage nach viraler Infektion (dpvi) wurden die jeweiligen Infektionsansätze Pfa-fixiert und mikroskopisch analysiert. Hierbei konnte in allen rVACV-infizierten Zellen ein GFP Signal ermittelt werden, wohingegen keine GFP-Fluoreszenz in der unbehandelten Negativkontrolle detektiert werden konnte. Eine bräunliche intrazelluläre Färbung, verursacht durch Melaninsynthese, konnte ausschließlich in GLV-1h324- und GLV-1h327-infizierten A549-Zellen beobachtet werden.

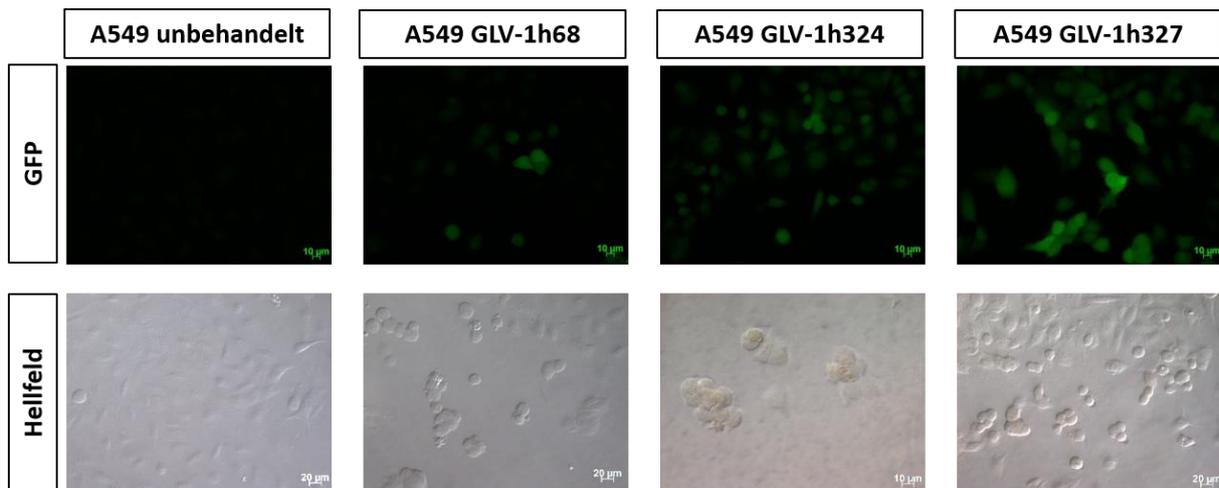


Abbildung 13: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Pfa-fixierter rVACV-infizierter A549-Zellen. Viral-vermittelte GFP-Expression (obere Reihe) sowie Melanin-Produktion (untere Reihe) GLV-1h68, GLV-1h324 und GLV-1h327 infizierter und unbehandelter A549-Zellen 3 dpvi visualisiert mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie. A549 unbehandelt diente als negative Kontrolle der GFP-Expression und der Melaninsynthese. GLV-1h68-infizierte Lungenkarzinomzellen dienten als negativ-Kontrolle der viral vermittelten Melanin-Produktion.

Die in Abbildung 14 gezeigten stabil mit RFP transfizierten Prostatakarzinomzellen PC3-RFP [111] wurden mit den rVACV-Konstrukten GLV-1h68,- 324 und 327 infiziert (MOI 0,1) oder unbehandelt belassen. Nach fünftägiger Inkubation wurde mit Karnovsky-Lösung fixiert und die unterschiedlichen Gruppen fluoreszenz- bzw. lichtmikroskopisch untersucht. In allen rVACV (GLV-1h68, -324 und -327) infizierten PC3-RFP Krebszellen konnte ein deutliches GFP-Signal nachgewiesen werden. Ein RFP-Fluoreszenz-Signal konnte sowohl in den rVACV-infizierten als auch den unbehandelten PC3-RFP-Zellen nachgewiesen werden. In Hellfeldanalysen der fixierten Zellen konnten bräunliche Einschlüsse im Zytoplasma der GLV-1h324- und GLV-1h327-infizierten Zellen, sowie der Melanin-produzierenden Positivkontrolle B16F10 detektiert werden, welche auf eine Melaninakkumulation schließen ließen. Die unbehandelten PC3-RFP- und GLV-1h68-infizierten Prostatakarzinomzellen zeigten hingegen keine bräunlichen Einschlüsse im Zytoplasma.

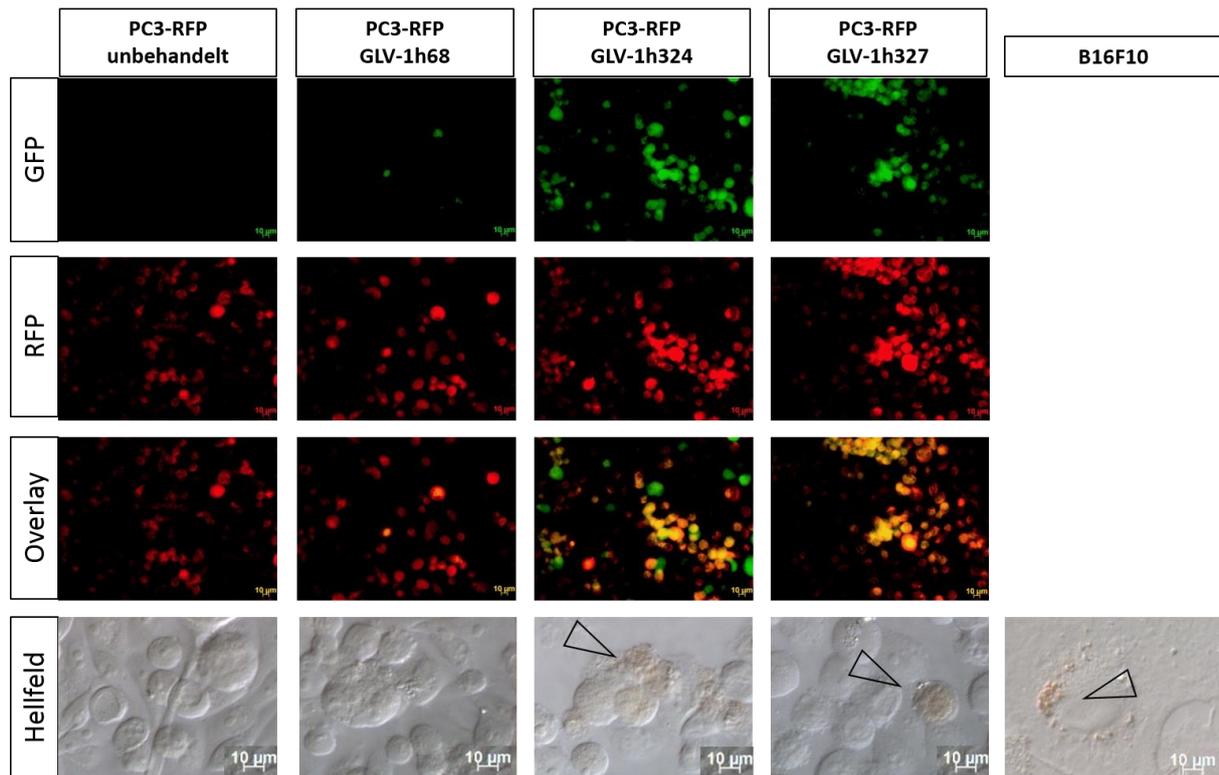


Abbildung 14: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Pfa-fixierter rVACV-infizierter bzw. nichtinfizierter PC3-RFP und B16f10. Viral vermittelte GFP-Expression (obere Reihe) sowie RFP-Expression (zweite Reihe) und Melanin-Produktion (untere Reihe) GLV-1h68-, GLV-1h324- und GLV-1h327-infizierter (MOI 0,1) und unbehandelter PC3-RFP Zellen 5 dpi visualisiert mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie. PC3-RFP unbehandelt diente als negative Kontrolle der GFP-Expression sowie der Melaninsynthese. GLV-1h68-infizierte Lungenkarzinomzellen A549 dienten als Negativ-Kontrolle der viral vermittelten Melanin-Produktion. B16F10 diente als positive Kontrolle der Melaninsynthese.

Mittels der mikroskopischen Analyse rVACV-infizierter A549 und PC3-RFP Krebszellen konnten die diagnostischen Marker GFP und Melanin im Cytoplasma der Wirtszellen visualisiert werden. Dies zeigte, dass die viral kodierte Proteine funktional in A549-Lungenkarzinomzellen sowie PC3-RFP-Prostatakarzinomzellen exprimiert wurden.

5.1.1.5 Lokalisation der viral vermittelten Melaninsynthese nach Infektion

Zur näheren Charakterisierung des mikroskopisch detektierten bräunlichen cytosolischen Melanins, wurden A549-Lungenkarzinomzellen mit GLV-1h324 (MOI 0,5) infiziert, 2 Tage inkubiert, mit Karnovsky-Fixans fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Die Fixierung und EM-Analyse erfolgte in Tübingen (Universitätsklinik Tübingen, AG Schaller). Schnitte wurden mit Primärantikörpern gegen die Zielstrukturen Tyrosinase, Melanin und Lysosom behandelt. Durch anschließende Antikörperreaktion gegen die konstanten Bereiche der Primärantikörper mit Gold-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde die Primärantikörper-Bindung an die Zielstrukturen visualisiert. Durch die spezifischen Primärantikörper anti-

Tyrosinase und anti-Melanin (HMB45) sollte der Ort der viral vermittelten Melaninsynthese lokalisiert werden (Abb. 15). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den bräunlichen hochgradig elektronendichten Strukturen um Melanin handelt (HBM45). Außerdem wurde das viral kodierte melanogene Schlüsselenzym (Tyrosinase) in Melanin enthaltenden Kompartimenten detektiert. In einer weiteren Färbung mit einem Primärantikörper gegen lysosomale Kompartimente (PGM1) konnte nach anschließender 12 nm Goldpartikelgekoppelter-Sekundärantikörperreaktion gezeigt werden, dass es sich bei den Melanin-gefüllten Organellen um Lysosomen handelt. In natürlicherweise nicht Melanin-produzierenden Krebszellen findet die viral vermittelte Melaninsynthese also in Lysosomen statt (Abb. 15, rote Pfeile markieren Goldpartikel).

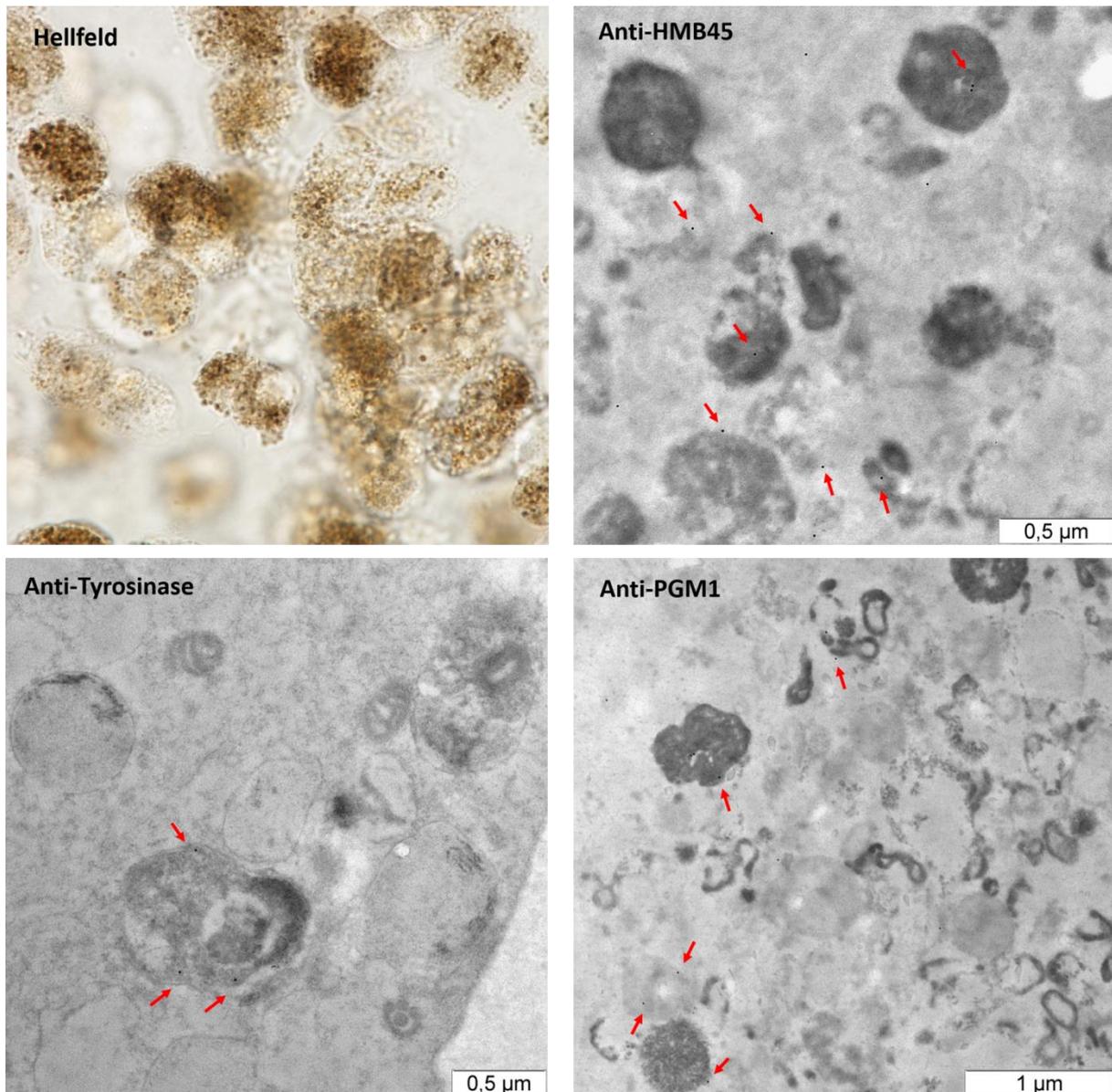


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme GLV-1h324-infizierter A549-Krebszellen. Fixierung, Präparation und EM-Aufnahmen durchgeführt von EM-Labor Universitätsklinik Tübingen AG Dr. Schaller. Zur Detektion der viral vermittelten Melaninsynthese, sowie der zellulären Struktur des Lysosoms wurden die Schnitte mit primären Antikörpern (anti-Tyrosinase, anti-HBM45 und anti-PGM1) behandelt und anschließend mit 12 nm Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Die roten Pfeile markieren hierbei jeweils einen Goldpunkt.

5.1.1.6 Atomare Zusammensetzung des viral vermittelten Melanins

In einem weiteren Experiment sollte die atomare Zusammensetzung des, nach Infektion mit melanogenen rVACV, gebildeten Melanins analysiert werden (Abb. 16). Hierzu wurden elektronendichte Organellen und weniger elektronendichte Kompartimente dieser Melanin-enthaltenden Lysosomen mittels EDX-EELS (*Energy Dispersive X-ray-microanalysis-electron energy loss spectroscopy*) untersucht. Die quantitative Analyse (Abb. 16 B) ergab, dass

die dunkleren Melanin-enthaltenden Lysosomen prozentual mehr O, P, S, Cl, Ca, Fe, Cu und Zn enthielten als die helleren Melanin-enthaltenden Lysosomen. Dies ließ den Schluss zu, dass es sich bei den dunkleren Organellen um eine reifere Form handelte, während die helleren Melanin-enthaltenden Lysosomen eher als Aufbaustadien einzustufen waren. Weiterhin wurde das Verhältnis von Schwefel zu Stickstoff untersucht, um den Phäomelaninanteil der untersuchten Organelle zu bestimmen. In der Literatur wird eine Ratio S/N für reines Eumelanin von $<0,004$, für Mischformen mit signifikantem Phäomelaninanteil von $>0,02$ und für reines Phäomelanin von $0,5$ angegeben [112]. Die hier vorliegende Analyse ergab für die reifen dunklen Melanosom-artigen Organellen (M) eine Ratio S/N von $0,16$, während die der Prämelanosomen-artigen Organellen (PMS) $0,1$ betrug. Es handelt sich also in beiden Fällen um eine phäomelaninhaltige Mischform, wobei ein höherer Phäomelaninanteil in der reifen Form detektiert werden konnte. Die prozentualen Elementanteile wurden in Tabelle 1 im Anhang zusammengefasst.

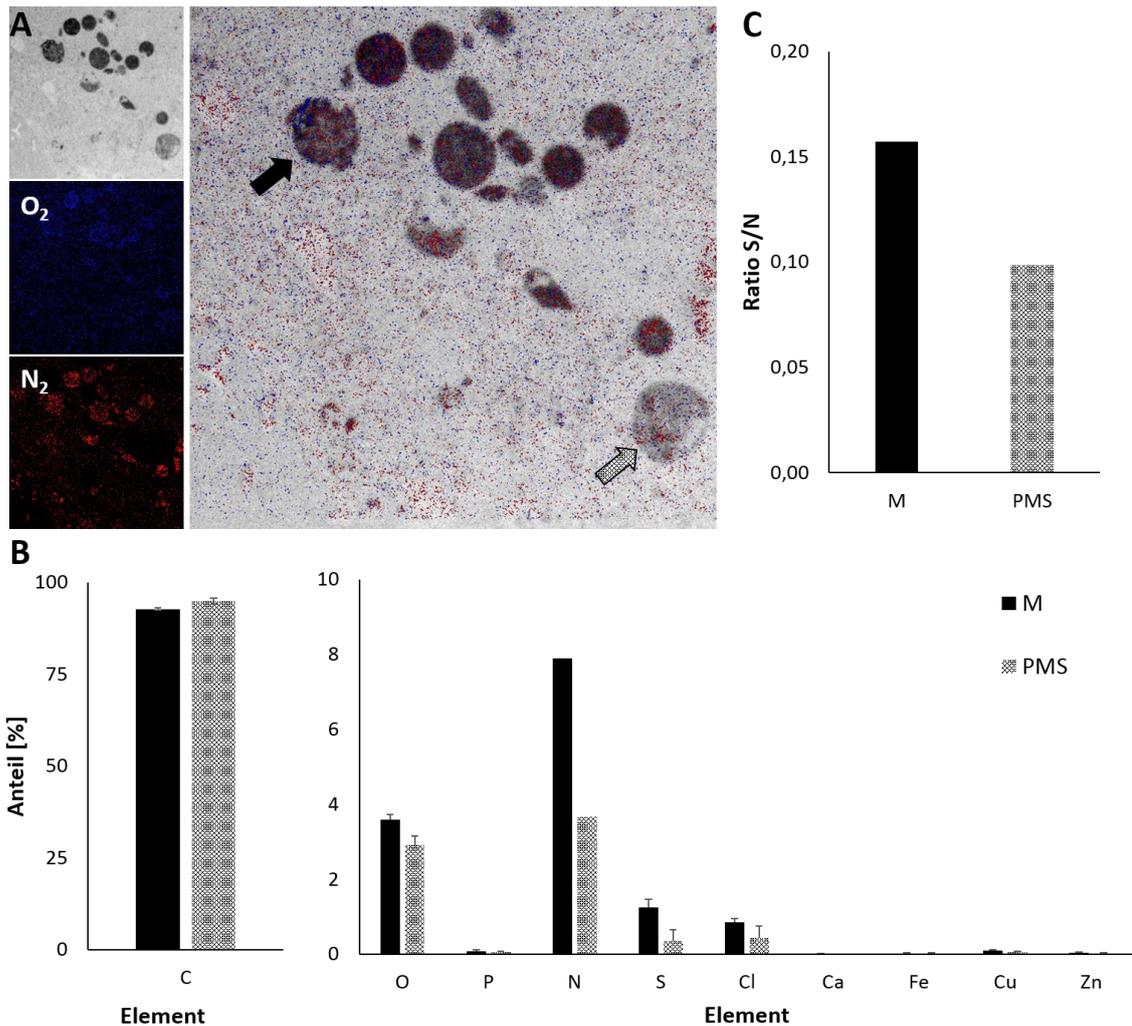


Abbildung 16: Elementare Analyse des nach rVACV-Infektion gebildeten Melanins. A) Elementverteilungsbilder mittels ESI (*element spectroscopic imaging*) von Sauerstoff und Stickstoff mit anschließendem Overlay der elektronenmikroskopischen Aufnahme. B) Quantitative Analyse der elementaren Zusammensetzung des nach rVACV-Infektion in A549 gebildeten Melanins mittels EDX-EELS-Analyse (*Energy Dispersive X-ray-microanalysis-electron energy loss spectroscopy*). C) Ratio aus Schwefel- und Stickstoffanteil dunkler (M) und heller (PMS) Melanin-enhaltender Lysomen. Analyse und Auswertung wurden von Biesemeier Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt.

Anschließend an die Zellkulturversuche wurden Epschnitte eines GLV-1h324-kolonisierten A549-Tumors anhand der EDX-EELS-Analyse bezüglich der Melanin-Zusammensetzung analysiert (Abb. 17). Im Gegensatz zu den Zellkulturproben ergab die *ex vivo* Messung Melanin-enhaltendem Gewebes einen wesentlich höheren (1,8fach bzw. 1,9fach) Sauerstoff- und Stickstoffgehalt (2,1fach bzw. 4,6fach) in dunklen (M) bzw. hellen (PMS) Melanin-enhaltenden Lysosomen (Abb. 17 B). Interessanterweise waren die Sauerstoff- und Stickstoffanteile des viral-vermittelten Melanins höher als diese Anteile des Melanins der

Substantia nigra und aus Melanomen (Tab. 3). Ebenso konnte ein erhöhter Anteil Melanin-gebundener Metallkationen (Ca, Fe, Cu und Zn) in den *ex vivo* Proben verglichen mit den fixierten Zellkulturschnitten nachgewiesen werden (Tab. 1 und 2). Verglichen mit der Elementanalyse des humanen Neuromelanins aus *Substantia nigra* konnte ein stark erhöhter Calcium (0,16 zu 0,02 %) und Kupferanteil (0,2 zu 0,03 %) sowie ein leicht erhöhter Zinkanteil (0,05 zu 0,03 %) der reifen Melanosom-artigen Organellen ermittelt werden. Der Eisenanteil lag jedoch nur knapp über der Nachweisgrenze (0,03 %) während Neuromelanin einen Fe-Anteil von 0,15 % aufwies. Im Vergleich mit der Melanomprobe glichen sich die jeweiligen Anteile an gebunden Metallkationen (Tab. 2). Aus dieser Elementspektral-Analyse geht hervor, dass das nach GLV-1h324-Infektion gebildete Melanin eher dem aus Haut und Auge als aus *Substantia nigra* isolierten Neuromelanin glich. Bezüglich der Charakterisierung der Zusammensetzung in M- und PMS-Organellen konnte ein vergleichbares Muster wie in den Zellkulturproben festgestellt werden. So zeigten M-Organelle einen höheren O-, P-, S-, Cl-, Ca-, Cu- und Zn-Anteil, wodurch die zuvor getroffene Unterscheidung in reifes und Aufbaustadien-Organell bestätigt werden konnte. Die detaillierte Auflistung der Elementanalyse findet sich in Tabelle 1-3 im Appendix.

