

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



**Histologische Charakterisierung
Vaccinia Virus-infizierter humaner Tumore
im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Viktoria Maria Raab

Würzburg, Juni 2010

für Henning

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. T. Dandekar

Erstgutachter:

Prof. Dr. A. A. Szalay

Zweitgutachter:

PD. Dr. R. Hock

Inhalt

1 Zusammenfassung 5

2 Summary 8

3 Einleitung..... 10

3.1 Onkolytische Viren..... 10

3.2 Das Vaccinia-Virus 12

 3.2.1 Taxonomie der Poxviridae..... 13

 3.2.2 Morphologie des Vaccinia-Virus..... 13

 3.2.3 Lebenszyklus des Vaccinia-Virus..... 15

 3.2.4 DNA-Replikation bei Vaccinia-Viren 16

 3.2.5 Transkription der viralen DNA und Translation..... 18

3.3 Charakterisierung des rekombinanten Vaccinia Virus GLV-1h68..... 19

3.4 Krebspathologie..... 21

 3.4.1 Das Tumormikromilieu 22

 3.4.2 Krebs und Inflammation..... 23

 3.4.3 Strategien der Krebstherapie 26

3.5 Angewandte Tumormodelle 27

 3.5.1 Die humane Brustkrebszelllinie GI-101A..... 27

 3.5.2 Die humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL..... 27

3.6 Aufgabenstellung..... 31

4 Materialien 32

4.1 verwendete Chemikalien und Enzyme 32

4.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen 35

4.3 verwendete Kits..... 38

4.4 Synthetische Oligonucleotide 38

4.5 Rekombinantes Viruskonstrukt GLV-1h68..... 39

4.6 Verwendete Antikörper 40

4.7 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien 41

 4.7.1 Zelllinien 41

 4.7.2 Zellkulturmedien 42

4.8 Geräte und sonstige Materialien 44

4.9 Versuchstiere 46

4.10 Software..... 46

5 Methoden..... 47

5.1 Zellbiologische Methoden	47
5.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzellen	47
5.1.1.1 Kultivierung von CV-1-Zellen	48
5.1.1.2 Kultivierung von GI-101A-Zellen.....	48
5.1.1.3 Kultivierung von HUVEC-Zellen	48
5.1.1.4 Kultivierung von 2H11-Zellen und bEnd 3-Zellen	48
5.1.1.5 Kultivierung von J774A.1-Zellen	48
5.1.1.6 Kultivierung von 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen.....	48
5.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer	49
5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
5.1.4 Mycoplasmen-Nachweis	49
5.1.5 MTT-Proliferations-Assay	50
5.2 Mausexperimente	50
5.2.1 Versuchstiere.....	50
5.2.2 Implantation von soliden Tumoren.....	51
5.2.3 Anästhesie der Mäuse	52
5.2.4 <i>real-time</i> Detektion der viralen Replikation im Tumorgewebe mittels	53
Lumineszenz und Fluoreszenz	53
5.2.4.1 Detektion der Fluoreszenz.....	53
5.2.4.2 Detektion der Lumineszenz.....	54
5.2.5 Tumorentnahme.....	55
5.2.6 Herstellung von Tumorhomogenisaten.....	55
5.3 Vaccinia Virus- Infektion	55
5.3.1 <i>in vitro</i> -Infektion mit Vaccinia-Viren	55
5.3.2 <i>in vivo</i> -Infektion mit Vaccinia-Viren	56
5.3.3 <i>in vitro</i> - Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	57
5.3.4. Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay	57
5.3.5 Analyse des viralen Replikationsverhaltens	58
5.4. Proteinanalytische Methoden	59
5.4.1 Proteinextraktion aus Zellen	59
5.4.2 Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford	59
5.4.3 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	60
5.4.4 Färbung der Proteingele mit Coomassie Blau G250.....	62
5.4.5 Western-Blot	63
5.4.5.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen.....	63