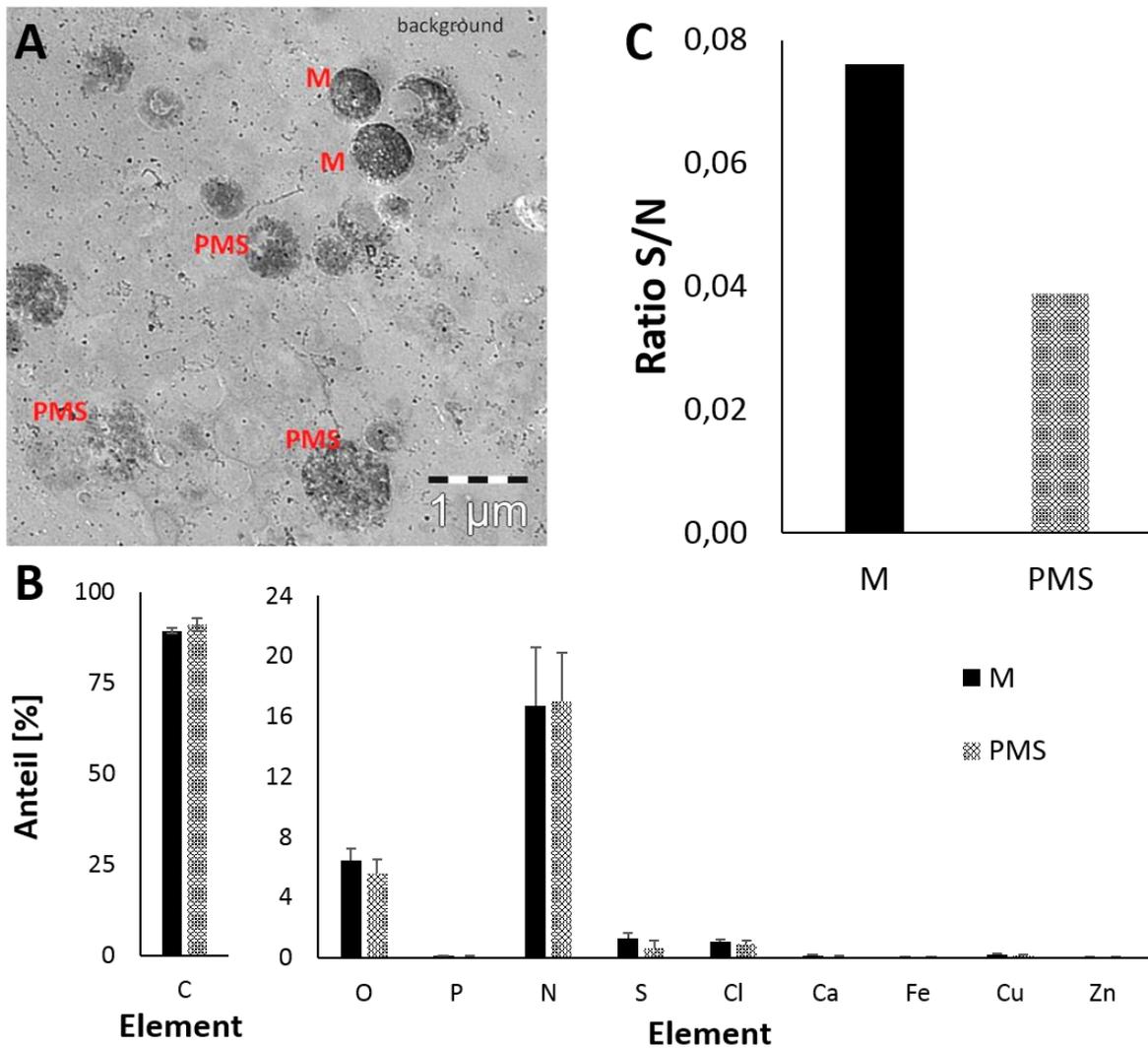


Abbildung 17: EDX-EELS-Analyse *ex vivo* GLV-1h324-infizierter A549-Xenotransplantate. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme GLV-1h324-kolonisierter A549-Tumor-Epionschnitte B) Quantitative Auswertung der prozentualen elementaren Anteile mittels EDX-EELS-Analyse. Untersucht wurden helle (PMS) und dunkle (M) Melanin-enthaltende Lysosome C) Verhältnis aus Schwefel- und Stickstoffanteil dunkler (M) und heller (PMS) Melanin-enthaltender Lysomen. Analyse und Auswertung wurden von Biesemeier Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt.

Desweiteren wurde die Ratio S/N für die GLV-1h324-kolonisierten A549 Tumore gebildet. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es sich sowohl in M (0,08) als auch in PMS (0,04) um Melanin-Mischformen aus Eu- und Phäomelanin handelte. Wie in der analysierten Zellkulturprobe war auch hierbei der Phäomelaninanteil in M- höher als in PMS-Organellen.

5.1.2 Therapeutische Wirkung melanogener rVACV in Mäusen

Nach Selektion und Charakterisierung der melanogenen rVACV GLV-1h324 und GLV-1h327 in Zellkultur wurde deren therapeutisches Potential im Tiermodell ermittelt. Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen subkutan in die rechte hintere Flanke athymischer Nacktmäuse implantiert. Bei einem Tumorzellenvolumen von ca. 200 mm³ wurde das jeweilige Vaccinia-Virus-Konstrukt über die Schwanzvene intravenös injiziert. Im weiteren Verlauf wurde wöchentlich das Tumorzellenvolumen und das Gewicht jeder Maus ermittelt. In Abbildung 18 wurden die gemittelten Tumorzellenvolumina der jeweiligen Gruppe sowie in der Einlassung das gemittelte Gewicht graphisch dargestellt. Während die unbehandelten A549-Xenotransplantat-tragenden Tiere (blau; PBS) ein stetig zunehmendes Tumorzellenvolumen zeigten, nahm das gemittelte Tumorzellenvolumen der GLV-1h324- (schwarz), GLV-1h327- (braun) und GLV-1h68- (grün) injizierten Mäuse, nach anfänglichem Wachstum bis Tag 28 nach viraler Injektion (dpvi) ab. 35 dpvi zeigten rVACV-kolonisierter A549-Tumore signifikant geringere Volumina als die unbehandelten Kontrollen (PBS). Im Vergleich der Tumorzellenvolumina der Vaccinia-Virus-injizierten Mäuse konnte gezeigt werden, dass die nicht Melanin-synthetisierende Kontrolle (GLV-1h68) ein geringeres maximales Tumorzellenvolumen und eine schnellere Volumenabnahme zeigte als die Melanin-synthetisierenden GLV-1h324- und GLV-1h327-injizierten A549-Xenotransplantate. Sowohl die Behandlung mit GLV-1h324 als auch mit GLV-1h327 führte zu einem therapeutischen Erfolg im A549-Krebsmodell jedoch mit geringerer Effizienz verglichen mit dem parentalen Vaccinia-Virus GLV-1h68. Die verwendeten rVACV-Konstrukte zeigten im Tiermodell keine toxische oder anderweitig den Gesundheitszustand negativ beeinflussende Wirkung, wie anhand des kontinuierlich gleichbleibenden bzw. zunehmenden Gewichts gezeigt werden konnte.

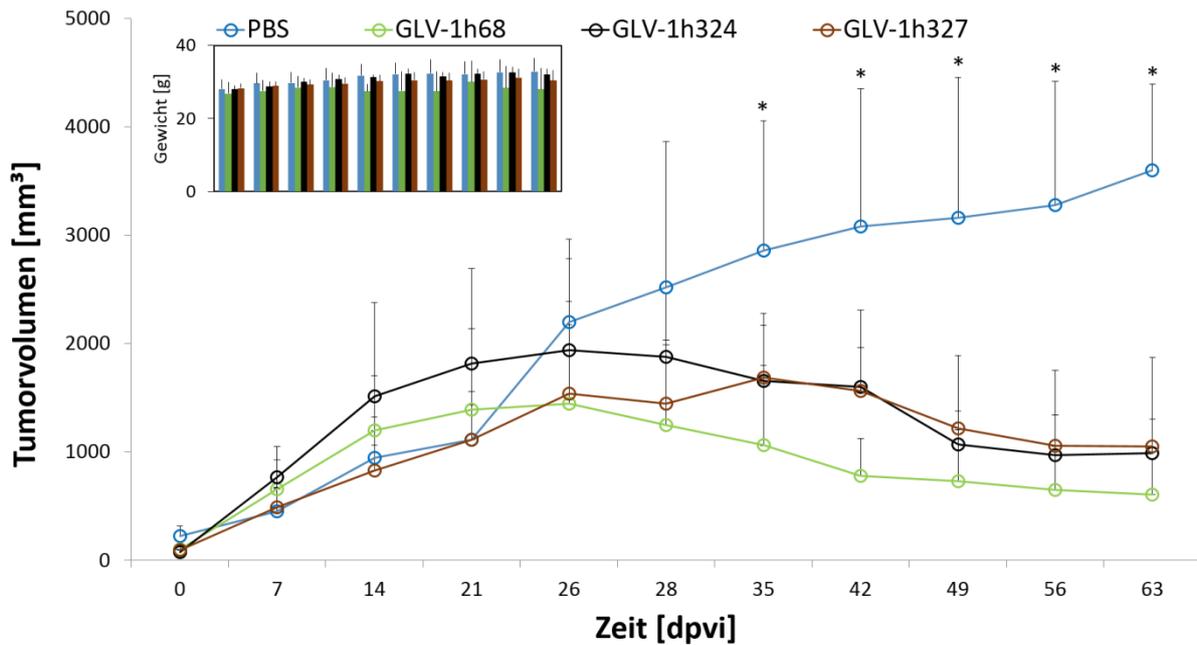


Abbildung 18: Tumorwachstumskurve A549-Xenotransplantat-tragender athymischer Nacktmäuse. Das Tumolvolumen von A549-Tumor-tragenden athymischen Nacktmäusen wurde wöchentlich bestimmt. Verglichen wurde hierbei das Tumorwachstum einer unbehandelten Gruppe (PBS, blau), einer mit dem nicht-melanogenen Kontrollvirus GLV-1h68- (grün), einer GLV-1h324- (schwarz) und einer GLV-1h327- (braun) injizierten Gruppen. Die Einlassung gibt das durchschnittliche Körpergewicht der jeweiligen Gruppe an. Die Gruppengröße umfasste n = 5 (*; p < 0,05).

Als Marker der viralen Replikation und Virus-verursachten Onkolyse wurde der beta-Glucuronidase- (GusA) Spiegel im Blutserum A549-Xenotransplantat-tragender Nacktmäuse, injiziert mit GLV-1h68 (grün), GLV-1h324 (schwarz) und GLV-1h327 (braun), ermittelt (n = 5). Blut wurde entnommen und das Serum von Blutzellen getrennt. Anschließend wurde die GusA-Aktivität bestimmt und mit dem Tumolvolumen der jeweiligen Maus zum jeweiligen Zeitpunkt (24, 31, 38 und 45 dpvi) als Korrekturfaktor normalisiert. Ein steigender Gehalt von *E. coli* GusA-Äquivalenten im Blutserum pro Tumolvolumen konnte über das gemessene Zeitintervall bei GLV-1h68-injizierten A549-Tumor (grün) tragenden Nacktmäusen ($0,48 \pm 0,18$; $0,57 \pm 0,37$; $1,27 \pm 1,39$ und $2,15 \pm 2,53$) ermittelt werden. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die gemessene *E. coli* GusA-Menge GLV-1h324 und GLV-1h327 injizierter Mäuse kaum ($0,25 \pm 0,08$; $0,46 \pm 0,19$; $0,66 \pm 0,34$ und $0,79 \pm 0,2$) bzw. ($0,37 \pm 0,18$; $0,45 \pm 0,1$; $0,54 \pm 0,07$ und $0,49 \pm 0,38$). Es konnte also festgestellt werden, dass die melanogenen Vaccinia-Virus-Konstrukte, GLV-1h324 und GLV-1h327, einen geringeren *E. coli* beta-Glucuronidase-Spiegel im Blutserum rVACV-injizierter A549-Tumor-tragender Nacktmäuse zeigten als GLV-1h68 kolonisierte A549-Xenotransplantate. Dies ließ auf eine geringere virale Aktivität melanogener rVACV schließen.

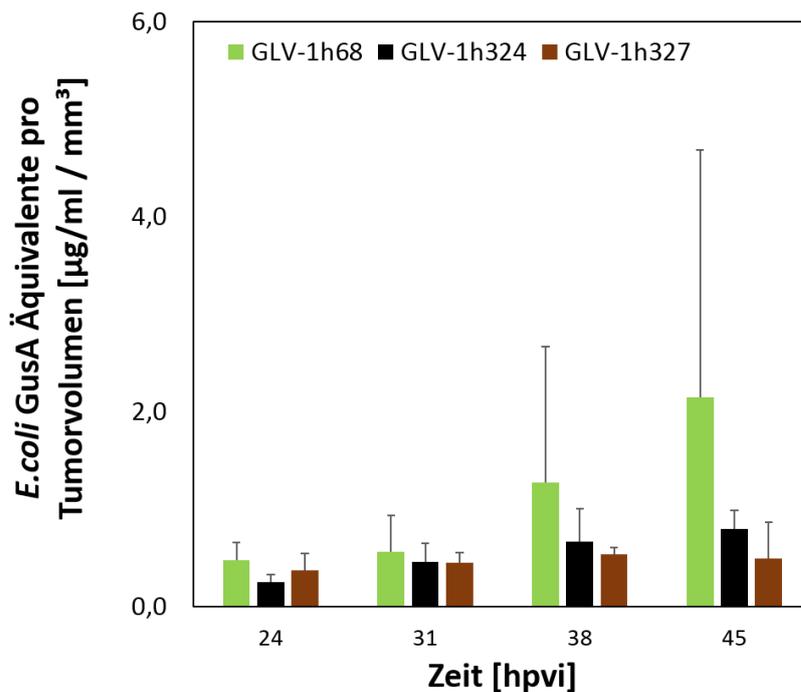


Abbildung 19: Bestimmung des beta-Glucuronidasespiegels. Analyse des viral-vermittelten *E. coli* beta-Glucuronidase-Spiegels im Blutserum A549-Tumor tragender GLV-1h68 (grün), GLV-1h324 (schwarz) und GLV-1h327 (braun) injizierter athymischer Nacktmäuse (n = 5).

5.1.3 Diagnostisches Potential melanogener rVACV

Das Hauptaugenmerk eines Melanin-synthetisierenden Vaccinia-Virus-Konstrukts lag auf den diagnostischen Möglichkeiten, die ein solches System bieten könnte. Beispielsweise ist Melanin in der Lage Metallionen zu binden, wodurch Tiefengewebe-Diagnostik mittels MRT ermöglicht wird. Desweiteren ist Melanin durch die hohe Lichtabsorption als Reportersystem der optoakustischen Tomographie geeignet. Die MRT-bezogenen Daten bezüglich der konstitutiv melanogenen rVACV-Konstrukte wurden im Zuge einer Kooperation mit J. Stritzker erhoben und werden im Zuge dieser Doktorarbeit nicht gezeigt.

5.1.3.1 Vaccinia Virus Diagnostik mittels Fluoreszenz basierter optischer Bildgebung

Die Injektion der verwendeten rVACV-Konstrukte führt zur Expression des grün-fluoreszierenden Moleküls GFP im Tumor. Mittels dieses Markers sollte der Infektionsverlauf in A549-Xenotransplantat-tragenden athymischen Nacktmäusen mittels GFP Fluoreszenzsignal an einem Maestro EX Imaging System CRI (US-Woburn Material) analysiert werden. Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen athymischen Nacktmäuse subkutan implantiert, bei einem Tumorummen von $\sim 200\text{mm}^3$ mit GLV-1h68 oder GLV-1h324 infiziert und an Tag 7, 14 und 21 nach Virus Injektion auf ein GFP-Signal untersucht (Abb. 20). Während

der GFP-positive Bereich des Tumors in GLV-1h68-infizierten Mäusen kontinuierlich größer wurde, vergrößerte sich dieser in GLV-1h324 injizierten tumorösen Nacktmäusen von 7 auf 14 dpvi, nahm anschließend aber ab. 28 dpvi wurden die A549-Tumor-tragenden Mäuse getötet und Cryoschnitte angefertigt (Abb. 21 A).

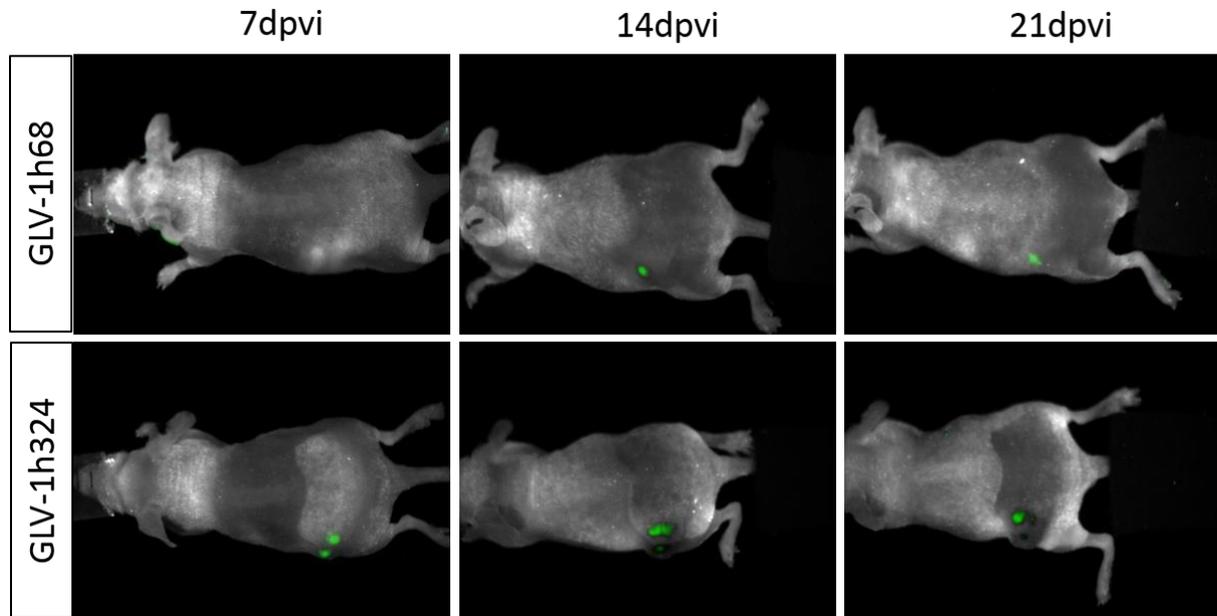


Abbildung 20: GFP-Signal-Messung A549-Xenotransplantat-tragender athymische Nacktmäuse. 7, 14 und 21 Tage nach Injektion GFP exprimierender rVACV GLV-1h68 und GLV-1h324.

Diese wurden sowohl im Hellfeld (Abb. 21 A, links), wie auch mittels Fluoreszenz-Bildgebung im GFP-Kanal (Abb. 21 A, rechts) untersucht. Während im GLV-1h68-infizierten A549-Tumor ein großflächiger Bereich ein GFP-positives Signal aufwies, konnte im GLV-1h324-infizierten A549-Xenotransplantat nur ein kleiner GFP-positiver Bereich detektiert werden. In der Hellfeldaufnahme war jedoch klar ersichtlich, dass nahezu im gesamten GLV-1h324 kolonisierten Tumor Melanin produziert wurde. Da Melanin ausschließlich in GLV-1h324 infizierten Bereichen gebildet wird, entspricht der GFP-positive Bereich nicht der gesamte rVACV-kolonisierten Tumorfläche. Außerdem zeigte sich, dass der GFP-positive Bereich kaum Melanin enthielt. Dies wies darauf hin, dass rVACV-vermitteltes GFP auch in GLV-1h324-kolonisierten Tumoren kontinuierlich gebildet wird, jedoch das Fluoreszenzsignal durch das ebenfalls konstitutiv gebildete Melanin möglicherweise absorbiert wurde. Um dies zu prüfen, wurden A549-Zellen in Zellkultur mit GLV-1h68 als GFP-Positivkontrolle und GLV-1h324 mit einer MOI von 0,1 infiziert und die mittlere GFP-Fluoreszenzintensität anhand von Durchflusszytometrie-Analysen ermittelt (Abb. 21 B). Es zeigte sich, dass die GFP-Fluoreszenzintensität GLV-1h68-infizierter Zellen, auf Grund der viral vermittelten GFP-

Produktion, anstieg. An Tag 3 wurde das Maximum erreicht und sank anschließend, wegen eintretender Onkolyse, wieder leicht ab. Die Fluoreszenzintensität der GLV-1h324-infizierten A549-Zellen hingegen erreichte bereits 24 h nach Infektion das Maximum und nahm im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ab. An Tag 3 und 4 wurde eine signifikant höhere GFP-Signalintensität der GLV-1h68-infizierten A549-Krebszellen, verglichen mit GLV-1h324-infizierten Lungenkarzinomzellen, festgestellt ($p < 0,05$ * und $p < 0,01$ **). Da GFP in GLV-1h68 und GLV-1h324 gleichermaßen genetisch kodiert wird, war davon auszugehen, dass die GFP-Produktion beider Stämme konstitutiv und in vergleichbarer Menge ablief. Das rVACV-Konstrukt GLV-1h324 kodiert zusätzlich Enzyme der Melaninsynthese (mTyr und Tyrp1). Durch die absorbierenden Eigenschaften des Melanins, könnte die Abnahme der GFP-Signalintensität in GLV-1h324-infizierten A549-Zellen und Tumor-Xenotransplantaten verursacht werden. Ein anderer Grund könnte die langsamere Replikation melanogener Viren sein. Dies würde in einer geringeren GFP-Expressionsrate resultieren. Dies würde die GFP-Molekülmenge pro Zelle verringern und somit zu einer geringeren GFP-Fluoreszenzintensität pro Zelle führen.

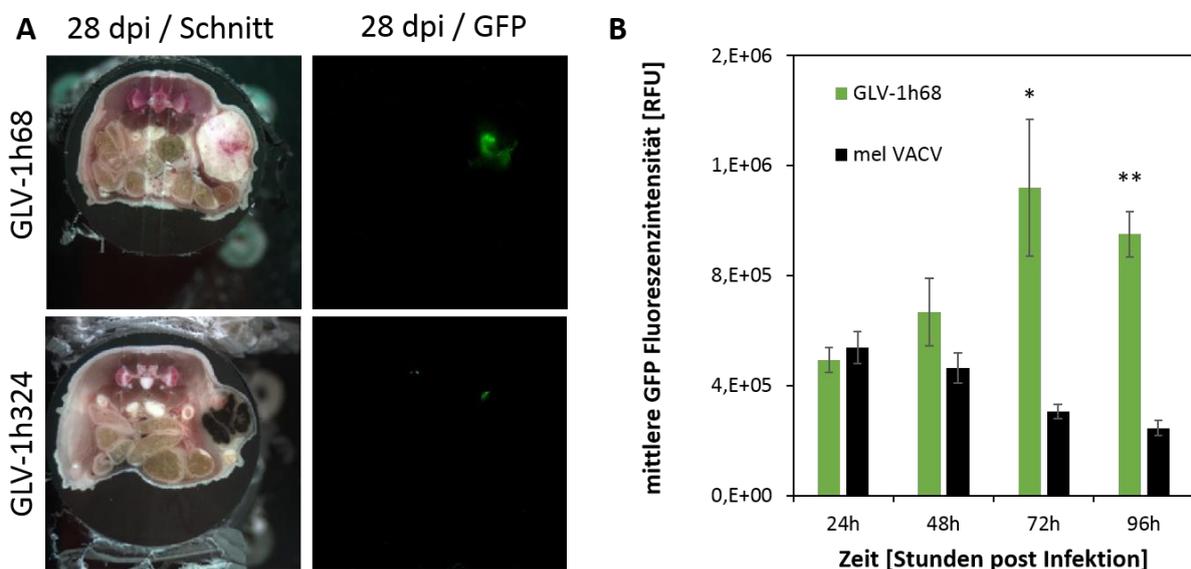


Abbildung 21: Melanin-bedingte Absorption des GFP-Signals in A549-infizierten Tumorzellen. *in vivo* A) und *in vitro* B). GLV-1h68 diente als nicht-melanogener Kontrollvirus. Die Bestimmung der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität erfolgte durch FACS-Messung.