5.4.5.2	Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran	64
5.4.5.3	Immundetektion mittels ECL-Methode.....	64
5.4.5.4	Strippen von Nitrocellulosemembranen	66
5.5	Nachweis der Genexpression des rekombinanten Vaccinia.....	67
Virus GLV-1h68 mittels RNA- und cDNA-analytischer Methoden.....		67
5.5.1	Analyse der Transkription mittels <i>real-time</i> -RT-PCR.....	67
5.5.1.1	RNA-Isolierung aus Tumorgewebe	67
5.5.1.2	DNase-Verdau der RNA-Proben	67
5.5.1.3	cDNA-Synthese	68
5.5.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	68
5.5.1.5	Analyse der DNA-Proben in Agarose-Gelen	69
5.5.1.6	Untersuchung der GFP- und Viperin-Expression mittels quantitativer <i>real-time</i> -PCR	70
5.5.2	Analyse der Transkription mittels <i>Microarray</i> -Analyse.....	71
5.6	Histologie und Fluoreszenzmikroskopie.....	73
5.6.1	Agarose-Schnitt-Technologie	73
5.6.2	Paraffin-Schnitt-Technologie.....	73
5.6.2.1	Fixierung und Dehydrierung des Tumorgewebes	74
5.6.2.2	Paraffineinbettung der Gewebeproben	74
5.6.2.3	Anfertigung der Gewebeschnitte	74
5.6.2.4	Deparaffinierung und Rehydrierung	75
5.6.2.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	75
5.6.2.6	Anfärbung der Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern.....	76
6	Ergebnisse.....	77
6.1	Histologische Charakterisierung der frühen Phase einer GLV-1h68 Infektion in Melanomzelltumoren im Xenograftmodell.....	77
6.1.1	Charakterisierung der GLV-1h68-Infektion <i>in vitro</i>	77
6.1.1.1	Morphologische Untersuchung der Melanomzellen.....	77
6.1.1.2	Fluoreszenzmikroskopie GLV-1h68-infizierter 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen.....	78
6.1.1.3	Replikationsanalyse von GLV-1h68 in 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen.....	80
6.1.2	Charakterisierung der GLV-1h68-Infektion <i>in vivo</i>	82
6.1.2.1	Einfluss der Melanomzellimplantation auf das Körpergewicht	82
6.1.2.2	Replikationsanalyse von GLV-1h68 in soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren	83
6.1.2.3	Verteilungsmuster der Viren im Tumor	84
6.1.2.4	Analyse der Virusaufnahme in soliden 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren.....	86

6.1.2.5	Analyse der 888-MEL-Tumorarchitektur	88
6.1.2.6	Charakterisierung des Immunzellinfiltrates in soliden 888-MEL-Tumoren.....	90
6.1.2.7	Analyse transkriptioneller Unterschiede zwischen soliden 888-MEL- und 1936 MEL Tumore	92
6.1.3	Analyse der Virusausbreitung nach Immunzelldepletion	96
6.1.4	Auswirkungen der Virusausbreitung auf die	103
	Immunzellpopulationen in der Tumormikroumgebung	103
6.1.5	Analyse der differentiellen Viperinexpression in soliden 888-	104
	MEL- und 1936-MEL-Tumoren	104
6.2	Histologische Charakterisierung der späten Phase einer GLV-1h68 Infektion.....	106
6.2.1	Wachstumsverhalten solider GI-101-Tumore nach Infektion	106
	mit GLV-1h68	106
6.2.2	Untersuchung der Vaskularisierung mit Ausbreitung der GLV-	107
	1h68-Infektion in soliden Tumoren	107
6.2.3	Suszeptibilitätsstudien von Endothelzellen <i>in vitro</i>	114
6.2.4	Charakterisierung des Immunzellinfiltrates 42 Tage nach	117
	Infektion	117
7	Diskussion.....	123
8	Literaturverzeichnis	130
9	Anhang	136
9.1	Abkürzungsverzeichnis	136
9.2	Curriculum Vitae	140
9.3	Publikationen.....	142
9.3.1	Arbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem.....	142
9.3.2	Veröffentlichte Abstracts	146
9.3.3	Buchkapitel	147
9.4	Danksagung.....	149
9.5	Eidstattliche Erklärung.....	151