Diese Ergebnisse zeigten, dass in Kombination mit Melaninsynthese der Marker GFP zur Diagnose der Tumorentzündung und viralen Verbreitung keine verlässlichen Aussagen liefert.

5.1.4 Diagnostik mit multispektraler optoakustischer Tomographie (MSOT)

Die optoakustische Tomographie ist eine neuartige tomographische Technologie, welche eine Ganzkörperbildgebung in hoher Auflösung ermöglicht. Hierbei wird Energie kurzer Lichtimpulse durch das bestrahlte Gewebe absorbiert, in thermale Energie und letztendlich durch oszillierende Volumenveränderungen in ein Ultraschallsignal umgewandelt. Melanin ist einer der effektivsten bekannten biologischen Lichtabsorber. Dies qualifiziert es als einen idealen Reporter für die optoakustische Tomographie. Durch die Insertion der Gene für die Schlüsselenzyme der Melaninsynthese in das Vaccinia-Virus-Genom und dessen spezifischen onkolytischen Eigenschaften konnte ein Reportersystem zur Krebsdiagnostik mittels optoakustischer Tomographie generiert werden. In Abbildung 23 A) wurden PC3-RFP- sowie A549- (Abb. 23 B) Krebszellen in Zellkultur mit verschiedenen melanogenen rVACV infiziert, 3 Tage inkubiert und anschließend die optische Absorption der jeweiligen Zellsuspension ermittelt. Sowohl im PC3-RFP- also auch im A549-Zellmodell zeigten die GLV-1h324- (2,7 bzw. 2,6 cm^{-1}) und GLV-1h327- (2,7 bzw. 2,5 cm^{-1}) infizierten Zellsuspensionen die höchste Absorption. Auch die weniger stark melanogenen rVACV GLV-1h326- (1,9 bzw. 1,5 cm^{-1}) und GLV-1h322- (1,6 bzw. 1,0 cm^{-1}) zeigten eine wesentlich höhere optische Absorption verglichen mit den nicht Melanin-synthetisierenden Kontrollen (unbehandelte Zellsuspensionen; 0,03 bzw. 0,04 cm^{-1} und GLV-1h68-infizierten Krebszellsuspension; 0,05 bzw. 0,00 cm^{-1}). Hieraus ist ersichtlich, dass durch das Reportersystem Melanin ein ausreichendes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis gewährleistet war. Durch Kombination des viralen melanogenen Reporters mit der tomographischen Modalität, der multispektralen optoakustischen Tomographie, war es möglich, spezifisch die Präsenz und Verteilung des viral vermittelten Melanins in PC3-RFP-Tumoren und Metastasen (Abb. 23 C) sowie in A549-Xenotransplantaten (Abb. 23 D) zu detektieren. Desweiteren wurde die optische Absorption der Tumore bzw. Metastasen der *in vivo* mittels MSOT gemessenen PC3-RFP- oder A549-Xenotransplantat-tragenden Nacktmäuse quantifiziert (Abb. 23 E). Es konnte gezeigt werden, dass melanogene GLV-1h324-infizierte PC3-RFP-Tumore (1,5 bis 2,1 cm^{-1}) signifikant höhere Melanin-spezifische optische Absorption zeigten als GLV-1h68-infizierte Melanin-negative Xenotransplantate (1,09 bis 1,12 cm^{-1}). Dies konnte auch bezüglich der PC3-RFP-Metastasen festgestellt werden (GLV-1h314; 1,5 bis 2,3 cm^{-1} und GLV-1h68; 1,03 bis 1,18 cm^{-1}). Als Melanin-spezifisches Signal wurden Pixel mit einer optischen Absorption $> 1 \text{ cm}^{-1}$ definiert. Signifikanz wurde im Zuge der Lymphknoten-Metastasen-Analyse wegen der geringen Mausezahl nicht erreicht.

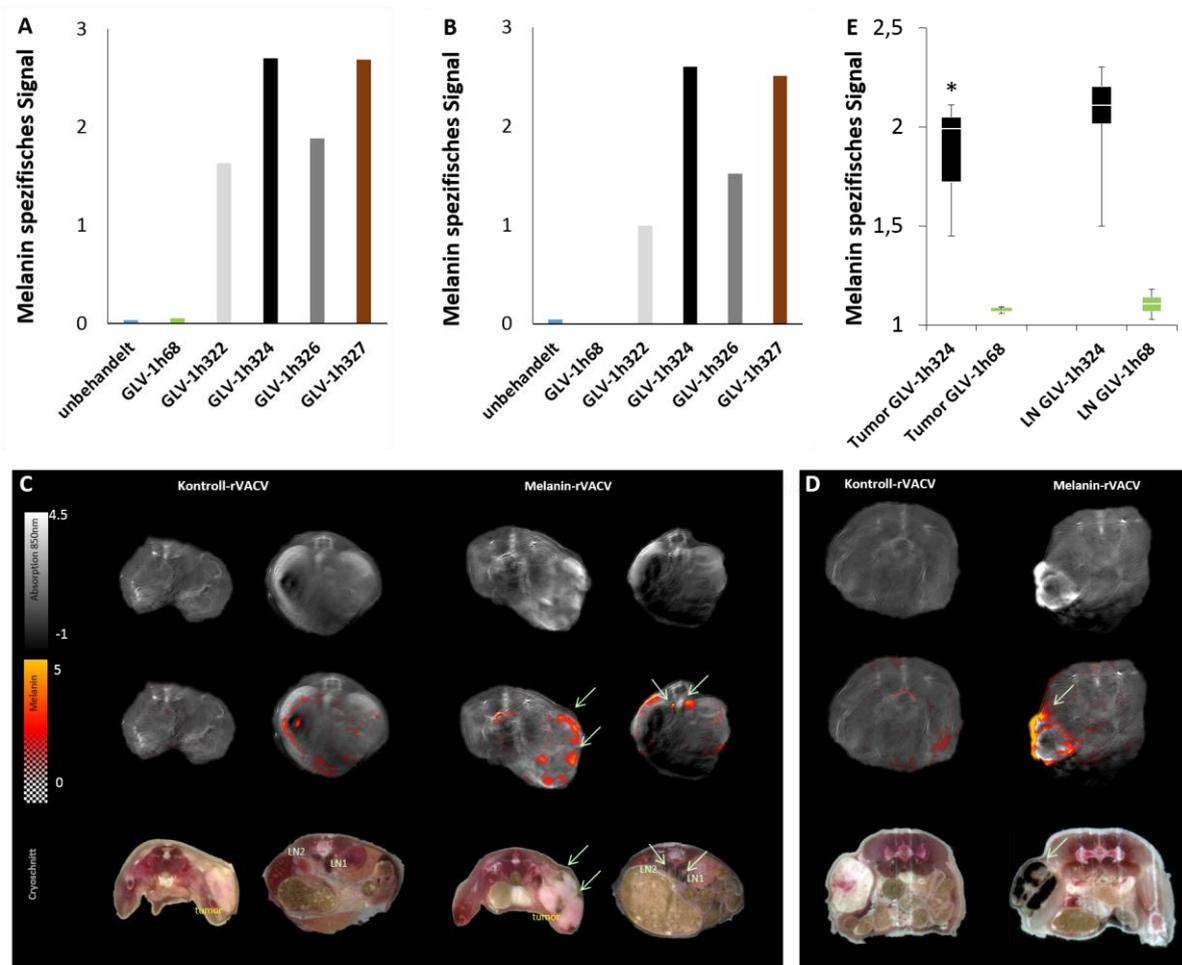


Abbildung 23: Optoakustische Tomographie in PC3-RFP und A549 Tumor tragenden athymischen Nacktmäusen und in Zellkultur. Optoakustischen Signals einer PC3-RFP A) und A549 B) Zellsuspension 3 Tage nach Infektion mit verschiedenen rVACV-Konstrukten. Obere Reihe C) und D) zeigt das optoakustische Hintergrundsignal (Anregung mit 850 nm). Mittlere Reihe zeigt die Melaninverteilung (Falschfarben-Karte) nach Anregung mit 11 verschiedenen Wellenlängen in 15 nm Schritten (700 – 850 nm) im Overlay mit dem Hintergrundbild. Ein positives Melanin-Signal wurde in den Melanin-rVACV- (GLV-1h324) infizierten Tumoren festgestellt, welches mit der Melaninverteilung, ersichtlich in den Cryoschnitten (untere Reihe), korreliert. Melanin-Signal in MSOT-Aufnahme und Cryoschnitt markiert mit Pfeilen. E) Quantifizierung des optoakustischen Signals in GLV-1h324- (melanogen, schwarz) und GLV-1h68- (Kontroll-rVACV, grün) infizierten Tumoren (GLV-1h324-injizierte Mäuse n = 5; GLV-1h68-injizierte Mäuse n = 3) und Lymphknoten (GLV-1h324-injizierte Mäuse n = 3; GLV-1h68-injizierte Mäuse n = 2). Dargestellt als Box-Whisker Plot. Das ermittelte Melanin-spezifische Signal ($> 1 \text{ cm}^{-1}$) war signifikant höher in GLV-1h324-infizierten Tumoren verglichen mit GLV-1h68-infizierten ($p < 0,05$).

5.2 Doxycyclin-induzierbar melanogene rekombinante Vaccinia Viren

5.2.1 Charakterisierung in Zellkultur

Wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, wurde ein auf Vaccinia-Virus-basierendes Reportersystem zur Krebsdiagnose entwickelt, welches die Tiefengewebe-Tomographie mittels MRT und MSOT ermöglicht. Die melanogenen rVACV-Konstrukte zeigten

jedoch eine geringere Replikationsrate in Zellkultur und ein abgeschwächtes therapeutisches Potential in den untersuchten *in vivo* Xenotransplantat-Modellen, verglichen mit dem parentalen rVACV GLV-1h68. Um diese Attenuierung der melanogenen rVACV zu revidieren, jedoch weiterhin das hohe diagnostische Potential zu gewährleisten, wurde die Expression des Schlüsselenzyms der Melaninsynthese, die Tyrosinase, durch einen Operator, induzierbar durch Tetracyclin und dessen Derivate wie Doxycyclin, reguliert. Desweiteren wurde der nötige Repressor (TetR) in das virale Genom, in den F14.5L-Lokus an Stelle des *Ruc-GFP*-Konstrukts, inseriert. Dieses rVACV, GLV-1h462, wurde im Folgenden zusammen mit den Kontrollviren GLV-1h312 (induzierbare *RFP*-Expression, nicht-melanogen) und GLV-1h460 (konstitutive *mTyr*-Expression, melanogen) analysiert (Abb. 24 A).

5.2.1.1 Expression der inserierten Fremdgenkassetten

Die Expression der inserierten Markergene der drei bereits erwähnten Vaccinia-Virus-Stämme GLV-1h312, GLV-1h460 und GLV-1h462 sollten vorab untersucht werden. Im Zuge dieser Analysen wurden A549-Lungenkarzinomzellen mit den drei unterschiedlichen rVACV-Konstrukten infiziert (MOI 0,1) und Proteinproben 24 hpi in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) (1 µg/ml) geerntet. Diese wurden anschließend mittels eines Western Blot analysiert (Abb. 24 B). Das humane beta-Aktin konnte in allen Lysaten detektiert werden und diente als Ladungskontrolle. Die Expression des 25 kDa Tet-Repressors wurde in GLV-1h312 und GLV-1h462 infizierten Zelllysaten Doxycyclin-unabhängig nachgewiesen. Weiterhin konnte das *Ruc-GFP* (64 kDa) ausschließlich in Lysaten GLV-1h460-infizierter A549-Zellen Dox-unabhängig nachgewiesen werden. Im Zuge der Western Blot-Analyse konnte ebenfalls die Funktionsfähigkeit des Tet-Systems aufgezeigt werden, da die Expression der Tet-regulierten Gene ausschließlich in Gegenwart von Doxycyclin detektiert wurde. Somit wurde mRFP1 (30 kDa) nur in GLV-1h312-infizierten A549-Zellen bei Dox-Gabe detektiert, ebenso wie die *mTyr*-Expression (70 kDa) in GLV-1h462-infizierten A549-Lungenkarzinomzellen, nicht jedoch bei Inkubation ohne Doxycyclin. A549-Zellen infiziert mit GLV-1h460, welche *tetR* nicht kodieren, exprimierten *mTyr* sowohl in Gegenwart als auch bei fehlendem Doxycyclin. Alle drei verwendeten rVACV-Konstrukte kodieren *gusA*, die *E. coli* beta-Glucuronidase (60 kDa), inseriert in den HA-Lokus (Abb. 24 A). Expression des *GusA* konnte Dox unabhängig gezeigt werden (Abb. 24 B). Die nicht infizierten (mock infiziert) A549-Krebszellen dienten als Negativkontrolle der viral kodierten Markerproteine.

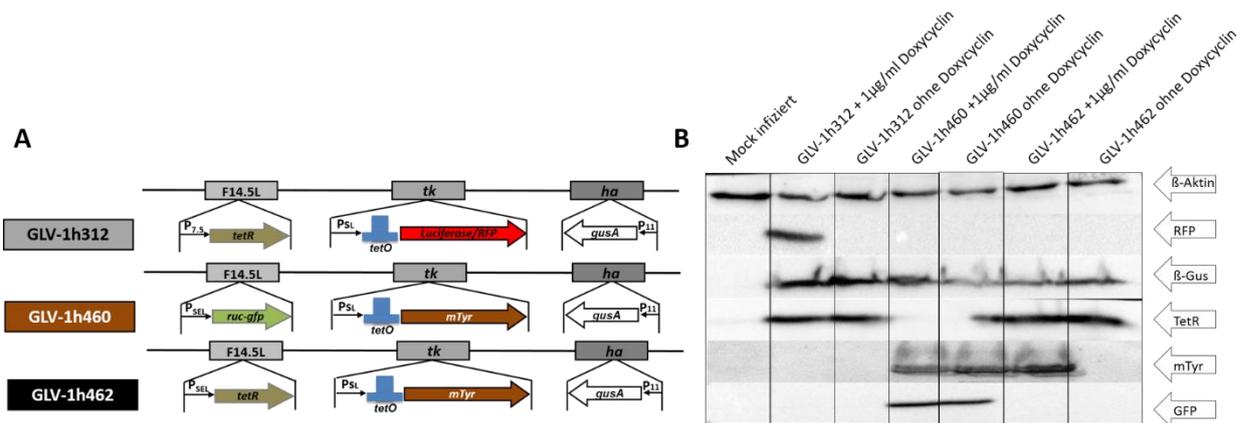


Abbildung 24: Schematische Genkarte A) der relevanten Insertionen des Doxycycline-induzierbar melanogenen rekombinanten Vaccinia-Virus (rVACV) GLV-1h462 und dessen Kontrollviren, sowie deren Expression analysiert mittels Western Blot B).

5.2.1.2 Induzierbarkeit und melanogenes Potential der rVACV

Um die minimale induzierende Doxycyclinkonzentration zu ermitteln, welche zur *mTyr*-Expression und in Konsequenz zur Melaninsynthese in GLV-1h462 infizierten A549-Zellen führte, wurden diese in unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 und 1 μ g/ml) 5 Tage inkubiert (Abb. 25 A). Mock und GLV-1h312 infizierte A549-Krebszellen dienten als Negativkontrolle der Melaninproduktion und zeigten eine niedrige optische Dichte bei 475 nm (OD_{475}) nach Inkubation in den getesteten Dox-Konzentrationen. Die OD_{475} der nicht-infizierten Lungenkarzinomzellen war Doxycyclin-unabhängig nahezu konstant ($0,1 \pm 0,01$). Die GLV-1h312-infizierten A549-Krebszellen zeigten eine niedrigere OD_{475} verglichen mit den nicht-infizierten A549 Zellen. Dies ist zurückzuführen auf die reduzierte Zellzahl bedingt durch viral-vermittelte Onkolyse. Die Infektion mit GLV-1h460 führte zu konstitutiver Melaninproduktion und diente als Positivkontrolle der Melaninsynthese. Dies führte zu einer konstant hohen Absorption ($0,28 \pm 0,01$) bei 475 nm unabhängig von der im Wachstumsmedium verwendeten Doxycyclinmenge. Im Gegensatz dazu zeigten GLV-1h462-infizierte A549-Zellen eine niedrige optische Dichte ohne Dox ($0,087 \pm 0,003$) und in Gegenwart von 0,01 μ g/ml Dox ($0,103 \pm 0,014$). Ab einer Doxycyclinkonzentration von 0,05 μ g/ml wurde ein signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der OD_{475} ($0,284 \pm 0,009$), und somit Melaninsynthese, festgestellt. Zusätzlich zu den Absorptionmessungen, wurde die L-DOPA-Umsatzrate als Marker der Tyrosinase-Aktivität GLV-1h460 und GLV-1h462-infizierter A549-Zellen 24 h nach Virusinfektion (hpi) in An- und Abwesenheit von Doxycyclin bestimmt (Abb.

25 B). A549-Zelllysate der konstitutiv *mTyr* exprimierenden GLV-1h460-infizierten Lungenkarzinomzellen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) bei Dox-Gabe ($0,089 \pm 0,01 \Delta OD_{475}/10 \text{ min}$) und ohne Doxycyclin im Wachstumsmedium ($0,091 \pm 0,01 \Delta OD_{475}/10 \text{ min}$). Im Gegensatz dazu konnte bei GLV-1h462-infizierten Zellen eine signifikant ($p < 0,01$) höhere L-DOPA-Umsatzrate nach Dox-Induktion ($0,074 \pm 0,006 \Delta OD_{475}/10 \text{ min}$) als ohne Doxycyclin ($0,000 \pm 0,000 \Delta OD_{475}/10 \text{ min}$) festgestellt werden.

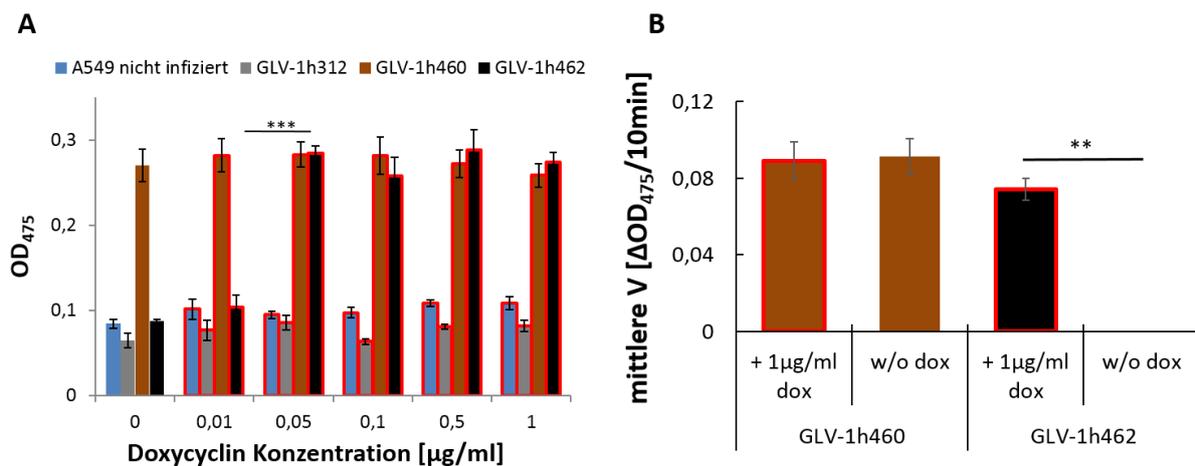


Abbildung 25: Induzierbarkeit des melanogenen rVACV-Konstrukts GLV-1h462. A) Messung der Absorption bei 475 nm rVACV-infizierter A549-Zellen inkubiert mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen. Signifikant höhere Absorption GLV-1h462 infizierter A549-Zellen ab 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin ($p < 0,001$) B) L-DOPA-Umsatzrate von Lysaten melanogener rVACV-infizierter A549-Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ und ohne Doxycyclin. Signifikant höhere Umsatzrate bei Doxycyclin-induzierten GLV-1h462 infizierten A549 Krebszellen verglichen mit der nicht induzierten Gruppe ($p < 0,01$).

5.2.1.3 Onkolytisches Potential der induzierbar melanogenen rVACV

Die Melaninsynthese bedingte Verlangsamung der viralen Replikation, sollte durch die Induzierbarkeit des viralen melanogenen Systems umgekehrt und somit bei nicht Induktion der Melaninsynthese ein verbessertes therapeutisches Potential erreicht werden.