1 Zusammenfassung

Onkolytische Viren spielen eine immer bedeutendere Rolle für die Tumorforschung, weil in zahlreichen präklinischen Studien gezeigt werden konnte, dass viral bedingte Onkolyse zu einer Tumorregression führt. Ein äußerst vielversprechender Kandidat der onkolytischen Viren ist das Vaccinia-Virus. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem attenuierten Vaccinia-Virus GLV-1h68 gearbeitet, welches nach systemischer Applikation eine Regression von Tumoren verursacht.

Obwohl bereits zahlreiche onkolytische Viren in klinischen Studien Anwendung finden, sind zugrunde liegende Abläufe bei einer Virusinfektion solider Tumore sowie Mechanismen, welche für die Tumorregression verantwortlich sind, immer noch nicht erschlossen. Um Aufschluss über notwendige Parameter für eine effiziente Infektion eines soliden Tumors mit GLV-1h68 zu erlangen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit die uninfierte Tumormikroumgebung sowie stromale Veränderungen in der frühe Phase der Infektion untersucht.

Als Tumormodell diente hierbei ein humanes autologes Melanomzellpaar (888-MEL und 1936-MEL). Diese beiden Zelllinien sind Teil einer Reihe von fünf verschiedenen Melanomzelllinien, welche alle aus den widerkehrenden Metastasen eines einzelnen Patienten (Patient 888) isoliert wurden. 888-MEL zeigt nach Virusinfektion mit GLV-1h68 ein regredierendes Verhalten (therapeutischer Index: 88,0) und ist somit respondierend nach GLV-1h68-Infektion. 1936-MEL hingegen zeigte mit einem therapeutischen Index von 13,7 ein nur schwach verlangsamtes Wachstum solider Tumore, und ist somit schwach-respondierend nach GLV-1h68-Infektion.

Als ein Grund, weshalb diese beiden autologen Melanomzelllinien unterschiedlich auf GLV-1h68-Infektion reagieren, wurde die Anzahl der Viruspartikel vermutet, welche 1 dpi im soliden Tumor vorliegt. Eine mögliche Korrelation zwischen initialem viralen Titer 1 dpi und späterer Tumorregression konnte experimentell aber nicht nachgewiesen werden. Zwei voneinander unabhängige Experimentreihen zeigten, dass bei identischer systemischer Applikation in den beiden soliden Tumoren kein Unterschied des viralen Titers vorlag.

Weiterhin wurden die Komponenten der Tumormikroumgebung und ihr möglicher Einfluss auf die Effizienz der Virusinfektion untersucht. Immunhistologische Studien zeigten, dass es im uninfizierten Zustand bei soliden 888-MEL Tumoren zu einer massiven Infiltration CD45-positiver Zellen kam, die bei 1936-MEL-Tumoren jedoch nicht zu finden war. Die Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer vergleichenden Microarray-Analyse, die das Infiltrat CD45-positiver Zellen in 888-MEL Tumoren genauer charakterisierte.

Es wurde mit Microarray-Analyse eine erhöhte Expression chemotaktischer Moleküle in soliden 888-MEL Tumoren nachgewiesen. Unter anderem wird CCL8 (MCP-2) erhöht exprimiert. Als chemotaktisches Molekül hat CCL8 eine erhöhte Monozyteninfiltration zur Folge. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von MIF (macrophage migration inhibitory factor) und dem entsprechendem Rezeptor CD74 in uninfizierten 888-MEL-Tumoren gemessen. MIF induziert als proinflammatorisches Zytokin die Synthese inflammatorischer Mediatoren. Dies erklärt die Anhäufung CD45-positiver Zellen in der Tumormikroumgebung.

Durch eine erhöhte Expression MHC II-verwandter Gene in soliden 888-MEL-Tumoren wurden die CD45-positiven Zellen als Monozyten identifiziert.

Um die Funktion der Immunzellen zu analysieren, wurde durch eine intraperitoneale Applikation des Zytostatikums Cyclophosphamid eine Monozytendepletion induziert. Diese Immundepletion resultierte in soliden 888-MEL-Tumoren in einer signifikant verringerten Virusreplikation und -Ausbreitung nach Infektion mit GLV-1h68.

Diese Ergebnisse implizieren, dass durch eine erhöhte Infiltration CD45-positiver Zellen in die Tumormikroumgebung die GLV-1h68-Infektion und -Replikation erleichtert wird.

Nach Ausbreitung der Infektion kommt es in respondierenden Tumoren nach einem ersten Wachstumsarrest zu einer Tumorregression. Um Aufschluss über den beteiligten Mechanismus bei der Tumorregression zu erlangen, wurden GLV-1h68-infizierte-Tumore in der späten Phase der Infektion untersucht.

Drei mögliche Mechanismen viral verursachter Onkolyse wurden beschrieben: Tumorzell-spezifische Onkolyse, Zerstörung der Tumervaskulatur oder anti-tumorale Immunantwort.

Für diese Experimente wurden humane Brustkarzinomzellen als Tumormodell verwendet. Mit diesem Tumormodell sollte analysiert werden, welcher der drei bislang diskutierten Mechanismen bei einer GLV-1h68-Infektion vorlag.

Als erstes zeigten histologische Studien, dass Virusinfektion und -Replikation zu ausgedehnten Tumornekrosen führen. Dabei blieben die Blutgefäße in uninfizierten und auch in infizierten Bereichen des Tumors intakt und funktionell aktiv. Systemische Perfusion der Vaskulatur mit Lektin zeigte, dass die Tumervaskulatur an das periphere Blutgefäßsystem angeschlossen war.

Nachfolgende Experimente zeigten, dass Endothelzellen nicht durch die Viren infiziert wurden, wohingegen aber Endothelzell-ummantelnde, Gefäß-stabilisierende Perizyten nur in uninfizierten, nicht aber in infizierten Bereichen des Tumors vorkamen. Perizyten wurden möglicherweise durch Virusinfektion lysiert.

Morphologische und funktionelle Analyse der Blutgefäße im Tumor zeigte, dass GLV-1h68-Infektion Hyperpermeabilität, Vasodilatation und eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 verursachte.

Eine erhöhte CD31-Expression erleichtert eine Infiltration rekrutierter Immunzellen. Das konnte durch immunhistochemische Färbung von CD45 und MHC II besonders in intratumoralen Bereichen gezeigt werden.

Durch Cyclophosphamid-vermittelte Immunsuppression wurde nachgewiesen, dass diese rekrutierten Immunzellen keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Tumorregression haben. Nach Immundepletion in soliden GI-101A-Tumoren konnte eine verstärkte Virusinfektion, effektivere Onkolyse und frühzeitigere Tumorregression nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass der dominierende Mechanismus, welcher zur Tumorregression führt, die Onkolyse ist.

2 Summary

Preclinical application of oncolytic viruses to induce virus-mediated tumor rejection revealed promising results in the past few years. Vaccinia virus GLV-1h68, used in this study, was shown to induce complete tumor disappearance upon infection.

However the exact underlying mechanisms of viral infection and virus-mediated tumor regression are still not well understood. This study describes the characterization of the early phase of a GLV-1h68 infection and the role of stromal components as well as the mechanisms involved in tumor regression.

To address the question, which components are necessary for an effective GLV-1h68 infection, followed by successive rounds of viral replication, the first part of this study focused on the characterization of the early phase of Vaccinia virus infection in a human autologous melanoma system.