Deshalb wurde experimentell untersucht, ob GLV-1h462 im nicht-induzierten Status eine beschleunigte Replikation und eine schnellere Ausbreitung zeigte. Hierfür wurden A549 Lungenkarzinomzellen und PANC-1 Pankreaskarzinomzellen mit GLV-1h460 und GLV-1h462 infiziert mit CMC-Medium überschichtet und 2 Tage mit 1 $\mu\text{g/ml}$ oder ohne Doxycyclin inkubiert. Anschließend wurde der maximal Durchmesser der entstandenen Plaques mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt. Plaques hervorgerufen von nicht-induzierten GLV-1h462-

infizierten A549-Zellen (Abb. 26 A) waren größer als diejenigen der Melanin-produzierenden GLV-1h460- und Doxycyclin-induzierten melanogenen GLV-1h462-infizierten A549-Zellen. Dieses Ergebnis konnte in PANC-1-Zellen reproduziert werden, die in identischer Weise wie A549-Zellen behandelt wurden (Abb. 26 C). Die quantitative Analyse ergab einen signifikant ($p < 1 \times 10^{-20}$) größeren max. Plaque-Durchmesser für nicht-induzierte nicht-melanogene GLV-1h462-infizierte A549-Zellen ($124 \pm 32 \mu\text{m}$), verglichen mit den kontinuierlich Melanin synthetisierenden GLV-1h460-infizierten Zellen inkubiert mit ($62 \pm 22 \mu\text{m}$) und ohne ($67 \pm 24 \mu\text{m}$) Doxycyclin sowie den induzierten Melanin produzierenden GLV-1h462-infizierten A549-Krebszellen ($71 \pm 31 \mu\text{m}$). Die jeweiligen Melanin-synthetisierenden Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des maximalen Plaque-Durchmessers. Die quantitative Analyse der Plaques nach Infektion mit GLV-1h460 und GLV-1h462 in PANC-1 Zellen (Abb. 26 D) ergab ebenfalls signifikant ($p < 1 \times 10^{-20}$) größere Plaques der nicht-induzierten nicht-Melanin-synthetisierenden GLV-1h462-infizierten PANC-1-Zellen ($360 \pm 109 \mu\text{m}$) verglichen mit den konstitutiv Melanin-produzierenden GLV-1h460-infizierten Pankreaskarzinomzellen nach Dox-Gabe ($147 \pm 64 \mu\text{m}$) und ohne Doxycyclin ($126 \pm 54 \mu\text{m}$) sowie der induzierten melanogenen GLV-1h462-infizierten Zellen ($135 \pm 57 \mu\text{m}$). Plaques der Melanin-produzierenden Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

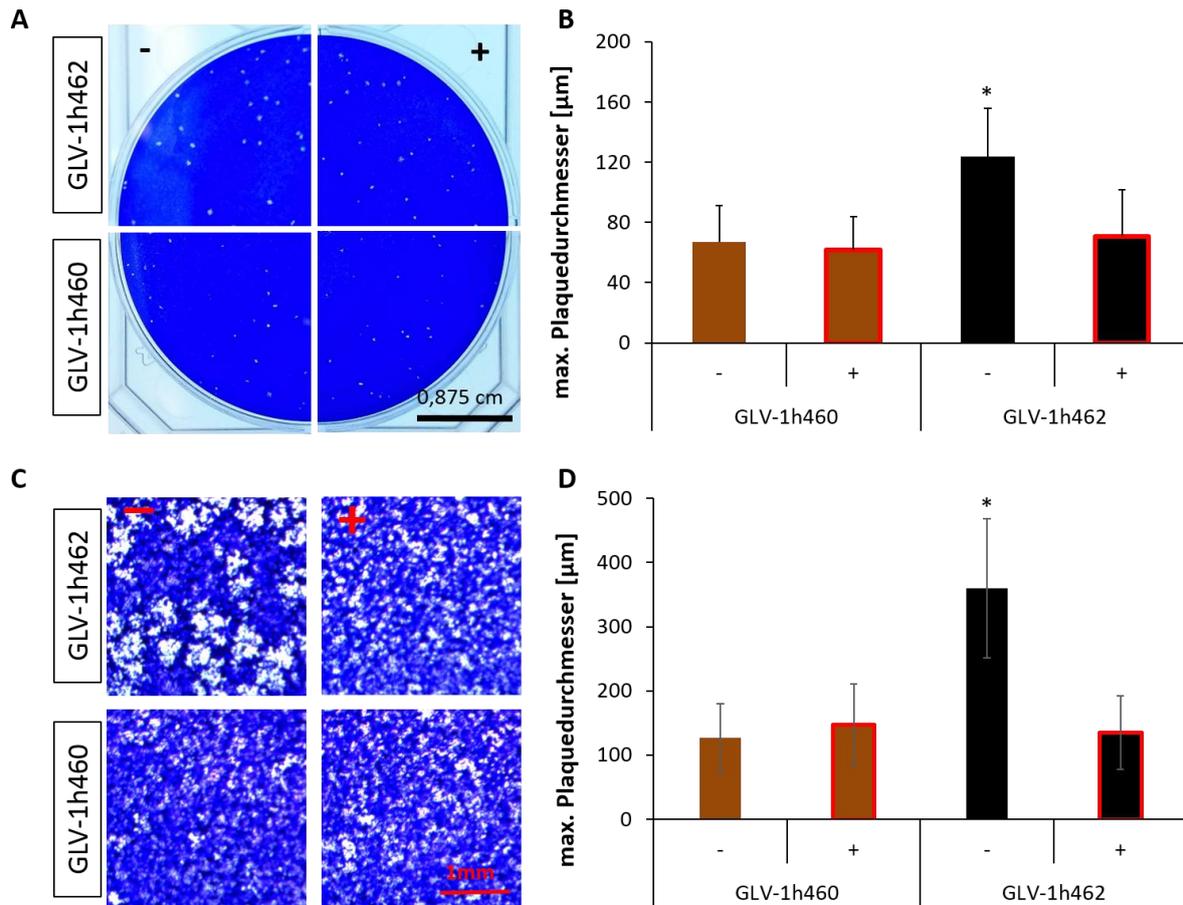


Abbildung 26: Onkolytisches Potential in Zellkultur melanogener rVACV nach Doxycyclin-Induktion in A549- und PANC-1-Krebszellen. A) Photographie und B) quantitative Auswertung des maximalen Plaque-Durchmessers von A549-Krebszellen infiziert mit melanogenen rVACV inkubiert mit (+) oder ohne (-) 1 µg/ml Doxycyclin. C) und D) analog zu A) und B) mit PANC-1-Pankreaskarzinom Zellen infiziert mit melanogenen rVACV. In beiden Zelllinien zeigte die nicht-induzierte GLV-1h462-infizierten Zellen signifikant größere max. Plaque-Durchmesser verglichen mit den induzierten Melanin-synthetisierenden GLV-1h462-infizierten Zellen oder den GLV-1h460-infizierten Zellen ($p < 1 \times 10^{-20}$; $n > 50$)

In einem weiteren Experiment wurde die virale Replikation in A549- und PANC-1-Krebszellen in Zellkultur untersucht. Hierzu wurden A549-Zellen mit GLV-1h68 und GLV-1h462 infiziert (MOI 0,01), mit und ohne 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert und seriell über 3 Tage der virale Titer mittels Standard Plaque Assay ermittelt (Abb. 27 A). Es zeigte sich, dass die Titer der nicht-induzierten und somit nicht Melanin-produzierenden GLV-1h462-kolonisierten A549-Zellen, den Titern GLV-1h68-infizierter Zellen glichen. Während Doxycyclin keinen Einfluss auf die GLV-1h68-Replikation hatte, wurde die Replikation des rVACV GLV-1h462 durch die Induktion der Melanin-Biogenese verlangsamt. Der ermittelte Titer 24 hpi der induzierten melanogenen GLV-1h462 24 war 2,99-fach geringer als der Titer der nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462. Nach 48 h Inkubation war der Titer 8,29-fach und 72 hpi 37,07-fach geringer als der, der nicht induzierten Melanogenese-negativen GLV-1h462-infizierten A549-Krebszellen. In Abbildung 27 B) wurden die Titer GLV-1h68-, GLV-1h460- und GLV-1h462-infizierter PANC-

1-Krebszellen nach Inkubation mit und ohne Doxycyclin 24, 48 und 74 hpi dargestellt. Auch in dieser Krebszelllinie konnte gezeigt werden, dass nicht-induzierte nicht Melanin-synthetisierende GLV-1h462-infizierte PANC-1-Zellen eine ähnlich hohe Replikationseffizienz wie GLV-1h68 aufwiesen. Induzierte und somit Melanin-Biogenese betreibende GLV-1h462-infizierte Pankreaskarzinomzellen zeigten eine ähnlich niedrige Replikationsrate wie die konstitutiv Melanin-produzierenden GLV-1h460-infizierten Zellen. Im Gegensatz zu dem induzierbaren rVACV GLV-1h462 wiesen die Titer der nicht-induzierbaren Kontrollviren (GLV-1h68 und GLV-1h460) vernachlässigbare Unterschiede zwischen den Zellen, inkubiert mit oder ohne Doxycyclin, auf. Auch in diesem Experiment konnte sowohl im A549- als auch im PANC-1-Krebszellmodell eine erhöhte Replikation und damit verbessertes therapeutisches Potential der nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462 Vaccinia-Viren verglichen mit induzierten melanogenen GLV-1h462 festgestellt werden.

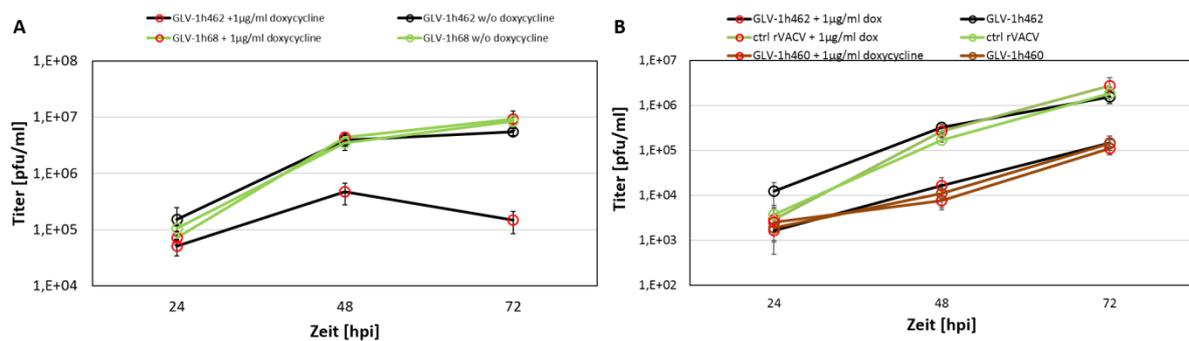


Abbildung 27: Replikationsanalyse des Doxycyclin-induzierbaren melanogenen Vaccinia Virus GLV-1h462. A) A549 infiziert mit GLV-1h68 (nicht-melanogene Kontrolle, grün) und GLV-1h462 (schwarz) (MOI 0.01) in Doxycyclin Gegenwart (roter Kreis) oder Absenz (grüner bzw. schwarzer Kreis). B) PANC-1 infiziert mit GLV-1h68 (nicht-melanogene Kontrolle), GLV-1h460 (konstitutiv melanogene Kontrolle, braun) und GLV-1h462 (MOI 0,1) inkubiert mit und ohne 1 µg/ml Doxycyclin.

Zur Untersuchung des onkolytischen Potentials wurden A549- und PANC-1-Karzinomzellen mit GLV-1h68 (nicht melanogene, nicht induzierbare virale Kontrolle), GLV-1h312 (nicht melanogene, induzierbare virale Kontrolle), GLV-1h460 (konstitutiv melanogene, nicht induzierbare virale Kontrolle) und GLV-1h462 (induzierbar-melanogenes rVACV-Konstrukt) infiziert (MOI 0,01 bzw. 0,1) oder unbehandelt (mock) belassen. Anschließend wurde die Überlebensrate 24, 48, 72 und 96 hpi mittels MTT-Assay ermittelt und die Ratio der gemessenen OD₅₇₀ der mit Doxycyclin (1 µg/ml) inkubierten infizierten bzw. unbehandelten Zellen und der ohne Doxycyclin inkubierten Karzinomzellen gebildet. Wie in Abbildung 28 A zu

sehen ist, wurde eine Doxycyclin unabhängige Onkolyse für unbehandelte A549-Zellen ($1,00 \pm 0,08$), für GLV-1h68- ($0,98 \pm 0,13$), für GLV-1h312- ($0,98 \pm 0,05$) und für GLV-1h460- ($0,95 \pm 0,10$) infizierte Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt. Das Verhältnis, der nach Induktion Melanin-synthetisierenden GLV-1h462-infizierten A549-Zellen, zeigte 24 hpi keine verringerte Onkolyse ($0,9 \pm 0,15$) verglichen mit den nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu, war die Überlebensrate der induzierten GLV-1h462-infizierten Zellen 48 hpi ($1,2 \pm 0,07$), 72 hpi ($1,8 \pm 0,10$) und 96 hpi ($1,4 \pm 0,11$) signifikant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) höher als die der nicht Doxycyclin-induzierten nicht melanogenen GLV-1h462-infizierten A549-Zellen. Ähnliche Resultate zeigten sich nach Infektion von PANC-1-Pankreaskarzinomzellen mit denselben rVACV-Konstrukten (Abb. 28 B). Während die Kontrollen (mock: $0,97 \pm 0,04$; GLV-1h68: $0,97 \pm 0,10$; GLV-1h312: $1,01 \pm 0,10$; GLV-1h460: $0,97 \pm 0,04$) zu den jeweiligen Zeitpunkten keine signifikanten Doxycyclin-abhängigen Unterschiede bezüglich Onkolyse aufzeigten, konnte 72 hpi ($1,49 \pm 0,03$) und 96 hpi ($1,59 \pm 0,09$) eine signifikant (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) höhere Überlebensrate der induzierten GLV-1h462-infizierten PANC-1-Zellen, verglichen mit nicht-induzierte GLV-1h462-kolonisierten Zellen festgestellt werden.

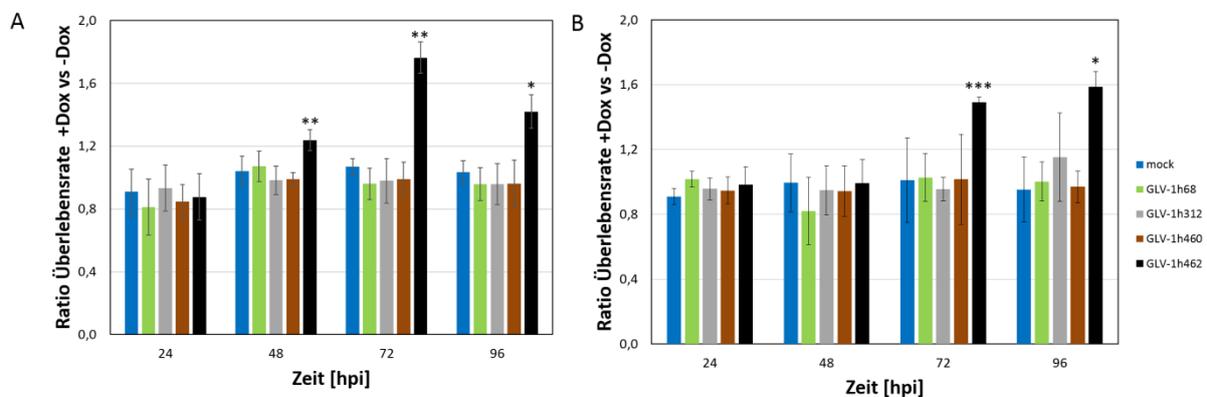


Abbildung 28: Überlebensrate rVACV-infizierter Krebszellen *in vitro*. A) A549-Lungenkarzinomzellen infiziert (MOI 0,01) mit GLV-1h68 (grün, nicht-melanogene Kontrolle), GLV-1h312 (grau, Doxycyclin induzierbar, nicht-melanogene Kontrolle), GLV-1h460 (braun, melanogene Kontrolle) und GLV-1h462 (schwarz, Doxycyclin induzierbar, melanogene Kontrolle) oder unbehandelt (blau). Signifikant höhere Überlebensrate Doxycyclin induzierter Melanin-synthetisierender GLV-1h462 infizierter A549 Zellen 48 ($p < 0,01$), 72 ($p < 0,01$) und 96 hpi ($p < 0,05$) verglichen mit nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-infizierten A549-Krebszellen. B) PANC-1-Pankreaskarzinom infiziert (MOI 0,1) mit den unter A) genannten rVACV-Konstrukten. Signifikant erhöhte Überlebensrate Doxycyclin-induzierter melanogener GLV-1h462-infizierter PANC-1-Zellen 72 ($p < 0,001$) und 96 hpi ($p < 0,05$) gegenüber nicht-induzierter nicht-melanogener GLV-1h462-infizierter PANC-1-Krebszellen ($n = 3$). Balken repräsentieren Verhältnis der OD₅₇₀ Dox-behandelter zu nicht Dox-behandelter Zellen.

5.2.2 Evaluierung im Mausmodell

Anschließend, an die Evaluierung des viral vermittelten induzierbar-melanogenen Systems (GLV-1h462) in Zellkultur, sollte das therapeutische Potential sowie die diagnostischen Eigenschaften in Xenotransplantat-Tumormodellen in athymischen Nacktmäusen untersucht werden.

5.2.2.1 Therapeutisches Potential im Xenotransplantatmodell A549

Um das therapeutische Potential der rVACV-Konstrukte GLV-1h460, GLV-1h68 und GLV-1h462 (mit Doxycyclin behandelt; w/ dox und ohne Doxycyclinbehandlung; w/o dox) *in vivo* zu charakterisieren, wurde A549-Lungenkarzinom-Xenotransplantat-tragenden (~200 mm³) athymischen Nacktmäusen das jeweilige rVACV Konstrukt intravenös injiziert. 18 Tage nach viraler Injektion (dpvi) wurden die GLV-1h68- und GLV-1462-injizierten Mäuse auf je zwei Gruppen aufgeteilt. Während eine 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser erhielt, wurde der anderen kein Doxycyclin-Supplement zugeführt. Anschließend wurde wöchentlich die Tumorgroße vermessen (Abb. 29 A) sowie Blut zur Bestimmung des serologischen *E. coli* beta-Glucuronidase-Spiegels (Abb. 29 B) entnommen. Die nicht-induzierten GLV-1h462-infizierten Tumore wiesen ein sinkendes medianes Tumolvolumen auf, ähnlich dem der nicht-melanogenen GLV-1h68 behandelten Tumore. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass das Volumen GLV-1h68-infizierte Tumore Doxycyclin-unabhängig in ähnlicher Weise abnahm. Im Gegensatz dazu, wurde bei Doxycyclin-induzierten und somit Melanin-synthetisierenden GLV-1h462-kolonisierten A549-Tumor tragenden Nacktmäusen ein höheres medianes Tumolvolumen über das untersuchte Zeitintervall ermittelt, welches dem der konstitutiv Melanin produzierenden GLV-1h460 infizierten Kontrollgruppe ähnelte. Beide Gruppen zeigten ausserdem ein relativ gleichbleibendes medianes Tumolvolumen bis Tag 42 nach viraler Injektion. 49 und 56 dpvi wurden steigende mediane Tumorumfänge der GLV-1h460-injizierten Mäuse festgestellt, während die der induzierten GLV-1h462 infizierten Mäuse abfielen.

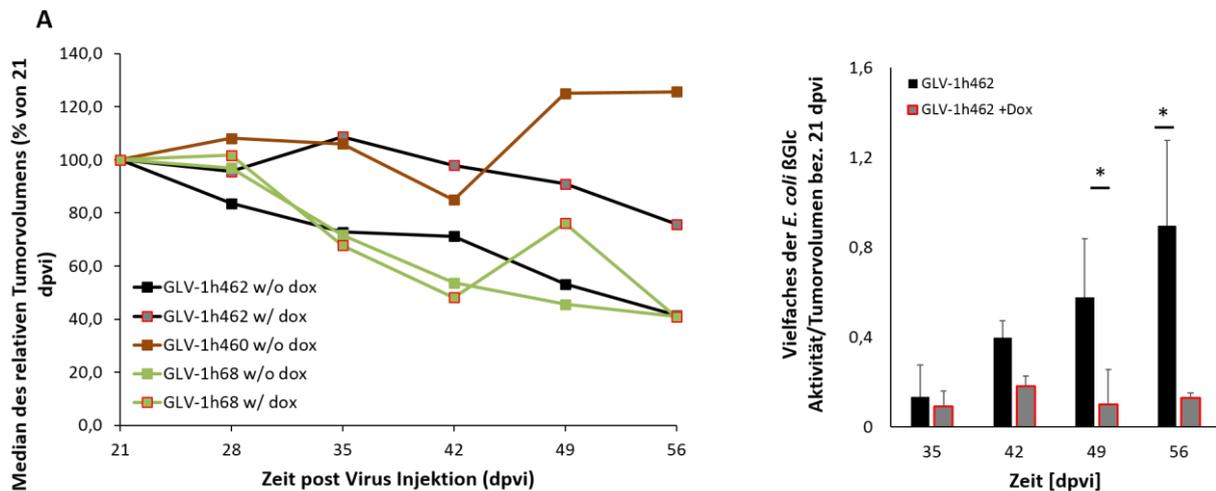


Abbildung 29: Therapeutisches Potential der getesteten rVACV in A549-Xenotransplantat-implantierten athymischen Nacktmäusen. A) Tumolvolumen Messung als Median des relativen Tumolvolumens zu 21 dpvi (3 Tage nach initialer Doxycyclin-Induktion). Zu jedem Zeitpunkt n = 5-8. B) *Escherichia coli*-beta-Glucuronidase-Aktivität Assay von Blutserum-Proben A549-Xenotransplantat-implantierter Mäuse injiziert mit GLV-1h462. *E. coli* Beta-Glucuronidase-Aktivität normalisiert mit dem jeweilige Tumolvolumen als Korrekturfaktor. 49 und 56 Tage nach viraler Injektion (31 und 37 Tage nach Start der Doxycyclin Induktion) konnte ein signifikant höherer *E. coli*-GusA-Level der nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-infizierten Mäuse festgestellt werden ($p \leq 0,05$).

In einem weiteren Experiment wurde als Marker der viralen Replikation und Onkolyse, der *E. coli* beta-Glucuronidase-Spiegel [110] im Blutserum GLV-1h462-infizierter A549-Tumor-tragender athymischer Nacktmäuse ermittelt und mit dem jeweiligen Tumolvolumen des dazugehörigen Zeitpunkt normalisiert. Anschließend wurde das Verhältnis zur Aktivität zum Zeitpunkt der Induktion ermittelt (Abb. 29 B). Es zeigte sich, dass die virale Aktivität der nicht Doxycyclin-induzierten Mäuse über das analysierte Zeitintervall anstieg und 49 und 56 dpvi signifikant ($p \leq 0,05$) höher war als die GusA-Aktivität der induzierten melanogenen GLV-1h462-injizierten Mäuse.

Ein ähnliches Verhalten konnte in PANC-1-Pankreaskarzinom-tragenden athymischen Nacktmäusen, retroorbital (r.o.) injiziert mit den rVACV GLV-1h312, GLV-1h460 und GLV-1h462, beobachtet werden. GLV-1h462-injizierte PANC-1-Tumor-tragender Mäuse wurden in zwei Untergruppen unterteilt, von denen eine ab Tag 0 dpvi mit 100 µg/ml Doxycyclin im Trinkwasser behandelt wurde. In den ersten 5 Wochen nach rVACV-Injektion konnte kein unterschiedliches Tumorstadium bei den mit verschiedenen rVACV-injizierten Mäuse festgestellt werden. Im weiteren Verlauf wurde jedoch eine Inhibition des Tumorstadiums

in GLV-1h312- und nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-injizierten PANC-1-Tumor tragenden Mäusen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten beide Melanin produzierenden rVACV-infizierten Gruppen (GLV-1h460 und GLV-1h462 + Dox) ein kontinuierlich ansteigendes Tumolvolumen, welches in GLV-1h460-injizierten Mäusen 55 dpvi signifikant ($p < 0,05$) größer war als das der GLV-1h462-infizierten nicht-induzierten nicht Melanin produzierenden Tumore. Induzierte melanogene GLV-1h462-infizierte Tumore zeigten 63 dpvi signifikant ($p < 0,05$) größere Tumorumfänge verglichen mit nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462-injizierten PANC-1-Tumor tragenden Mäusen.