Five different cell lines were previously generated from a melanoma patient experiencing several reoccurrences in a 12 year span. The melanoma cell line expanded from a metastasis at an early time point (888-MEL) retained responsiveness to GLV-1h68 treatment, while the subsequent cell line 1936-MEL (studied here), became non-responsive to the same treatment.

To address the influence of the amount of viral particles homing to the tumor within initial 24 hpi, 888-MEL and 1936-MEL tumors were compared. It could clearly be demonstrated, that the initial homing of viral particles is not the reason for further effective viral replication and spreading. The comparative viral titers were measured in 888-MEL and 1936-MEL tumors 1 dpi and found similar.

Immuno-histological comparison of xenografts generated with 888-MEL or 1936-MEL revealed a massive infiltration of CD45-positive cells in 888-MEL tumors, but not in 1936-MEL tumors.

Comparative microarray analysis of uninfected 888-MEL and 1936-MEL solid tumors supported these findings. Beside a significant up-regulation of CCL8 in 888-MEL tumors, an increased expression of CD74/MIF suggests an increased monocyte infiltration in 888-MEL uninfected tumors, which is not apparent in 1936-MEL tumors.

To gain better understanding of an immune cell infiltration into solid 888-MEL tumors, a monocyte depletion study using the immunosuppressive agent cyclophosphamide (CPA) was carried out. This treatment resulted in a highly significant reduction of viral replication and spreading in 888-MEL tumors following infection with GLV-1h68.

These results demonstrated that the replication efficiency of GLV-1h68 is higher in 888-MEL xenografts compared to 1936-MEL. The enhanced replication is in direct correlation with a higher number of CD45-positive cells, which infiltrated the tumor site prior to virus injection.

Through successive rounds of viral replication the virus can spread throughout the tumor and induces tumor regression. To gain insights into mechanisms involved in tumor regression, late stages of a GLV-1h68 infection were characterized in human breast tumor xenografts (GI-101A).

Theoretically oncolytic virus therapy could be based on three different mechanisms: by tumor cell specific oncolysis, by destruction of the tumor vasculature or by an anti-tumoral immunological response. Here the contribution of the three factors was analyzed.

Histological examination showed that viral infection of GI-101A tumors led to broad tumor necrosis. However, the tumor vasculature in infected tumor areas remained functional and endothelial cells were not infected neither in tumors nor in cultured cells.

It was further demonstrated, that viral tumor colonization activated the tumor endothelium leading to vascular hyperpermeability, vessel dilatation and an increased expression of the adhesion molecule CD31, which in a next step facilitated infiltration of inflammatory cell. This could be visualized by immunohistochemical staining of MHCII- and CD45-positive cells. The stainings revealed increased intratumoral infiltration of immune cells within infected tumor xenografts.

The recruited immune cells however, do not seem to be causative for the tumor regression, since immunosuppression of GLV-1h68-infected animals led to increased viral replication and broader distribution in the tumor tissue, resulting in more efficient oncolysis and earlier start of the tumor regression phase.

In summary, these results indicate that GLV-1h68 mediated oncolysis is the primary mechanism of tumor regression. Therefore, enhancing the viral replication and distribution within the tumor microenvironment should lead to improved therapeutic results in preclinical studies and clinical applications.

3 Einleitung

3.1 Onkolytische Viren

Die Applikation von onkolytischen Viren als Tumorthapeutikum hat in den letzten Jahren einen immer höheren Stellenwert eingenommen.

Begründung dafür ist, dass Krebserkrankungen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen zählen, und dabei die klassischen Therapiekonzepte immer noch nicht den gewünschten Heilungserfolg zeigten. Die Problematik etablierter Tumorthapeutika liegt vor allem in mangelnder Detektion metastatischen Gewebes, aber auch bei den gravierenden Nebenwirkungen von Radio- und Chemotherapien.

Anfänglich gelangte aber auch die Anwendung von onkolytischen Viren als potentielles Tumorthapeutikum nach ersten vielversprechenden Beobachtungen im frühen 20. Jahrhundert aufgrund massiver negativer Nebeneffekte aus dem Fokus der Tumorforschung.