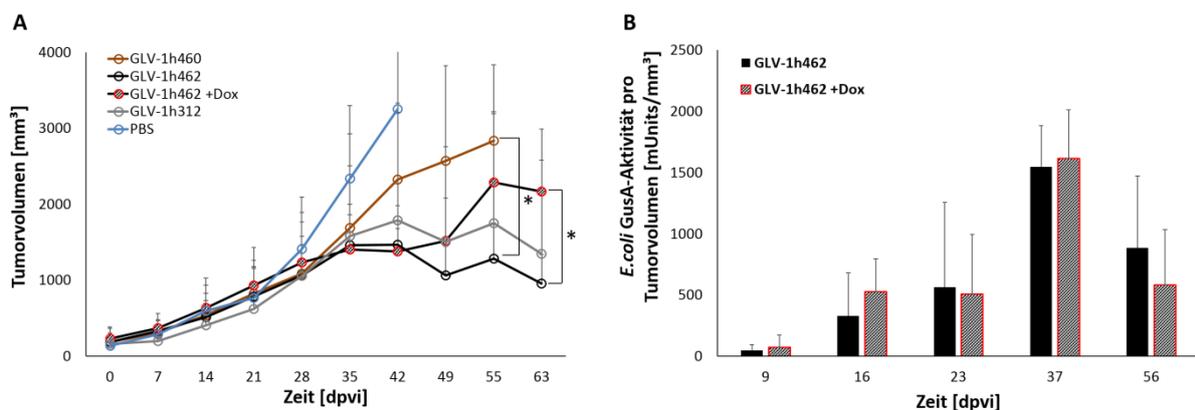


Abbildung 30: Therapeutisches Potential der verwendeten rVACV in PANC-1-Xenotransplantat-implantierten athymischen Nacktmäusen. A) Durchschnittliches Tumolvolumen (n = 3-5). B) *Escherichia coli* beta-Glucuronidase-Aktivität Assay von Blutserum-Proben PANC-1-Xenotransplantat-implantierter Mäuse injiziert mit GLV-1h462 normalisiert mit dem jeweilige Tumolvolumen als Korrekturfaktor.

Zur Bestimmung der viralen Replikation und Onkolyse wurde der *E. coli* beta-Glucuronidase-Spiegel im Blutserum PANC-1-Tumor-tragender GLV-1h462-injizierter Mäuse ermittelt und mit dem jeweiligen Tumolvolumen normalisiert. Anschließend wurde die virale Aktivität der Doxycyclin-induzierten GLV-1h462-infizierten Mäuse (graue Balken, roter Rahmen) mit den nicht-induzierten nicht-melanogenen GLV-1h462 injizierten Blutserumproben (schwarze Balken, kein Rahmen) verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des *E. coli* GusA-Spiegels festgestellt werden. Die Blutsera der nicht-induzierten nicht Melanin-synthetisierenden GLV-1h462-injizierten Mäuse zeigten 56 dpvi eine höhere Aktivität verglichen mit der melanogenen induzierten GLV-1h462-injizierten Gruppe.

Es konnte gezeigt werden, dass das therapeutische Potential des viral vermittelten melanogenen Systems durch Einführung eines induzierbaren Operators und der damit

einhergehenden Möglichkeit die Melaninsynthese ausschließlich bei Notwendigkeit zu aktivieren, stark erhöht wurde.

5.2.3 Diagnostischer Tumornachweis mittels MSOT

Wie bereits nachgewiesen wurde, ist die rVACV-vermittelte Melaninsynthese infizierter Tumorzellen mittels multispektraler optoakustischer Tomographie (MSOT) und Magnetresonanztomographie (MRT) visualisierbar. Um zu ermitteln, ob das neuartige induzierbare melanogene auf Vaccinia-Virus basierende Reportersystem (GLV-1h462) weiterhin für diese bildgebenden Verfahren geeignet ist, wurden A549-Tumor-Xenotransplantate zu unterschiedlichen Zeiten nach Doxycyclin-Induktion *ex vivo* mittels MSOT analysiert. Bereits 4 Tage nach Induktion (dpi) konnten Melanin-spezifische vMSOT (volumetrische MSOT) Signale detektiert werden, welche durch visuelle Kontrolle bestätigt wurden (Abb. 31). Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (18 dpi) wurde die höchste Signalintensität der GLV-1h462-infizierten mit Doxycyclin-induzierten A549-Tumore festgestellt, während das nicht induzierte Pendant kein oder ein sehr geringes Melanin spezifisches Signal zeigte.

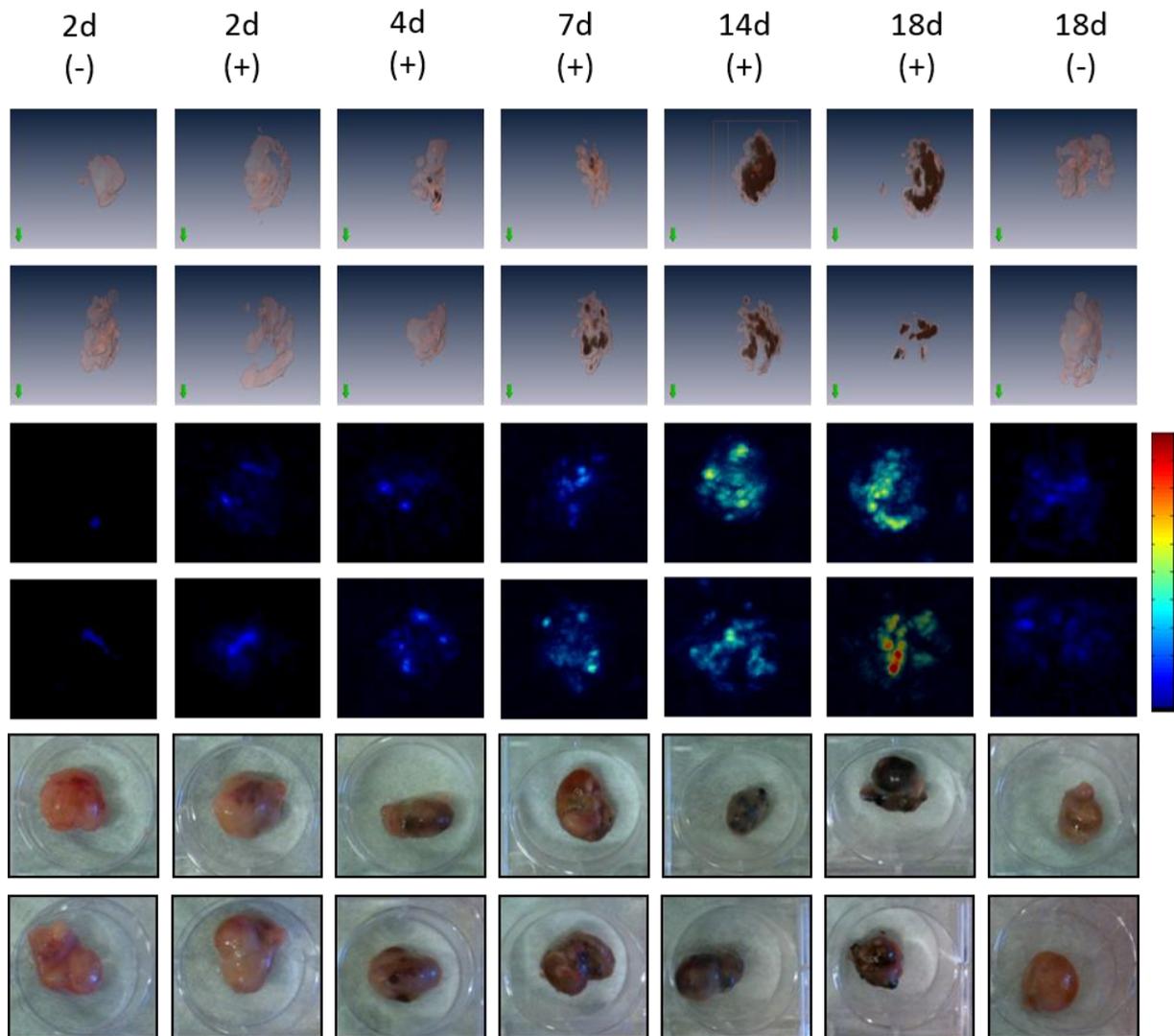


Abbildung 31: Ex vivo vMSOT Aufnahmen und Fotografien von A549-Tumoren. A549-Tumor tragende athymische Nacktmäuse injiziert mit GLV-1h462 Doxycyclin-induziert und nicht induziert. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei A549 Tumore identischer Behandlung als 3D-Rekonstruktion der vMSOT-Bilder (oberen 2 Reihen), als vMSOT-Schnittbild (mittleren 2 Reihen) und als Fotografie (unteren 2 Reihen) dargestellt. Signalintensität der MSOT-Schnittbilder wurde in Falschfarben dargestellt. Die linke und die rechte Spalte zeigen die nicht-induzierte Gruppe (-), die mittleren Spalten zeigen Tumore Doxycyclin behandelter Mäuse (+). Jede Spalte repräsentiert einen Zeitpunkt nach Doxycyclin-Induktion und zeigt denselben Tumor. Die Orientierung der Tumore variiert zwischen den Bildern.

Zur genaueren Analyse des ansteigenden Melaninsignals wurden diese A549-Tumore homogenisiert und mittels MSOT und MRT semiquantitativ analysiert (Abb. 32 A und B). Dabei konnte in beiden Fällen gezeigt werden, dass die Intensitäten der Melanin-spezifischen Signale GLV-1h462-kolonisierter Tumore bei Doxycyclin-Gabe über die Zeit anstiegen. Das optoakustische Signal zu Beginn der Induktion mit Doxycyclin der GLV-1h462-injizierten A549-Tumore war kaum unterscheidbar von den nicht melanogenen Kontrollen, stieg aber kontinuierlich im weiteren zeitlichen Verlauf an. Im Gegensatz dazu, lagen die

optoakustischen Signalintensitäten der nicht-induzierten GLV-1h462-infizierten Tumore bis zum letzten Zeitpunkt im Bereich der nicht Melanin-produzierenden Kontrollen. GLV-1h460-kolonisierte Tumore hingegen zeigten bereits zu Beginn der Messung (2 dpi) einen weitaus höheren Melanin Gehalt, welcher bis zum Endpunkt der Messung leicht anstieg. Dies erklärt sich durch die kontinuierliche Melaninproduktion in diesen Tumoren (Abb. 32 A).

Eine ähnliche Beobachtung konnte für die R1-Relaxationsrate im MRT derselben Proben gemacht werden (Abb. 32 B). Auch hier kam es zu einem Anstieg der Signalintensität (R1-Relaxationsrate) über die Zeit GLV-1h462-infizierter Proben nach Doxycyclininduktion. Wohingegen die R1-Signalintensitäten der nicht-induzierten GLV-1h462 ebenfalls im Bereich der nicht Melanin-synthetisierenden Kontrollen lagen und GLV-1h460-kolonisierte A549-Tumore von Beginn an (2 dpi) einen hohen Melanin Gehalt aufzeigten, welcher über den zeitlichen Verlauf bis zum Endpunkt der Messung (18 dpi) leicht anstieg.

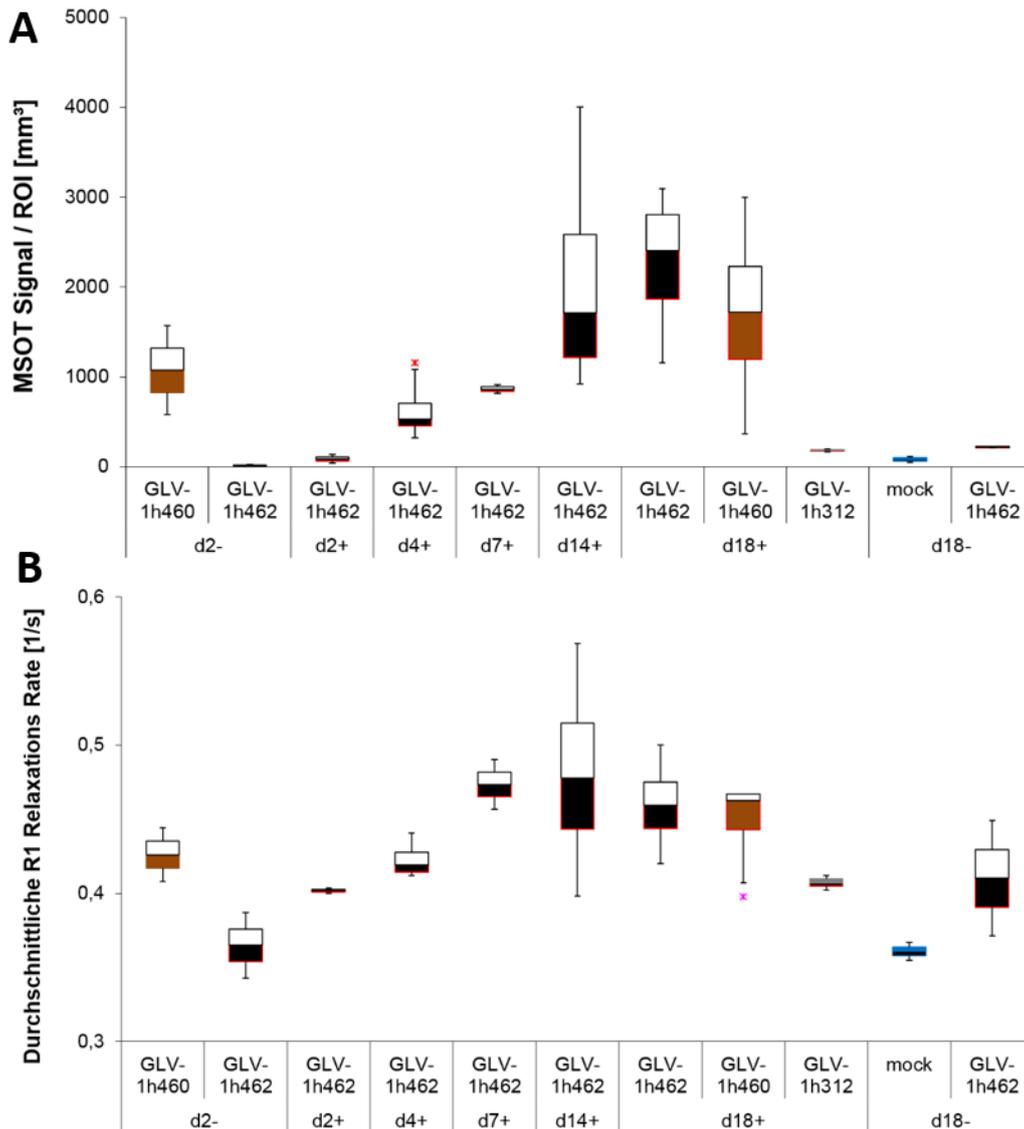


Abbildung 32: Semiquantifizierung des Melaningehalts mittels MRT und optoakustischer Tomographie. Homogenisiertes Tumorgewebe rVACV- (GLV-1h312, GLV-1h460 und GLV-1h462) infiziert oder unbehandelt semiquantitativ analysiert mit multispektraler optoakustischer Tomographie A) und Magnetresonanztomographie B).

Zusätzlich zu dem A549-Tumormodell wurden PANC-1 Tumore *ex vivo* mittels vMSOT analysiert. Auch in diesem Tumormodell konnte die Produktion von Melanin erst nach Doxycyclin-Induktion in GLV-1h462-infizierten Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 33 A). Tumore infiziert mit GLV-1h460 dienten als Positivkontrolle der viral vermittelten Melaninsynthese und GLV-1h312-infizierte Tumor als Negativkontrolle. Weiterhin zeigte sich (Abb. 33 B), dass die viral vermittelte Melaninsynthese zu einer signifikant höheren MSOT-Signalintensität führte, verglichen mit PANC-1 Tumoren infiziert mit nicht Melaninproduktion induzierenden rVACV ($11,07 \pm 5,61$ bzw. $3,74 \pm 0,92$).

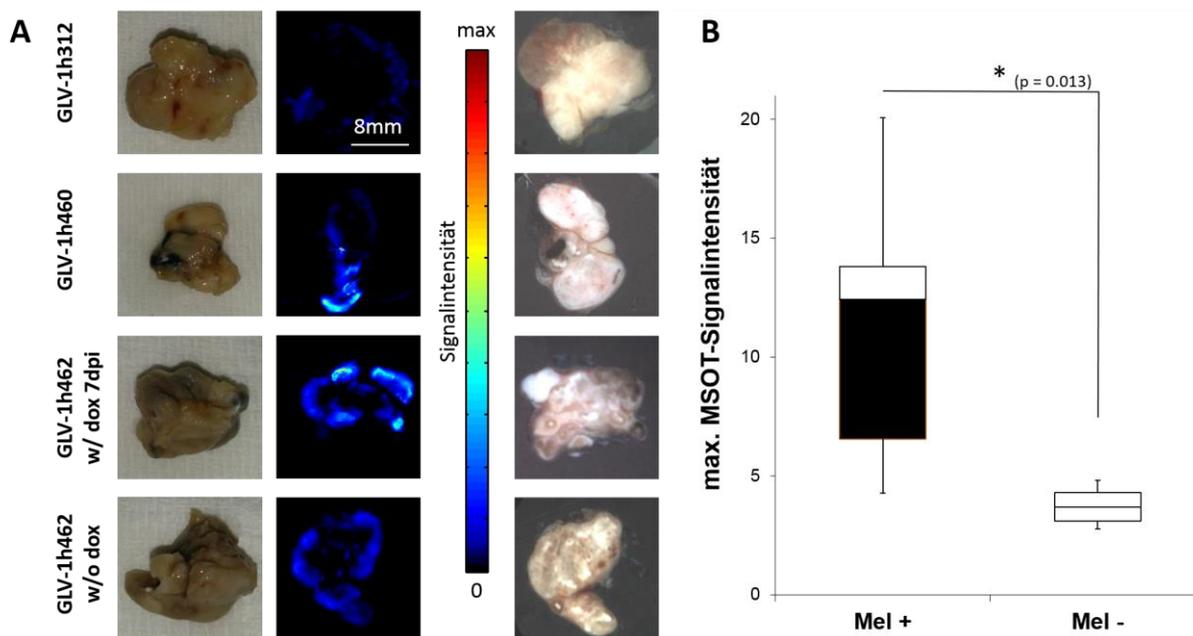


Abbildung 33: vMSOT-Analyse rVACV-infizierter PANC-1 Tumore. A) Photographische Aufnahme der rVACV-infizierten PANC-1 Tumore ex vivo (linke Spalte), vMSOT-Signal dargestellt in falsch Farben (mittlere Spalte) und histologischer Schnitt des jeweiligen Tumors (rechte Spalte). B) Quantitative Auswertung der vMSOT-Signalintensitäten Melanin enthaltender PANC-1 Tumore (GLV-1h460 und GLV-1h462 + Dox; n = 7) und Melanin-negativer Tumore (GLV-1h312 und GLV-1h462 – Dox; n = 4). Die Orientierung der Tumore variiert zwischen den Bildern.

5.3 Adjuvante Krebstherapie mittels Kombination aus melanogenen rVACV und NIR-Laser-vermittelten thermaler Ablation

Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, verlangsamt die viral vermittelte Melaninsynthese die Replikation des melanogenen rVACV-Konstrukts. Neben der genetischen Veränderung, namentlich der Insertion des Tet-Operators zur Doxycyclin-abhängigen Regulation des melanogenen Schlüsselenzyms Tyrosinase zur Verbesserung des therapeutischen Potentials, wurde untersucht, inwieweit thermale Ablation von Melanin-enthaltendem tumorösen Gewebe durch Bestrahlung mit Nahinfrarot (NIR) Laserlicht (808 nm) einen adjuvanten Effekt zur onkolytische Therapie mit Vaccinia-Virus nach sich zieht.

Hierzu wurde in Zellkultur die Temperatur-abhängige Sterblichkeit von A549-Lungenkarzinomzellen untersucht. Diese wurden einerseits für ein konstantes Zeitintervall (120 s) bei unterschiedlichen Temperaturen (Abb. 34 A) und andererseits bei konstanter Temperatur (60 °C) für unterschiedlich lange Zeitintervalle inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate bei steigender Temperatur sowie bei längerer Inkubation bei [60 °C] linear abnahm. Anschließend wurde anhand der Geradengleichung der linearen Trendlinie die letale Dosis bei der 50 % aller behandelten Zellen abgestorben waren (LD₅₀)

sowohl für den Parameter Temperatur (58,7 °C) als auch für die nötige Inkubationszeit bei 60 °C (96,8 s) ermittelt.

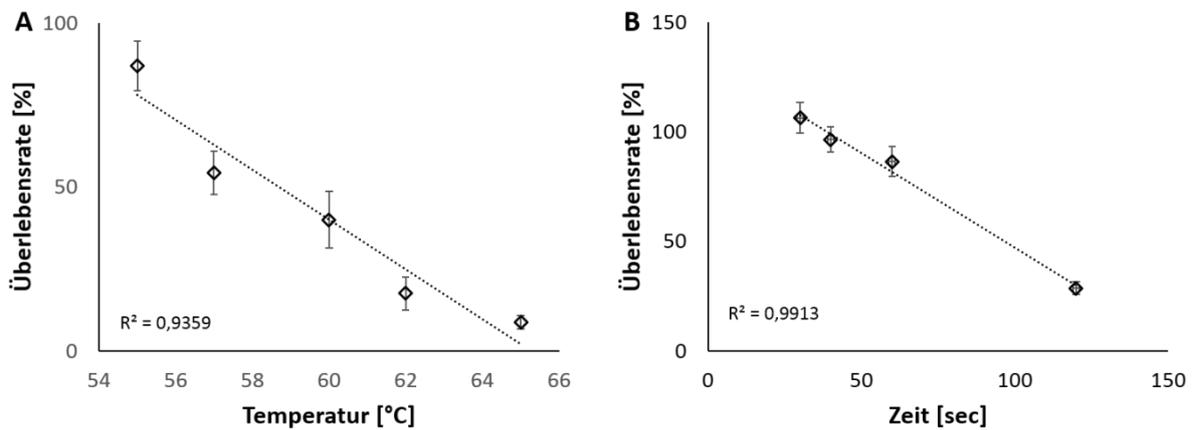


Abbildung 34: Thermale Ablation bei A549-Lungenkrebszellen in Zellkultur. A) Überlebensrate unbehandelter A549 Zellen bei Hitzebehandlung für 2 min mit unterschiedlichen Temperaturen (55 – 65 °C). Letale Dosis 50 (LD₅₀) entspricht einer Temperatur von 58,7 °C bei 2minütiger Behandlung B) Bestimmung der Überlebensrate unbehandelter A549-Zellen bei Hitzebehandlung mit 60 °C und unterschiedlicher Behandlungsdauer (30, 60, 80 und 120 s). LD₅₀ entspricht 96,8 Sekunden bei einer Temperatur von 60 °C.

In einem weiteren Schritt wurden rVACV bezüglich der inhibitorischen Temperatur bzw. der zur Inhibition der replikativen viralen Partikel benötigten Inkubationszeit [60 °C] analysiert (Abb. 35). Es konnte ein nahezu linearer Abfall der Anzahl replikativer viraler Partikel bei steigender Temperatur, sowie bei längerer Inkubationszeit [60 °C] festgestellt werden. Anhand der jeweiligen Geradengleichung wurde die inhibitorische Dosis ermittelt, bei welcher die Replikation 50 % der viralen Partikel inhibiert wurde (ID₅₀). Es konnte eine ID₅₀ des Temperatur-Parameters von 57,7 °C (Abb. 35 A) und eine nötige Inkubationszeit [60 °C] um die Replikation von 50 % der viralen Partikel zu inhibieren von 108,7 s ermittelt werden.