Innovative molekularbiologische Techniken ermöglichten es jedoch im Laufe der letzten Jahre attenuierte Formen bekannter onkolytischer Viren zu generieren.

Die viral vermittelte Tumorregression erzielte somit den Stellenwert eines lukrativen Tumorthapeutikums, welches möglicherweise Defizite bestehender Behandlungstechniken umgehen könnte. Jedoch nicht jedes onkolytische Virus kann in die Gruppe systemisch applizierbarer Virotherapeutika aufgenommen werden. Potentielle Kandidaten müssen von vornherein bestimmte Kriterien erfüllen, um in klinische Studien eingeschlossen werden zu können. Dazu zählt unter anderem eine hohe Tumorspezifität, was bedeutet, dass nach systemischer Injektion des Virus ausschließlich Tumorzellen aber kein gesundes Gewebe infiziert wird. Weiterhin muss das Virus sich in den Tumorzellen gut replizieren können und im Anschluss daran auch zur Lyse der Zellen führen.

Innerhalb der onkolytischen Viren unterscheidet man zwischen onkolytischen Viren der ersten Generation, welche sich durch eine natürliche Tumorselektivität auszeichnen (Bsp.: Reovirus, VSV, NDV) [1] und onkolytische Viren der zweiten Generation. Diese erhalten ihre Tumorselektivität durch gezielte Deletion von Genen (Bsp.: HSV, VV, Adenovirus) [2] [3], die für eine effiziente Replikation in normalen Zellen nötig sind, jedoch in Tumorzellen nicht benötigt werden [3]. Zusätzlich kann der Einsatz von tumorspezifischen Promotoren für replikationsspezifische Gene eine zusätzliche Selektivität verleihen [4].

Ein weiterer Ansatz, der aber vorwiegend bei der Verwendung von Adenoviren Anwendung findet, ist die Modifikation der viralen Hülle in einer Form, die eine selektive Aufnahme in Tumorzellen begünstigt [5].

Eine zusätzliche wichtige Anforderung an ein Virotherapeutikum ist eine hohe genetische Stabilität, damit es in großen Mengen amplifiziert und aufgereinigt werden kann.

Bezüglich der Sekundäreffekte der Virusinfektion sollte nur eine milde virale Erkrankung im Patienten erkennbar sein. Zudem ist eine mögliche Virusinaktivierung im Falle einer Infektion von gesundem Gewebe von enormem Vorteil.

Die Integration viraler DNA in das Genom des Patienten ist auf keinen Fall erwünscht und sollte bei der Wahl des verwendeten Virus beachtet werden [6].

Im Idealfall handelt es sich bei dem verwendeten Stamm und einen attenuierten nicht-virulenten Klon des wildtypischen Stammes.

Bei der Untersuchung potentiell verwendbarer Viren, war sehr häufig unzureichende Amplifikation des Virus in soliden Tumoren immunkompetenter Organismen das Problem [7].

Eine weitere Schwachstelle der onkolytischen Viren eröffnete sich durch die Tumorarchitektur. Nach systemischer Applikation erreichen die Viruspartikel den Tumor durch die Blutgefäße. Dabei stellen besonders Fibrose oder nekrotische Regionen innerhalb eines soliden Tumors eine physische Barriere dar, was eine homogene Infektion des Tumors verhindert. Eine onkolytische Virustherapie eignet sich somit bevorzugt bei gut vaskularisierten Tumoren.

Bei der Therapie mit Viren, die eine rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzelle benötigen, kommt es oft zu einer nicht ausreichenden Rezeptorexpression innerhalb des Tumorgewebes. Es werden somit Viren bevorzugt, die keine spezifischen Rezeptoren für die Aufnahme in die Wirtszelle benötigen.