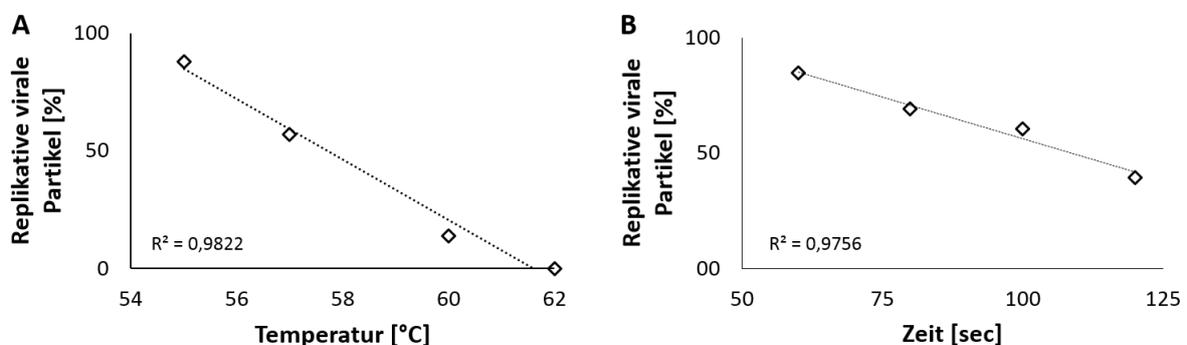


Abbildung 35: Hitzeinaktivierung rekombinanter Vaccinia Viren. A) Quantifizierung replikativer rVACV-Partikel relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels Standard Plaque Assay (SPA) bei Hitzebehandlung für 2 min mit unterschiedlichen

Temperaturen (55 – 65 °C). Inhibitorische Dosis 50 (ID₅₀) entspricht einer Temperatur von 57,7 °C B) Bestimmung der Inkubationszeit [60 °C] bei unterschiedlicher Behandlungsdauer (60, 80, 100 und 120 s). ID₅₀ entspricht bei einer Inkubationszeit [60 °C] von 108,7 s.

Die in Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse sollten anschließend in *in vivo* Studien vertieft werden. Hierzu wurden A549-Lungenkarzinomzellen in die rechte hintere Flanke athymischer Nacktmäuse subkutan implantiert. Bei einer Tumorgroße von ca. 200 mm³ wurde r.o. GLV-1h68 (ctrl rVACV) als nicht Melanin-synthetisierende Kontrolle oder GLV-1h327 (mel rVACV) als melanogenes rVACV-Konstrukt injiziert. Nach 26-tägiger Inkubation wurden die A549-Tumor-tragenden Mäuse erstmals im Bereich des Tumors an drei unterschiedlichen Stellen mit einem 808 nm 2,00 Watt NIR-Laser für 20, 25 und 30 s bestrahlt. Diese Prozedur wurde wöchentlich für insgesamt 5 Wochen wiederholt. In Abbildung 36 A wurde der durchschnittliche Temperaturanstieg nach NIR-Laser Behandlung gezeigt. Es konnte ein signifikant ($p < 0,05$) höherer Temperaturanstieg ($23,5 \pm 4,8$ °C) an der Oberfläche mel rVACV-infizierter Melanin-positiver A549-Tumore gegenüber ctrl rVACV-kolonisierter Tumore ($3,3 \pm 1,5$ °C) festgestellt werden.

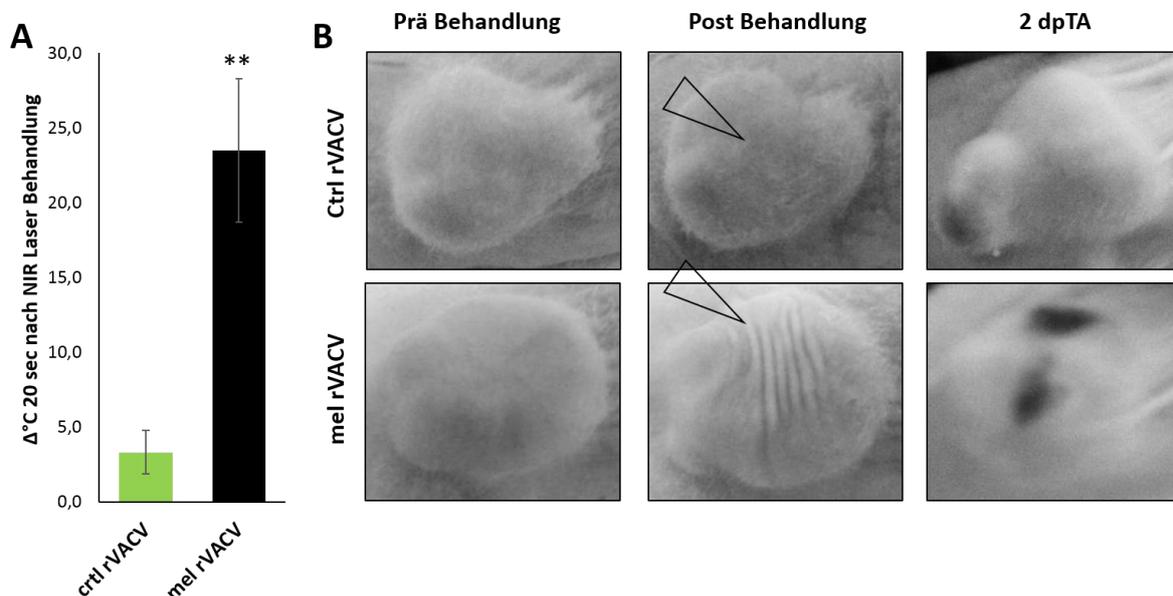


Abbildung 36: Phänotypische Veränderungen nach Nahinfrarot Laser-assoziiierter thermaler Ablation (NIR-LATA). A) Temperaturveränderung nach NIR-LATA ctrl rVACV- (GLV-1h68; grün) oder mel rVACV- (GLV-1h327, schwarz) injizierter A549-Xenotransplantat-tragender athymischer Nacktmäuse. Temperaturveränderung als Differenz dargestellt (n = 5). Signifikant ($p < 0,01$) erhöhter Temperaturanstieg der mel rVACV-kolonisierten A549-Tumor-tragenden Mäuse verglichen mit ctrl rVACV-infizierten Tumoren. B) Photographische Darstellung eines ctrl rVACV-kolonisierten A549-Tumors (obere Reihe) und eines mel rVACV-infizierten A549-Tumors (untere Reihe) direkt vor, direkt nach und 2 Tage nach NIR-LATA Behandlung. Schwarze Pfeile markieren die bestrahlte Tumorregion.

In Abbildung 36 B wurden die phänotypischen Veränderungen direkt nach und 2 Tage nach NIR-LATA fotografisch, am Beispiel jeweils einer Maus, dargestellt. Während die nicht Melanin produzierende ctrl rVACV-infizierte Kontrolle, weder direkt nach noch 2 Tage später, kutane Veränderungen aufzeigte, konnte hinsichtlich der mel rVACV-infizierten Maus bereits kurz nach NIR-LATA-Behandlung eine leichte Hautirritation festgestellt werden. 2 Tage nach Behandlung bildeten sich geschlossene schorfartige Wundmale an den zuvor behandelten Stellen.

Zusätzlich zu NIR-LATA-bedingten Veränderungen, wie Temperaturanstieg und Hautirritation, wurde der therapeutische Verlauf einer Kombinationstherapie aus onkolytischen Vaccinia-Viren und NIR-LATA verfolgt (Abb. 37). Es zeigte sich, dass im untersuchten A549-Xenotransplantat-Tumormodell die adjuvante NIR-LATA zusammen mit ctrl rVACV-injizierte Mäuse keine Verbesserung des therapeutischen Erfolgs nach sich zog (Abb. 37 A). Im Gegensatz dazu, stellte sich bereits 2 Tage nach der ersten NIR-LATA Behandlung der mel rVACV-kolonisierten Tumore (29 dpvi) ein verbesserter therapeutischer Verlauf, verglichen mit nicht NIR-LATA-behandelten mel rVACV-infizierten A549 Tumoren ein, welcher 63 dpvi zu einem signifikant ($p < 0,05$) geringeren Tumolvolumen führte. Die Kombination aus NIR-LATA und mel rVACV zeigte außerdem eine leicht verbesserte Therapie verglichen mit den ctrl rVACV injizierten Mäusen (mit und ohne NIR-LATA Behandlung). Auf Grund der geringen Versuchstierzahl ($n = 5$) konnte jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Wie in Abbildung 36 B gezeigt, führte die NIR-LATA-Behandlung in Melanin-beihaltenden Tumoren zu Hautirritationen. Um festzustellen, ob diese Therapie, neben den phänotypischen Veränderungen, einen negativen Effekt auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Mäuse hat, wurde als Maß hierfür das Gewicht über den experimentellen Zeitraum gemessen (Abb. 37 B). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den NIR-LATA-behandelten und nicht bestrahlten Mäusen festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Kombination aus onkolytischer Vaccinia-Virus- und NIR-LATA-Therapie den Gesundheitszustand der behandelten Mäuse nicht negativ beeinflusste (Abb. 37 B und C).

Desweiteren wurde mittels oberflächiger Temperaturmessung ein Anstieg von ~ 24 °C gemessen. Bei einer murinen Körpertemperatur von ca. 36 °C kann durch diesen Wärmeanstieg eine lokale Temperatur von ca. 60 °C oder höher erreicht werden. Dieser Temperaturanstieg sollte nicht nur zu Koagulation des Tumorgewebes, sondern auch zu einer

Inaktivierung der rVACV-Partikel im bestrahlten Bereich führen. Um dies zu untersuchen, wurde der beta-Glucuronidase-Spiegel als Marker der viralen Aktivität im Blutserum der jeweiligen Versuchstiere 2, 5, 12, 19 und 26 Tage nach thermaler Ablation (dpTA) bestimmt (Abb. 37 C). Im Zuge dieser Analyse wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der viralen Aktivität NIR-LATA-behandelter und unbestrahlter rVACV-kolonisierter Tumore festgestellt.

Die Nahinfrarot Laser-assoziierte thermale Ablation in Kombination mit der viralen onkolytischen Therapie führte zu keinen massiven gesundheitsschädlichen Nebenwirkungen in den behandelten Mäusen. Außerdem konnte keine erhöhte inhibitorische Wirkung durch die NIR-LATA-Behandlung auf die virale Aktivität festgestellt werden. Der therapeutische Erfolg im A549-Krebsmodell konnte jedoch durch die Kombination aus Melanin-produzierenden mel rVACV-Infektion und NIR-LATA-Behandlung verbessert werden.

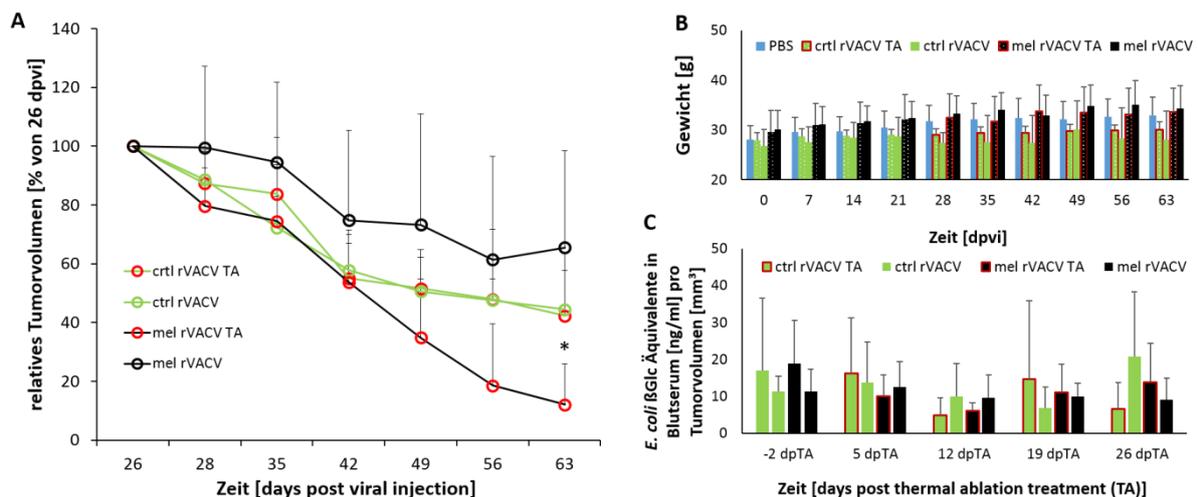


Abbildung 37: Tumorregression nach NIR-Laser-assoziierte thermale Ablation (NIR-LATA) A) A549-Xenotransplantat-implantierte athymische Nacktmäuse injiziert mit ctrl rVACV (grün, GLV-1h68) oder mel rVACV (schwarz, GLV-1h327). 26, 33, 40, 47 und 54 Tage nach Virus-Injektion NIR-LATA-Behandlung (808 nm Laser an drei unterschiedlichen Stellen des Tumors für 20, 25 und 30 s) der Therapiegruppe (rote Umrandung, n = 5). Keine zusätzliche Behandlung bei der Kontrollgruppe (n = 5). Die NIR-LATA behandelten mel rVACV kolonisierten Tumore zeigten signifikant geringeres Tumolvolumen verglichen mit den nicht zusätzlich behandelten mel rVACV infizierten Tumoren ($p < 0,05$). B) Körpergewichtsmessung als Maß des allgemeinen Wohlbefindens. C) *Escherichia coli* beta-Glucuronidase-Aktivitäts-Assay von Blutserum-Proben A549-Xenotransplantat implanzierter Mäuse injiziert mit den genannten rVACV Konstrukten, normalisiert mit dem jeweiligen Tumolvolumen als Korrekturfaktor 2, 5, 12, 19, 26 Tage nach thermaler Ablation (dpTA).

6 Diskussion

Nach wie vor steht die moderne Medizin vor Problemen bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Die vorherrschenden Therapiemethoden verursachen, auf Grund mangelhafter Selektivität, häufig schwere Nebenwirkungen. Auch die Effektivität der verwendeten Therapeutika ist meist nicht ausreichend, um eine Heilung des Patienten herbeizuführen. Erste klinische Studien mit onkolytischen Viren zur Krebsbehandlung lieferten vielversprechende Ergebnisse [55,57,60]. So besitzen verschiedene Virus-Typen teils eine natürliche, teils eine durch genetische Modifikation erworbene Tumorspezifität, wodurch diese nach systemischer Applikation spezifisch in Krebszellen eindringen, sich in diesen replizieren, diese lysieren und nach Freisetzung erneut Krebszellen infizieren. Dies führt zu einer effizienten Tumorregression [113]. Trotz aussichtsreicher erster Ergebnisse, ist die Wissenschaft bemüht, diese Technologie weiter zu optimieren. Die Möglichkeit, das Virus als Vektor zu verwenden und somit therapeutische und diagnostische Reporter-moleküle spezifisch in entartetes Gewebe einzubringen, spielt hierbei eine wichtige Rolle [114]. So ermöglicht diese Technologie eine Vielzahl unterschiedlicher Behandlungsstrategien, wie die Inhibition der Tumor-assoziierten Angiogenese [115], die Virus-vermittelte Expression des hNIS-Symporters in Krebszellen zur Behandlung mit Radionukliden und PET-diagnostischer Überprüfung des Therapieerfolgs [116]. Weiterhin wird die Expression immunstimulierender Cytokine [117] oder Tumorstroma verändernder bzw. Zellmetabolismus beeinflussender Enzyme [32,118] spezifisch im Tumorgewebe mittels dieser Technologie ermöglicht. Diese Möglichkeit Fremdkassetten über die Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren spezifisch in tumoröse Bereiche einzubringen, wurde in dieser Arbeit genutzt, um melanogene Enzyme in Tumorzellen zu exprimieren. Dieses auf rVACV-basierende melanogene Reportersystem wurde einerseits auf dessen therapeutische Wirkung und andererseits auf das diagnostische Potential hin untersucht.

Zu Beginn der Arbeit wurden aus vier melanogenen Vaccinia-Virus-Konstrukten (GLV-1h322, GLV-1h324, GLV-1h326 und GLV-1h327) die erfolgversprechendsten ausgewählt. Hierzu wurden das melanogene Potential sowie die onkolytischen Fähigkeiten in Zellkulturversuchen ermittelt. GLV-1h324- und GLV-1h327-infizierte A549-Lungenkarzinomzellen zeigten über das gesamte gemessene Spektrum (400 - 700 nm) die höchste Absorption. Auch die ermittelte L-DOPA-Umsatzrate, als Maß der Enzymaktivität der viral kodierten melanogenen Enzyme war

bei Lysaten GLV-1h324- oder GLV-1h327-infizierter A549-Krebszellen signifikant ($p < 0,001$) höher, verglichen mit der Umsatzrate GLV-1h322- und GLV-1h326-infizierter Zellen. Das melanogene Potential der rVACV-Konstrukte GLV-1h324 und GLV-1h327 ist somit höher als das der Konstrukte GLV-1h322 und GLV-1h326, weswegen GLV-1h324 und GLV-1h327 für alle weiteren Zellkultur- und *in vivo*-Experimente verwendet wurden. Ein Grund dafür liegt in der höheren Promotorstärke der Gen-regulierenden Promotoren. In den rVACV-Konstrukten GLV-1h322 und GLV-1h326 werden die Gene, welche für die melanogenen Enzyme kodieren, jeweils durch den Promotor P_{SE} (*synthetic early* Promotor) kontrolliert, wohingegen der stärkere Promotor P_{SEL} (*synthetic early/late* Promotor) die Expression von *mTyr* (murine Tyrosinase), des Schlüsselenzyms der Melaninsynthese, in GLV-1h324 und GLV-1h327 reguliert. Tyrosinase katalysiert den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Melanin-Produktion [88], nämlich den Umsatz des L-Tyrosins zu L-DOPA bzw. L-DOPACHINON. Eine höhere Expression dieses Enzyms führt zu einem schnelleren L-Tyrosin-Umsatz und letztendlich zu einer erhöhten Melaninproduktion. Die Co-Expression von *Tyrp1* (Tyrosinase-Helferprotein 1) in A549-Krebszellen durch GLV-1h324-Infektion führte nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Melanin-Produktion in Zellkultur, verglichen mit GLV-1h327-infizierten Zellen, welche ausschließlich die murine Tyrosinase exprimierten. Die humane Form des *Tyrp1*-Proteins übernimmt zwar keine bekannte katalytische Funktion während der Melanogenese, jedoch in originär-melanogenen Zellen eine wichtige Rolle im gerichteten Transport der Tyrosinase vom endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat zu den frühen Melanosomen [105]. Weiterhin stabilisiert *Tyrp1* anschließend die Tyrosinase in diesem Organell [102]. Somit ist wahrscheinlich, dass in anderen Zellmodellen, welche eine verschlechterte Expressionseffizienz viral-kodierter Gene zeigen, die adjuvanten Eigenschaften des Tyrosinase-Helferproteins 1 in einer verbesserten Melaninsynthese resultieren. Die verringerte Onkolyse-Rate von GLV-1h324 und von GLV-1h327 verglichen mit GLV-1h322 und GLV-1h326 könnte durch die schwächere Promotorstärke und damit verbunden, auf eine geringere Expressionsrate der melanogenen Enzyme durch GLV-1h322 und GLV-1h326 zurückzuführen sein. So konnten Chen *et al.* [119] zeigen, dass die replikative Effizienz invers mit der Stärke der Fremdgen-Kassetten-regulierenden Promotoren korreliert. Je stärker die Expressionsrate durch einen stärkeren Promotor ist, desto stärker ist die Attenuierung des viralen Konstrukts. GLV-1h68 zeigte trotz eines $P_{7,5}$ -regulierten beta-Galaktosidase-Gens im TK-Lokus eine höhere Onkolyse-Rate als GLV-1h324 und GLV-1h327 in

Zellkultur und *in vivo*. Wäre die Promotorstärke in diesem Fall allein verantwortlich für die Replikation und somit die Onkolyse der verwendeten rVACV-Konstrukte, müsste GLV-1h68 ähnliche Plaque-Durchmesser und vergleichbare Tumorregression, wie GLV-1h324 und GLV-1h327, zeigen. Weitere Beobachtungen zeigten, dass die Expression weiterer Fremdgene ebenfalls zu einer Attenuierung des verwendeten rVACV führt [119]. Daher wäre zu erwarten gewesen, dass GLV-1h324 und GLV-1h322 eine schlechtere Onkolyse-Rate als GLV-1h326 und GLV-1h327 aufwiesen, da durch die Insertion von *Tyrp1* in den TK-Lokus eine zusätzliche genetische Last hinzugefügt wird. Dies konnte in Zellkulturversuchen die Onkolyse-Rate und die virale Replikation betreffend sowie nach Infektion Tumor-tragender athymischer Nacktmäuse jedoch nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass nicht das genetische Konstrukt, sondern die viral-vermittelte Melaninsynthese, der Hauptfaktor der Attenuierung der melanogenen Vaccinia-Viren ist.

Da die Replikation des Vaccinia-Virus ebenfalls von dem metabolen und proliferativen Status der Wirtszelle abhängt, ist anzunehmen, dass die nach rVACV-Infektion einsetzende Melaninsynthese das Wachstum der Wirtszelle negativ beeinflusst. Wie die Analyse der elementaren Zusammensetzung des nach rVACV-Infektion gebildeten Melanins mittels EDX-EELS ergab, handelt es sich hierbei um einen Melanin-Mix aus Phäo- und Eumelanin. Die Zusammensetzung des viral vermittelten Melanins gleicht dem kutanen und im Auge vorkommenden Melanin. Im Gegensatz zu den Zellkultur-Proben, konnte ein erhöhter Stickstoff und Sauerstoff-Anteil der Melanine *in vivo* sowie ein deutlich erhöhter Anteil an gebundenen Metallionen gezeigt werden. Hong *et al.* [120] postulierten, dass die Metallionen Mg(II), Ca(II) und Zn(II) an die Carboxygruppen des Melanins binden, während Cu(II) an die Hydroxylgruppen und Fe(III) an die Hydroxyl- oder Aminogruppen bindet. Außerdem stellten diese Autoren fest, dass wenn ein Melaninmakromolekül mit Metallionen gesättigt ist, die Fähigkeit zur Enttoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verringert wird. In der EDX-EELS-Analyse konnten diese Ergebnisse bezüglich Kalzium, Kupfer, Eisen und Zink bestätigt werden, welche in erhöhter Konzentration an das Melanin gebunden vorlagen. Ein Grund für einen eingeschränkten Metabolismus der Wirtszelle könnte also die cytotoxische Wirkung der Melanogenese sein. Suzukawa und Kollegen [121] konnten belegen, dass während der Melaninsynthese reaktive Sauerstoffspezies durch eine Fenton-ähnliche Reaktion entstehen. Bei dieser Reaktion werden durch die Oxidation organischer Substanzen, katalysiert durch niedervalente Metallkomplexe, wie gebundenes Cu(II), ROS gebildet. Eine Überexpression von

Tyrosinase führt zu einer erhöhten Melaninproduktion, wodurch wiederum eine erhöhte Menge ROS gebildet werden kann [122]. In Melanom- oder transfizierten Zellen, welche Tyrosinase exprimieren, sind die Melanosomen bzw. die Melanosomen-ähnlichen Lysosomen häufig durchlässig. Dadurch werden sowohl die oxidierenden Intermediate der Melanogenese als auch die bereits gebildeten ROS in das Cytoplasma freigesetzt [123]. Sollte die Wirtszelle nicht mehr in der Lage sein, der erhöhten ROS-Konzentration entgegen zu wirken, kommt es in der Folge von Kreuzreaktionen mit den reaktiven Sauerstoffspezies zu verschiedenen Zellschäden, wie DNA-Doppelstrangbrüchen, Redoxreaktionen mit Proteinen und Lipidmembranschädigungen [124]. Weiterhin können, auf Grund der Durchlässigkeit entarteter Melanosomen, Melaninmoleküle in direkte Nähe der DNA gelangen. Diese sind in der Lage in die kleine Furche des DNA-Strangs zu binden, direkt DNA-Doppelstrangbrüche zu verursachen und den Zugang verschiedener DNA-Reparaturenzyme zu diesen Läsionen zu verhindern. Dies führt in der Folge zu einer sich weiter fortsetzenden DNA-Schädigung [121]. Gemeinsam führen diese Zellschäden zu einer Veränderung des Zellmetabolismus, wodurch verschiedene Stressfaktoren aktiviert und exprimiert werden. Diese führen meist zur Inhibition der Zellproliferation und zum Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus [125]. Ein weiterer Grund für den verlangsamten Wirtszellmetabolismus könnte der durch die unregulierte Überexpression der Tyrosinase bedingte erhöhte Tyrosin-Verbrauch sein. Die nicht-essentielle Aminosäure Tyrosin ist Bestandteil der meisten Proteine und nimmt eine wichtige Funktion als Phosphat-Gruppen-Akzeptor in Proteinen verschiedener Signaltransduktionskaskaden ein. Sinkt der intrazelluläre Spiegel an freiem Tyrosin durch erhöhte Melaninproduktion, fällt in dessen Konsequenz die Menge an tRNA-gebundenem Tyrosin ($tRNA_{Tyr}$). Während des Translationsprozesses eines Tyrosin-haltigem Proteins wird dieser gestoppt bis $tRNA_{Tyr}$ wieder verfügbar ist und an das Ribosom bindet. Demnach kommt es zu einer Verlangsamung der Proteinbiosynthese und somit zu einem attenuierten Anabolismus der Wirtszellen. Hiervon ist wiederum das intrazelluläre Vaccinia-Virus betroffen, das während der letzten Phase des Replikationszyklus auf den Anabolismus der Wirtszelle angewiesen ist. Durch die eingeschränkten Prozesse der Proteinsynthese wird demzufolge die Produktion der viralen Partikel verlangsamt und dadurch die Lyse der infizierten Zelle verzögert. Der Zellzyklus-Arrest-bedingte Ruhezustand der Wirtszelle und der verlangsamte Anabolismus könnten ursächlich für die attenuierte Replikation eines melanogenen Vaccinia-Virus sein. Diese wirkt sich wiederum auf die Onkolyse der

Tumorzellen verlangsamen und verzögern die Verbreitung des rVACV im Tumorgewebe, was zu einer herabgesetzten therapeutischen Effizienz führt.

Neben den zellschädigenden Auswirkungen der Metallionen-Akkumulation an Melaninmakromoleküle, ermöglicht diese Bindung von Metallionen im MRT einen starken Kontrast zu erzeugen. Hierdurch ist Gewebe, das Melanin enthält, gut visualisierbar [91]. Wir konnten in Tumor-Xenotransplantat-tragenden Mäusen zeigen, dass auch die rVACV-vermittelte Melaninsynthese in Krebsgewebe mittels MRT deutlich zu detektieren ist [32]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Melanin-Akkumulation in Zellen und Tumorgewebe durch die optoakustische Tomographie nachweisbar ist. Hierbei wurde die hohe Lichtabsorption des Melanins ausgenutzt. Es gilt, je dunkler das Material desto höher der Absorptionskoeffizient. Da es sich bei Melanin, besonders im Fall des Eumelanins, um ein nahezu schwarzes Pigment handelt, erzeugt es in Geweben oder anderen organischen Materialien die höchstmögliche Lichtabsorption und somit das höchstmögliche optoakustische Signal. Unter normalen Umständen ist im Körperinneren kein Melanin vorzufinden. Deshalb konnten Melanin-positive MRT- und MSOT-Signale eindeutig auf rVACV-assoziierte Melaninproduktion zurückgeführt werden. Da das Vaccinia-Virus sich spezifisch in Krebszellen vermehrt, können somit Tumorzellen, anhand des viral-vermittelten Markers Melanin, eindeutig detektiert werden. Ein Nachteil des Biomarkermoleküls Melanin, verglichen mit Fluoreszenz-Proteinen, ist, dass es sich nicht zu Analysen der subzellulären Proteinverteilung oder Protein-Protein Interaktionen eignet. Vorteile sind hingegen die enzymatische Produktion, wodurch ein früherer tomographischer Nachweis möglich wird, verglichen mit fluoreszierenden Molekülen. Weiterhin ist Melanin als Marker der Tiefengewebe-Tomographie (MRT und MSOT) geeignet, während fluoreszierende Proteine auf oberflächliche Detektion beschränkt sind. Im Gegensatz zu den Fluorochromen werden für den optischen Melanin-Nachweis keine zusätzlichen Gerätschaften benötigt. Außerdem zeichnet sich Melanin durch eine extreme Stabilität aus [98].

Um der Attenuierung melanogener Vaccinia-Viren entgegen zu wirken, wurde ein rVACV-Konstrukt kloniert (GLV-1h462), welches die exogene Kontrolle über die Melanin-Produktion ermöglicht. Hierzu wurde das *tet*-System zur induzierbaren Genexpression für die Vaccinia-Virus-basierte Anwendung genutzt [126]. Dieses System kann mit dem Tetracyclin-Derivat Doxycyclin induziert werden [127]. Doxycyclin ist ein klinisch-anerkanntes und gut

verträgliches Antibiotikum [128]. Eine kürzlich erschienene Studie formulierte die Hypothese, dass Tetracycline eine Anti-Krebs-Wirkung durch die Inhibition von Proteinen der Matrix-Metalloprotease-Familie (MMP) verursachen. MMP spielen eine wichtige Rolle während der invadierenden Phase des Primärtumors und der Metastasierung, indem diese die Tumormatrix degradieren. Außerdem wird angenommen, dass MMP in der Lage sind, die Tumorstromafaktoren α und β , sowie den epidermalen Stromafaktor und den vaskulären endothelialen Stromafaktor zu aktivieren [129]. In den hier durchgeführten Studien konnte jedoch kein Unterschied bezüglich des Tumorstromafaktors in nicht-melanogenen GLV-1h68-kolonisierten Tumor-Xenotransplantaten in Kombination mit oder ohne Doxycyclin festgestellt werden. Ein niedrigerer MMP-Spiegel im Tumorstromafaktor verursacht eventuell ein geringeres Tumorstromafaktor, jedoch zieht eine dichtere Tumormatrix eine schlechtere Vaccinia-Virus-Verbreitung nach sich [118]. Diese gegensätzlichen Auswirkungen könnten sich in diesem Fall aufheben und einen adjuvanten Effekt des Doxycyclins in Kombination mit der rVACV-Therapie verhindern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der *mTyr*-Expression GLV-1h462-injizierter Mäuse bzw. -injizierter Zellkultur-Proben zu einem erhöhten therapeutischen Potential, verglichen mit den induzierten Melanin-synthetisierenden Versuchstieren, führte und auf vergleichbarem Niveau wie das parentale Vaccinia-Virus GLV-1h68 war. Somit konnte erneut gezeigt werden, dass die verlangsamte virale Replikation melanogener Vaccinia-Viren auf die Melaninsynthese zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund für die gesteigerte Replikations- und Onkolyse-Rate des nicht-induzierten GLV-1h462-Virus könnte außerdem die inhibierte Expression eines Markers sein. Chen *et al.* [119] zeigten in vorangegangenen Studien eine inverse Korrelation zwischen viraler Replikation und Markergen-Expression. Neben dem verbesserten therapeutischen Potential von GLV-1h462 konnte gezeigt werden, dass, nach Induktion der viral-vermittelten Melanin-Produktion, Tumorzellen mittels MRT und MSOT tomographisch detektierbar sind. Dieses neuartige induzierbare System bietet außerdem die Möglichkeit, die Sicherheit des Vaccinia-Virus bei klinischer Anwendung zu verbessern. So ist es beispielsweise möglich die virale Replikation durch ein *tet*-vermitteltes induzierbares System zu regulieren und zu inhibieren [130,131]. Dies erlaubt dem behandelnden Arzt auch nach Injektion noch regulatorisch auf das Medikament Vaccinia-Virus einzuwirken. Auch das hier vorgestellte melanogene rVACV-Konstrukt könnte ähnlich genutzt werden, da die Induktion der viral vermittelten Melaninsynthese zu einer Attenuierung der viralen Replikation führt. Bei hypersensitiven Reaktionen auf das

verwendete Vaccinia-Virus könnte somit eingegriffen und schwere Nebenwirkungen verhindert werden.

Eine weitere Möglichkeit, das therapeutische Potential melanogener rVACV zu verbessern, liegt in einer Kombinationstherapie aus Vaccinia-Virus-Injektion und thermaler Ablation durch Bestrahlung mit einem Nahinfrarot-Laser. Die Absorption des NIR-Lasers in Melanin-enthaltenden Bereichen führte zu einem Temperatur-Anstieg bis auf ca. 60 °C und mehr. Bei dieser Temperatur kommt es zur Denaturierung zellulärer Proteine und somit zur Koagulation des Gewebes [132]. Ausgehend vom Fokus der NIR-Laser-Behandlung nimmt die Temperatur im umgebenden Gewebe mit zunehmendem Abstand ab und damit auch die Schwere der Zellschädigung. Hierdurch wird neben der direkten letalen Wirkung eine zweite Phase der thermalen Behandlung eingeleitet. In der Peripherie werden Proteine nur teilweise oder gar nicht denaturiert und die DNA nicht kritisch geschädigt. Diese Schäden lösen die Hitzeschock-Antwort aus, um das Überleben der Zelle zu ermöglichen. Hierbei werden Hitzeschock-Proteine (HSP) exprimiert, die teilweise denaturierte Proteine stabilisieren und renaturieren. Weiterhin wirkt ein erhöhter Spiegel dieser Proteine im Blutserum stimulierend auf das angeborene sowie auf das adaptive Immunsystem [133,134]. Zusätzlich wird die Expressionsrate der Gene, welche für DNA-Reparaturenzyme kodieren, hochreguliert, um Hitze-bedingte DNA-Läsionen zu reparieren. Im Verlauf dieser zellulären Wiederherstellungs-Mechanismen kommt es zu einer gesteigerten Mutationsrate, da die DNA-Reparaturenzym-vermittelte DNA-Replikation eine höhere Fehleranfälligkeit aufweist als die unter normalen Umständen ablaufende Replikation [135]. Desweiteren werden im Zuge der Hitzeschock-Antwort Schlüssel-Cytokine exprimiert, welche ebenfalls das Immunsystem aktivieren [136]. Neben den zellulären Veränderungen und der Stimulation des Immunsystems führt die starke Hitzeeinwirkung außerdem zu Gewebsveränderung wie Ödembildung und Gefäßzerstörung. Diese Effekte führen im weiteren Verlauf der NIR-Laser-thermalen Ablation auch in der Peripherie des bestrahlten Bereichs zu einem partiellen nekrotischen Absterben des Tumorgewebes. Ein kritischer Aspekt dieser Therapie ist der starke Temperaturabfall an Blutgefäßen, verursacht durch den Blutfluss. Hierdurch können auch in der fokalen Region der Behandlung, in der es zu sofortiger Nekrose kommt, Tumorzellen in der direkten Nähe zu Blutgefäßen überleben und eine Rekurrenz des Tumorgewebes verursachen [137]. Neben der Gewebeerstörung verursacht durch den starken Temperaturanstieg, konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, dass eine Temperatur von 60 °C eine inhibierende

Wirkung auf Vaccinia-Virus-Partikel hat. Im Zuge der Bestimmung der viralen Aktivität mittels des beta-Glucuronidase-Assays konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den mel rVACV-injizierten NIR-Laser-bestrahlten und den nicht-bestrahlten Mäusen detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte die Auflockerung der Tumor-Matrix durch die Hitzevermittelte Koagulation des Tumorgewebes sein. Nach Abbau dieser zerstörten Bereiche könnte eine erneute Vaccinia-Virus-Infiltration vitaler Tumorzellen erleichtert werden. Weiterhin könnte das pro-inflammatorische Umfeld des NIR-Laser-behandelten Bereichs, auf Grund des erhöhten Spiegels verschiedener Wachstums- und Angiogenesefaktoren sowie pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine, eine positive Wirkung auf die virale Replikation haben [111]. Diese sich positiv auf die virale Verbreitung und Replikation auswirkenden Effekte könnten die Inhibition viraler Partikel durch die NIR-Laser-Bestrahlung ausgleichen und somit der Grund für die nahezu gleiche virale Aktivität NIR-Laser-bestrahlter und nicht-bestrahlter melanogener rVACV injizierter Mäuse sein. Die Laser-induzierte Thermotherapie stellt eine vielversprechende adjuvante Therapie zur Behandlung mit melanogenen rVACV dar. So wird beispielsweise bei der Behandlung von Darm- und Brustkrebs-Metastasen die Laser-induzierte thermale Therapie klinisch eingesetzt [138,139] und ist mit tomographischen Applikationen, wie dem MRT kombinierbar, wodurch eine Überprüfung des therapeutischen Erfolgs in Echtzeit ermöglicht wird [140]. Es wäre also auch durchaus vorstellbar diese Technologie mit der des MSOT zu verknüpfen und somit Therapie und Diagnose mit einer Monoapplikation zu ermöglichen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Vaccinia-Virus-basierte Expression melanogener Enzyme in infizierten Tumorzellen sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* die Produktion von Melanin-Molekülen nach sich zieht. Weiterhin wurde Melanin als geeigneter diagnostischer Marker der tomographischen Anwendungen von MRT und von MSOT eingeführt. Desweiteren konnte die Attenuierung des viralen therapeutischen Potentials, bedingt durch die Melaninsynthese, durch eine induzierbare Expression des melanogenen Enzyms Tyrosinase rückgängig gemacht werden. Überdies wurde gezeigt, dass die Kombinationstherapie aus melanogenen rVACV und NIR-LATA zu einer signifikant stärkeren Abnahme des Tumolvolumens in Mäusen führte, verglichen mit solitärer Behandlung mit melanogenem rVACV.

In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, inwieweit die Überexpression der melanogenen Enzyme und die Überproduktion des Melanins zu einer Stimulation des Immunsystems führt. Viele Arbeiten weisen auf derartige Effekte des Melanins hin. So wurde Melanin bei dem Pathogen *Aspergillus fumigatus* als ein Virulenzfaktor identifiziert und zeigte eine attenuierende Wirkung auf das Immunsystem [141], indem PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) durch, auf der Zelloberfläche positioniertes Melanin maskiert werden [142]. Eine andere Studie zeigte, dass das lösliche Intermediate DHICA der Melaninsynthese die Stickstoffmonoxid-Produktion LPS-aktivierter Makrophagen erhöht [143]. Weiterhin führt eine Überexpression der Tyrosinase in Melanom-Zellen zur Aktivierung cytotoxischer T-Lymphozyten [144]. Die Überexpression der murinen Tyrosinase könnte zusätzlich einen Immunsystem stimulierenden Effekt haben, da es in humanen Patienten als Fremdprotein erkannt werden kann. Neben der Auswirkung der viral-vermittelten Melaninproduktion auf den Wirt sollte evaluiert werden, inwieweit Melanin aus viral-vermittelter Melaninsynthese als Biomarker für die Positronen-Emissions-Tomographie geeignet ist. Cachin *et al.* [89] und Qin *et al.* [96] stellten bereits Melanin-spezifische PET-Marker vor, welche ebenso in dem in dieser Arbeit vorgestellten Reportersystem adaptierbar sind. Auch ein diagnostischer Nachweis der viral-vermittelten Melaninproduktion mittels Analyse serologischer Proben ist denkbar. So konnte gezeigt werden, dass das instabile Intermediat 5-S-CysteinyldOPA sezerniert wird und in erhöhten Mengen bei gesteigerter Melaninproduktion im Blutserum nachweisbar ist [94,145,146]. Denkbar wäre außerdem, andere stabilere Intermediate der Melaninsynthese auf Nachweisbarkeit zu prüfen, da durch die Virus-bedingte Onkolyse auch nicht sezernierte Moleküle in die Lymphe bzw. in das Blut gelangen. Ein weiteres Projekt wäre die technische Umsetzung einer Kombination aus multispektraler-optoakustischer Tomographie und der NIR-Laser-thermalen Ablation, wodurch, ähnlich der Kombination aus MRT und Laser-induzierter Thermotherapie [140], Temperaturmessung und Orientierung der thermalen Behandlung in Echtzeit möglich wären. Es zeigt sich also, dass das Potential eines viral-vermittelten melanogenen Reporters bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist und einige Fragestellungen vor einer klinischen Nutzung beantwortet werden sollten.

7 Tabellen

Tabelle 1: Prozentuale elementare Zusammensetzung des Melanins in GLV-1h324-infizierten A549-Zellen *in vitro*

Element	C	O	P	S	Cl	Ca	Fe	Cu	Zn		C/N	N
MCL-dunkel (M)	92.8	3.58	0.07	1.24	0.85	0.01	0.02	0.1	0.04		11.75	7.9
SD	0.29	0.14	0.04	0.23	0.09	0.01	0.01	0.02	0.01		1.02	
MCL-hell PMS	94.9	2.91	0.05	0.36	0.44	0	0.02	0.05	0.02		25.93	3.66
SD	0.78	0.24	0.02	0.3	0.32	0	0.02	0.03	0.02		10.96	

Tabelle 2: Prozentuale elementare Zusammensetzung des Melanins in GLV-1h324-infizierten A549-Tumoren *ex vivo*

Element	C	O	P	S	Cl	Ca	Fe	Cu	Zn		C/N	N
MCL-dunkel (M)	89.3	6.42	0.11	1.27	1.05	0.16	0.03	0.2	0.05		5.5	16.7
SD	0.74	0.81	0.04	0.33	0.16	0.07	0.01	0.07	0.01		1.15	3.89
MCL-hell (PMS)	91.1	5.58	0.07	0.66	0.94	0.08	0.03	0.13	0.03		5.4	16.97
SD	1.8	0.96	0.03	0.44	0.2	0.05	0.01	0.06	0.02		1	3.23

Tabelle 3: Prozentuale elementare Zusammensetzung des Melanin in der *Substantia nigra* und eines humanen schwarzen Melanoms *ex vivo*

Element	C	O	P	S	Cl	Ca	Fe	Ni	Cu	Zn	Pb
<i>Substantia nigra</i>	89.4	4.89	0	1.82	1.48	0.02	0.15	0.31	0.03	0.03	0.04
SD	1.65	0.65	0	0.67	0.3	0.01	0.04	0.11	0.01	0.01	0.03
Melanom	90	3.47	0	3.61	1.41	0.18	0.03	0.04	0.12	0.05	0
SD	2.56	0.37	0	1.5	0.54	0.07	0.01	0.02	0.04	0.02	0

8 Literaturverzeichnis

1. Organization WH (2014).
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
3. Muller PA, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304-317.
4. Liang J, Lin C, Hu F, Wang F, Zhu L, et al. (2013) APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 177: 1169-1179.
5. Costa C, Paramio JM, Santos M (2013) Skin Tumors Rb(eing) Uncovered. *Front Oncol* 3: 307.
6. Dang CV (2012) MYC on the path to cancer. *Cell* 149: 22-35.
7. Rahman MA, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK (2013) B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Exp Mol Pathol* 95: 336-342.
8. Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222: 771-778.
9. Yokota J (2000) Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21: 497-503.
10. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
11. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI (2007) Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* 177: 893-903.
12. Partanen JI, Nieminen AI, Klefstrom J (2009) 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle* 8: 716-724.
13. Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273.
14. Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6: 611-622.
15. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
16. Ferrara N (2009) Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 789-791.
17. Baeriswyl V, Christofori G (2009) The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 19: 329-337.
18. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J (2008) Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 700-712.
19. Nagy JA, Dvorak HF (2012) Heterogeneity of the tumor vasculature: the need for new tumor blood vessel type-specific targets. *Clin Exp Metastasis* 29: 657-662.
20. Fang J, Sawa T, Maeda H (2003) Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv Exp Med Biol* 519: 29-49.
21. Junttila MR, Evan GI (2009) p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 9: 821-829.
22. Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26: 1324-1337.
23. Visvader JE (2011) Cells of origin in cancer. *Nature* 469: 314-322.
24. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18: 884-901.
25. Helbig M, Krysztoforowski K, Kroll T, Kucharski J, Poppek M, et al. (2009) Navigation-supported and sonographically-controlled fine-needle puncture in soft tissues of the neck. *Ultrasound Med Biol* 35: 436-442.
26. Merck (2014) The Merck Manual Home Edition - Surgery.
27. Jeffrey SS, Birdwell RL, Ikeda DM, Daniel BL, Nowels KW, et al. (1999) Radiofrequency ablation of breast cancer: first report of an emerging technology. *Arch Surg* 134: 1064-1068.
28. Vargas HI, Dooley WC, Gardner RA, Gonzalez KD, Venegas R, et al. (2004) Focused microwave phased array thermotherapy for ablation of early-stage breast cancer: results of thermal dose escalation. *Ann Surg Oncol* 11: 139-146.

29. Yu T, Fu X (2014) Extracorporeal Ultrasound-Guided High Intensity Focused Ultrasound: Implications from the Present Clinical Trials. *ScientificWorldJournal* 2014: 537260.
30. Tarkowski R, Rzaca M (2014) Cryosurgery in the treatment of women with breast cancer-a review. *Gland Surg* 3: 88-93.
31. Keane MG, Bramis K, Pereira SP, Fusai GK (2014) Systematic review of novel ablative methods in locally advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20: 2267-2278.
32. Stritzker J, Kirscher L, Scadeng M, Deliolanis NC, Morscher S, et al. (2013) Vaccinia virus-mediated melanin production allows MR and optoacoustic deep tissue imaging and laser-induced thermotherapy of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3316-3320.
33. Hurley LH (2002) DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2: 188-200.
34. Clark AS, Deans B, Stevens MF, Tisdale MJ, Wheelhouse RT, et al. (1995) Antitumor imidazotetrazines. 32. Synthesis of novel imidazotetrazinones and related bicyclic heterocycles to probe the mode of action of the antitumor drug temozolomide. *J Med Chem* 38: 1493-1504.
35. Goldacre RJ, Loveless A, Ross WC (1949) Mode of production of chromosome abnormalities by the nitrogen mustards; the possible role of cross-linking. *Nature* 163: 667-669.
36. Neidle S (1979) The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. *Prog Med Chem* 16: 151-221.
37. ClinicalTrials.gov (2014) Irinotecan.
38. Sobell HM, Jain SC, Sakore TD, Nordman CE (1971) Stereochemistry of actinomycin--DNA binding. *Nat New Biol* 231: 200-205.
39. Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ (1991) DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 30: 8026-8035.
40. ClinicalTrials.gov (2014) Study of Combretastatin and Paclitaxel/Carboplatin in the Treatment of Anaplastic Thyroid Cancer (FACT).
41. DKFZ (2014) Chemotherapie.
42. Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG (1999) How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol* 3: 77-83.
43. Giaccia H, editor (2006) *Radiology for the Radiologist*. 6th Edition ed.
44. Coley WB (1910) The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med* 3: 1-48.
45. Dillman RO (2011) Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 26: 1-64.
46. West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Marshall GD, Orr DW, et al. (1987) Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 316: 898-905.
47. (1999) Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. *Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Lancet* 353: 14-17.
48. Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, et al. (2009) Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 374: 301-314.
49. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, et al. (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850-854.
50. van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190: 355-366.
51. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, et al. (2010) Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol* 17: 718-730.

52. ClinicalTrials.gov (2014) A Study of GL-ONC1, an Oncolytic Vaccinia Virus, in Patients With Advanced Peritoneal Carcinomatosis.
53. Liu TC, Galanis E, Kirn D (2007) Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 101-117.
54. Chiocca EA, Rabkin SD (2014) Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2: 295-300.
55. Kaufman HL, Bines SD (2010) OPTIM trial: a Phase III trial of an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF for unresectable stage III or IV melanoma. *Future Oncol* 6: 941-949.
56. ClinicalTrials.gov (2014) Efficacy and Safety Study of OncoVEXGM-CSF Compared to GM-CSF in Melanoma.
57. Mulvihill S, Warren R, Venook A, Adler A, Randlev B, et al. (2001) Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Ther* 8: 308-315.
58. Hall AR, Dix BR, O'Carroll SJ, Braithwaite AW (1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med* 4: 1068-1072.
59. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282: 1332-1334.
60. Biotech O (2014) Efficacy Study of REOLYSIN® in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Platinum-Refractory Head and Neck Cancers. pp. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01166542.
61. Zhang Q, Yu YA, Wang E, Chen N, Danner RL, et al. (2007) Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 67: 10038-10046.
62. ClinicalTrials.gov (2014) Safety Study of GL-ONC1, an Oncolytic Virus, in Patients With Advanced Solid Tumors.
63. ClinicalTrials.gov (2014) Safety Study of Attenuated Vaccinia Virus (GL-ONC1) With Combination Therapy in Head & Neck Cancer.
64. Harrison SC, Alberts B, Ehrenfeld E, Enquist L, Fineberg H, et al. (2004) Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11178-11192.
65. (1902) Edward Jenner. his Life. his Work, and his Writings. *Br Med J* 2: 1-17.
66. F. Fenner DAH, I. Arita, 2. JeZek, I. D. Ladnyi (1988) Smallpox and its eradication.
67. McFadden G (2005) Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3: 201-213.
68. Baxby D (1996) Poxviruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX).
69. Moss B (1991) Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252: 1662-1667.
70. Hsiao JC, Chung CS, Chang W (1999) Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73: 8750-8761.
71. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W (1998) A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72: 1577-1585.
72. Lin CL, Chung CS, Heine HG, Chang W (2000) Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 74: 3353-3365.
73. Senkevich TG, Ward BM, Moss B (2004) Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* 78: 2357-2366.
74. Gunasinghe SK, Hubbs AE, Wright CF (1998) A vaccinia virus late transcription factor with biochemical and molecular identity to a human cellular protein. *J Biol Chem* 273: 27524-27530.
75. Katsafanas GC, Moss B (2004) Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *J Biol Chem* 279: 52210-52217.
76. Smith GL, Murphy BJ, Law M (2003) Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol* 57: 323-342.

77. Berrington de Gonzalez A, Mahesh M, Kim KP, Bhargavan M, Lewis R, et al. (2009) Projected cancer risks from computed tomographic scans performed in the United States in 2007. *Arch Intern Med* 169: 2071-2077.
78. Dössel O (2000) *Bildgebende Verfahren in der Medizin. Von der Technik zur medizinischen Anwendung*: Springer Verlag.
79. E. Kim ML, T. Inoue, W. Wong (2012) *Clinical PET and PET/CT: Principles and Applications*.
80. B. de Haan CR *An introduction to functional MRI*
81. Weibel S, Basse-Luesebriek TC, Hess M, Hofmann E, Seubert C, et al. (2013) Imaging of intratumoral inflammation during oncolytic virotherapy of tumors by ¹⁹F-magnetic resonance imaging (MRI). *PLoS One* 8: e56317.
82. Bell AG (1880) On the Production and Reproduction of Sound by Light. *The American Journal of Science* 20: 305-324.
83. Ntziachristos V (2010) Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods* 7: 603-614.
84. Zhang HF, Maslov K, Stoica G, Wang LV (2006) Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 24: 848-851.
85. Razansky D, Vinegoni C, Ntziachristos V (2007) Multispectral photoacoustic imaging of fluorochromes in small animals. *Opt Lett* 32: 2891-2893.
86. Li L, Zemp RJ, Lungu G, Stoica G, Wang LV (2007) Photoacoustic imaging of lacZ gene expression in vivo. *J Biomed Opt* 12: 020504.
87. Ntziachristos V, Weissleder R (2001) Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation. *Opt Lett* 26: 893-895.
88. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84: 1155-1228.
89. Cachin F, Miot-Noirault E, Gillet B, Isnardi V, Labeille B, et al. (2014) (123)I-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. *J Nucl Med* 55: 15-22.
90. Rbah-Vidal L, Vidal A, Besse S, Cachin F, Bonnet M, et al. (2012) Early detection and longitudinal monitoring of experimental primary and disseminated melanoma using [(1)(0)F]ICF01006, a highly promising melanoma PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39: 1449-1461.
91. Enochs WS, Petherick P, Bogdanova A, Mohr U, Weissleder R (1997) Paramagnetic metal scavenging by melanin: MR imaging. *Radiology* 204: 417-423.
92. Kitai T, Torii M, Sugie T, Kanao S, Mikami Y, et al. (2012) Photoacoustic mammography: initial clinical results. *Breast Cancer*: 1-8.
93. Ntziachristos V (2011) Clinical translation of optical and optoacoustic imaging. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 369: 4666-4678.
94. Hartleb J, Damm Y, Arndt R, Christophers E, Stockfleth E (1999) Determination of 5-S-cysteinyl-dopa in plasma and urine using a fully automated solid-phase extraction--high-performance liquid chromatographic method for an improvement of specificity and sensitivity of this prognostic marker of malignant melanoma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 727: 31-42.
95. McCannel TA, McCannel CA (2014) Iodine 125 brachytherapy with vitrectomy and silicone oil in the treatment of uveal melanoma: 1-to-1 matched case-control series. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89: 347-352.
96. Qin C, Liu H, Chen K, Hu X, Ma X, et al. (2014) Theranostics of malignant melanoma with ⁶⁴CuCl₂. *J Nucl Med* 55: 812-817.
97. Hasegawa K, Ito S, Inoue S, Wakamatsu K, Ozeki H, et al. (1997) Dihydro-1,4-benzothiazine-6,7-dione, the ultimate toxic metabolite of 4-S-cysteaminyphenol and 4-S-cysteaminylcatechol. *Biochem Pharmacol* 53: 1435-1444.
98. Glass K, Ito S, Wilby PR, Sota T, Nakamura A, et al. (2012) Direct chemical evidence for eumelanin pigment from the Jurassic period. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10218-10223.
99. Nappi AJ, Christensen BM (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 443-459.

100. Chi A, Valencia JC, Hu ZZ, Watabe H, Yamaguchi H, et al. (2006) Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 5: 3135-3144.
101. Bhatnagar V, Anjaiah S, Puri N, Darshanam BN, Ramaiah A (1993) pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 307: 183-192.
102. Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S (2009) Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 563-579.
103. Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, et al. (1997) Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J Biol Chem* 272: 26226-26235.
104. Ito S, Wakamatsu K (2008) Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol* 84: 582-592.
105. Hirosaki K, Yamashita T, Wada I, Jin HY, Jimbow K (2002) Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. *J Invest Dermatol* 119: 475-480.
106. Coutsoukis P (2008).
107. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
108. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
109. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
110. Hess M, Stritzker J, Hartl B, Sturm JB, Gentschev I, et al. (2011) Bacterial glucuronidase as general marker for oncolytic virotherapy or other biological therapies. *J Transl Med* 9: 172.
111. Donat U, Weibel S, Hess M, Stritzker J, Hartl B, et al. (2012) Preferential colonization of metastases by oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68 in a human PC-3 prostate cancer model in nude mice. *PLoS One* 7: e45942.
112. Biesemeier A, Schraermeyer U, Eibl O (2011) Quantitative chemical analysis of ocular melanosomes in stained and non-stained tissues. *Micron* 42: 461-470.
113. Kirn DH, Thorne SH (2009) Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 64-71.
114. Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC (2005) Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5: 965-976.
115. Frentzen A, Yu YA, Chen N, Zhang Q, Weibel S, et al. (2009) Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12915-12920.
116. Jun KH, Gholami S, Song TJ, Au J, Haddad D, et al. (2014) A novel oncolytic viral therapy and imaging technique for gastric cancer using a genetically engineered vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *J Exp Clin Cancer Res* 33: 2.
117. Sturm JB, Hess M, Weibel S, Chen NG, Yu YA, et al. (2012) Functional hyper-IL-6 from vaccinia virus-colonized tumors triggers platelet formation and helps to alleviate toxicity of mitomycin C enhanced virus therapy. *J Transl Med* 10: 9.
118. Schafer S, Weibel S, Donat U, Zhang Q, Aguilar RJ, et al. (2012) Vaccinia virus-mediated intra-tumoral expression of matrix metalloproteinase 9 enhances oncolysis of PC-3 xenograft tumors. *BMC Cancer* 12: 366.
119. Chen NG, Yu YA, Zhang Q, Szalay AA (2011) Replication efficiency of oncolytic vaccinia virus in cell cultures prognosticates the virulence and antitumor efficacy in mice. *J Transl Med* 9: 164.
120. Hong L, Liu Y, Simon JD (2004) Binding of metal ions to melanin and their effects on the aerobic reactivity. *Photochem Photobiol* 80: 477-481.

121. Suzukawa AA, Vieira A, Winnischofer SM, Scalfo AC, Di Mascio P, et al. (2012) Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. *Free Radic Biol Med* 52: 1945-1953.
122. Rad HH, Yamashita T, Jin HY, Hirosaki K, Wakamatsu K, et al. (2004) Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res* 298: 317-328.
123. Kipp C, Young AR (1999) The soluble eumelanin precursor 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid enhances oxidative damage in human keratinocyte DNA after UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 70: 191-198.
124. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, et al. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.
125. Cunha ES, Kawahara R, Kadowaki MK, Amstalden HG, Noletto GR, et al. (2012) Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. *Exp Cell Res* 318: 1913-1925.
126. Stritzker J, Huppertz S, Zhang Q, Geissinger U, Hartl B, et al. (2014) Inducible gene expression in tumors colonized by modified oncolytic vaccinia virus strains. *J Virol* 88: 11556-11567.
127. Barza M, Schiefe RT (1977) Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics. Part 1: tetracyclines. *Am J Hosp Pharm* 34: 49-57.
128. Smith K, Leyden JJ (2005) Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clin Ther* 27: 1329-1342.
129. Bahrami F, Morris DL, Pourgholami MH (2012) Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* 12: 44-52.
130. Grigg P, Titong A, Jones LA, Yilma TD, Verardi PH (2013) Safety mechanism assisted by the repressor of tetracycline (SMART) vaccinia virus vectors for vaccines and therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15407-15412.
131. Hagen CJ, Titong A, Sarnoski EA, Verardi PH (2014) Antibiotic-dependent expression of early transcription factor subunits leads to stringent control of vaccinia virus replication. *Virus Res*.
132. Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Christophi C (2005) Focal hyperthermia produces progressive tumor necrosis independent of the initial thermal effects. *J Gastrointest Surg* 9: 410-417.
133. Srivastava P (2002) Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20: 395-425.
134. Quintana FJ, Cohen IR (2005) Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 175: 2777-2782.
135. Alberts J, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2002) *THE CELL*.
136. Hasday JD, Singh IS (2000) Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell Stress Chaperones* 5: 471-480.
137. Li Y, Brown RE, Martin RC (2013) Incomplete thermal ablation of hepatocellular carcinoma: effects on tumor proliferation. *J Surg Res* 181: 250-255.
138. Vogl TJ, Farshid P, Naguib NN, Zangos S (2013) Thermal ablation therapies in patients with breast cancer liver metastases: a review. *Eur Radiol* 23: 797-804.
139. Vogl TJ, Farshid P, Naguib NN, Darvishi A, Bazrafshan B, et al. (2014) Thermal ablation of liver metastases from colorectal cancer: radiofrequency, microwave and laser ablation therapies. *Radiol Med* 119: 451-461.
140. Norred SE, Johnson JA (2014) Magnetic resonance-guided laser induced thermal therapy for glioblastoma multiforme: a review. *Biomed Res Int* 2014: 761312.
141. Buskirk AD, Templeton SP, Nayak AP, Hettick JM, Law BF, et al. (2014) Pulmonary immune responses to *Aspergillus fumigatus* in an immunocompetent mouse model of repeated exposures. *J Immunotoxicol* 11: 180-189.
142. Chai LY, Netea MG, Sugui J, Vonk AG, van de Sande WW, et al. (2010) *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology* 215: 915-920.

143. D'Acquisto F, Carnuccio R, d'Ischia M, Misuraca G (1995) 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a diffusible melanin precursor, is a potent stimulator of lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide by J774 macrophages. *Life Sci* 57: PL401-406.
144. Berset M, Cerottini JP, Guggisberg D, Romero P, Burri F, et al. (2001) Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 95: 73-77.
145. Goto H, Usui M, Wakamatsu K, Ito S (2001) 5-S-cysteinyldopa as diagnostic tumor marker for uveal malignant melanoma. *Jpn J Ophthalmol* 45: 538-542.
146. Wakamatsu K, Yokochi M, Naito A, Kageshita T, Ito S (2003) Comparison of phaeomelanin and its precursor 5-S-cysteinyldopa in the serum of melanoma patients. *Melanoma Res* 13: 357-363.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Δ OD ₄₇₅	Differenz der optischen Dichte bei 475 nm
°C	Grad Clesius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2SCD	2-S-Cysteinyldopa
5SCD	5-S-Cysteinyldopa
90° RF-Impuls	elektromagnetischer Impuls in 90° Orientierung
Abb.	Abbildung
APC	<i>adenomatous-polyposis-coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	<i>Bcl-2-associated protein</i>
BCG	Bacille Calmatte-Guérin
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>B-cell lymphoma-X_L</i>
B-RAF	<i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
BT	7-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-5-Hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin
BTCA	BT-Carbonsäure
Ca	Kalzium
CA-4P	Combretastatin A-4 Phosphat
CD-chinon	Cysteinyldopachinon
CEV	<i>cell-associated enveloped virus</i>
Cl	Chlor
cm	Centimeter
CMC	Carboxymethylcellulosen
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ctrl rVACV	rekombinanter Kontrollvirus
Cu	Kupfer

DCT	DOPAchrom-Tautomerase
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
dpi	Tage nach Induktion
dpTA	Tage nach thermaler Ablation
dpvi	<i>days post viral infection</i>
dpvi	Tage nach viraler Injektion
DQ	DOPAchinson
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray-microanalysis</i>
EELS	<i>Electron energy loss spectroscopy</i>
EEV	<i>extracellular mature virus</i>
EM	Elektronenmikroskop
EMT	Epithelial-mesenchymalen-Transition
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
ESI	<i>element spectroscopic imaging</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fe	Eisen
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	Fötales Kälberserum
fPAM	funktionelle photoakustische Mikroskopie
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GusA	<i>Escherichia coli</i> beta-Glucuronidase

h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
hpi	<i>hours post infection</i>
HPV-16 und 18	humanes Papilloma-Virus 16 und 18
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschock-Proteine
i.v.	intravenös
ID ₅₀	inhibitorische Dosis 50
IEV	<i>intracellular enveloped virus</i>
IL-2	Interleukin-2
IMV	<i>intracellular mature virus</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LD ₅₀	letale Dosis bei der 50 % der Zellen abgestorben sind
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
M	Molar
mA	Milliampere
Max.	maximal
MDM	magnetischer Dipolmomente
mel rVACV	melanogene rekombinante VACV
MIC	Minimal invasive Chirurgie
MIC	minimal invasive Chirurgie
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease-Familie
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

M-Organell	Melanosom-ähnliches Organell
MRT	Magnetresonanztomographie
MSOT	multispektrale optoakustische Tomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mTyr	murine Tyrosinase
MYC	Myelocytomatose Protoonkogen
N	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NIR-LATA	Nahinfrarot-Laser-assoziierte thermale Ablation
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS + 1 % Tween 20
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
PMS-Organell	Prämelanosom-ähnliches Organell
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
r.o.	retroorbital
RB	Retinoblastom-Protein
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rVACV	rekombinates Vaccinia-Virus
S	Schwefel

s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel
SN-38	7-ethyl-10-hydroxycamptothecin
SPECT	<i>single positron emission computed tomography</i>
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TetR	Tet-Repressor
TK-Lokus	Thymidinkinase-Lokus
tRNA _{Tyr}	transferRNA beladen mit Tyrosin
TSP-1	<i>thrombospondin-1</i>
Tyr	Tyrosinase
Tyrp1	Tyrosine-Helferprotein 1
V	Volt
VACV	Vaccinia-Virus
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V _{max}	enzymatische Umsatzrate
w/	mit
w/o	ohne
Zn	Zink

10 Publikationsliste

Jochen Stritzker, **Lorenz Kirscher**, Miriam Scadeng, Nikolaos C. Deliolaris, Stefan Morscher, Panagiotis Symvoulidis, Karin Schaefer, Qian Zhang, Lisa Buckel, Michael Hess, Ulrike Donat, William G. Bradley, Vasilis Ntziachristos, and Aladar A. Szalay (2013) Vaccinia virus-mediated melanin production allows MR and optoacoustic deep tissue imaging and laser-induced thermotherapy of cancer *PNAS* 110 (9) 3316-3320.

Lorenz Kirscher, Xosé Luis Deán Ben, Miriam Scadeng, Angelika Zaremba, Qian Zhang, Christina Kober, Thomas Fehm, Daniel Razansky, Vasilis Ntziachristos, Jochen Stritzker, Aladar A. Szalay (2014) Doxycycline inducible melanogenic Vaccinia Virus as theranostic Anti-Cancer Agent *Theranostics* (*submitted*)

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lorenz Martin Kirscher
Geburtsdatum: 17. Januar 1985
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1991-1996 Grundschole Höhenkirschen
1996-2004 Gymnasium Ottobrun
2004 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

2005-2008 Studium der Biologie, Friedrich-Alexander Universität Erlangen mit Abschluss Bachelor of Science
2008 Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie: Verifizierung und Funktionsanalyse von *Bacillus subtilis* WH600
2008-2012 Studium der Biologie, Julius-Maximilians Universität Würzburg mit Diplomabschluss
2011 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Neurobiologie und Humangenetik
2011-2012 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie: Untersuchungen zur artifiziellen Melaninsynthese in verschiedenen Tumorzelllinien
2012-2015 Promotionsstudium an der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Betreuung von Prof. A. A. Szalay
Dissertation: Melanogene rekombinante Vaccinia-Viren als diagnostisches und therapeutisches Agenz zur Tumorbehandlung

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. A.A. Szalay für die Unterstützung und den wissenschaftlich Input während meiner Arbeit und auch in privaten schwierigen Phasen bedanken. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit, dass ich einen Teil meiner Arbeit im Ausland absolvieren zu konnte.

Weiterhin danke ich Prof. T. Dandekar für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Jochen Stritzker während dieser Jahre, von dem ich viel gelernt habe und der mich stets unterstützte.

Meinen Kooperationspartnern möchte ich für die produktive und angenehme Zusammenarbeit danken. Es war stets eine Freude während langwierigen Messungen oder bei der Betrachtung hochauflösender Aufnahmen über wissenschaftliches und allgemein interessantes zu diskutieren.

Name	Institut	Beitrag
Prof.V.Nitziachristos	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
Dr. N. Delionais	Fraunhofer-Institut, Mannheim	MSOT-Messungen
S. Morscher	iThera	MSOT-Messungen
Dr. K. Schäfer	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
Dr.D. Razansky	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
Dr. L. Dean-Ben	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
Dr. A. Zaremba	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
T. Fehm	IBMI; Helmholtz-Zentrum München	MSOT-Messungen
Dr. M. Scadeng	University of San Diego	MRT-Messungen
Prof. Schaller	AG Schaller; Universitätsklinikum Tübingen	Elektronenmikroskopie
Dr. Biesemeier	Institut für Augenheilkunde; Tübingen	Elektronenmikroskopie
B. Fehrenbacher	AG Schaller; Universitätsklinikum Tübingen	Elektronenmikroskopie

Desweiteren möchte ich Prof. Grummt für das Korrekturlesen meiner Dissertation, die bereichernden Vorschläge bezüglich wissenschaftlicher Präsentation und sein konstruktives Interesse an meiner Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich Dr. Härtl für die viele Hilfe in den Wirren der Bürokratie danken.

Bei Dr. Gentschev möchte ich mich für viele fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und die Organisation im Hintergrund bedanken

Ich möchte mich auch bei der gesamten Biochemie um Prof. Fischer bedanken für ein gemütliches Arbeiten miteinander und nebeneinander.

Außerdem möchte ich meinen Kollegen bei Genelux Corp. Danken: Nanhai und Jason die mich mit Viren versorgt haben, Camha und Alexa die meinen Aufenthalt um so vieles angenehmer machten, Lisa, Klaas, Jaqueline, Katherina und Ricky die mir bei vielen kleinen und auch großen Frage in und um die Arbeit immer mit Rat und Tat zu Seite standen und auch jedem anderen für eine wunderbare Erfahrung.

Bei meinen Kollegen an der Universität Würzburg möchte ich mich für besondere Jahre bedanken. Vielen Dank liebe Johanna für die Hilfe im Labor, das Zuhören wenns mal wieder schlimm war und die Fröhlichkeit deiner Person. Ein Dankeschön auch an Marion für die Gesellschaft im Büro, hilfreiche Taten und Diskussionen. Rike und Caro vielen Dank für die gemeinsame Zeit, für viele hilfreiche Erklärungen und lustige Stunden. Danke Simon für eine Freundschaft auch neben dem Labor. Auch Micha möchte ich danken für jederzeit ein offenes Ohr und guten Rat zur richtigen Zeit sowie einer Freundschaft neben Tumoren und GFP. Steffi und Elisabeth danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Atmosphäre. Prisca and Sandeep thank you for sharing the daily routine of a PhD with me. A problem shared is a problem halved ;)! Das selbe gilt natürlich auch für Juliane und Christina. Vielen Dank für eure Hilfe, lustige Geschichten, Käsebrot und allzeit gute Laune – haha ;)!

Zu guter letzt danke ich meiner Familie auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte und kann und meiner Freundin die mehrmals in der Woche über einen Zeitraum von 4 Jahren unfassbar interessante Geschichten über Melanin und Viren ertragen musste. Keiner hat mehr Geduld als du! Vielen Dank.