Eines der ersten onkolytischen Viren, welches zunächst in vorklinischen Studien charakterisiert wurde und mittlerweile auch erste klinische Studien durchlaufen hat, war eine attenuierte Form des Herpes-Simplex Virus (HSV-1). Aber auch weitere Vertreter der DNA-Viren wie etwa das Adenovirus wurden auf ihre mögliche Anwendung in der Tumorthherapie getestet [8].

Das in dieser Arbeit charakterisierte DNA-Virus Vaccinia-Virus GLV-1h68 ist einer der Erfolg versprechensten Kandidaten der onkolytischen Viren. Das Virus zeichnet sich durch eine hohe Tumorspezifität aus, und dabei zeichnet es sich innerhalb der Tumorzellen durch ein breites Wirtszellspektrum aus, weil es für die Aufnahme in die Zelle keine spezifischen Zelloberflächenrezeptoren benötigt.

Weiterhin ist es möglich große Mengen an transgener DNA in das virale Genom zu inserieren, und somit das Virus zusätzlich zum Carrier von „tumor drugs“ zu machen, was zu einer weiteren Optimierung der onkolytischen Tumorthherapie führen kann.

Durch eine ausschließliche Replikation von Vaccinia-Viren im Cytoplasma, ist das Virus zum einen weitgehend unabhängig von der Wirtszelltranskriptionsapparatur und zudem wird durch diese räumliche Trennung eine Integration von viraler DNA in das Wirtszellgenom umgangen.

Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch *in vivo*-Studien von Vaccinia-Viren im *nude*-Mausmodell, welche nach systemischer Injektion eine ausschließliche Kolonisierung des Virus im soliden Tumor zeigten.

3.2. Das Vaccinia-Virus

Bei Pocken handelt es sich um eine viral hervorgerufene, äußerst schwerwiegende und hoch ansteckende Infektionskrankheit. Diese Krankheit war in der Geschichte der Menschheit Auslöser zahlreicher Epidemien und hat dabei weltweit zahlreiche Todesopfer gefordert.

Auslöser der Pocken ist das Variola-Virus. Diese Variola-Viren gehören zu den Poxviridae und dabei genauer zu den Orthopoxviren.

Man unterscheidet bei den Variola-Viren zwischen zwei unterschiedlichen Arten: *Variola major* und *Variola minor*.

Die Letalitätssrate bei *Variola major* liegt mit 30-40% deutlich über der von *Variola minor* [9]. Da beide Viren genomisch nahezu identisch sind, muss dieser gravierende Unterschied auf nur einer geringen Anzahl von Genen gründen.

Der Krankheitsverlauf gestaltet sich wie folgt: in einem 2-4 tägigen Initialstadium hat der Patient zunächst hohes Fieber, Kopf-, Kreuz- und Gliederschmerzen, Entzündung der oberen Atemwege und einen vorübergehenden Ausschlag. In dieser Phase der Infektion besteht die höchste Ansteckungsgefahr durch Tröpfcheninfektion, da sich zu diesem Zeitpunkt die meisten Viren im Speichel befinden.

Im folgenden Eruptionsstadium kommt es zur Ausbildung von blass roten, juckenden Flecken, die sich zu Knötchen, eingedellten Bläschen mit dunkelrotem Saum und Pusteln entwickeln. Wenn diese Bläschen aufplatzen und verkrusten, entstehen anschließend so genannte Pockennarben. Eine Pockeninfektion verläuft bei Nichtgeimpften fast immer tödlich.

Eine Vakzinierung gegen eine Pockenerkrankung ist durch eine einmalige Injektion von Vaccinia-Viren (Kuhpocken) möglich. Bei diesen Vaccinia-Viren handelt es sich um die am besten charakterisierte Gruppe der Pockenvirus-Familie (Poxviridae).

Erste Erkenntnisse über einen Impfschutz gegen Pocken erlangte 1776 der englische Landarzt Edward Jenner. Er stellte fest, dass es durch eine Infektion mit Kuhpocken zu einem abgeschwächten Infektionsverlauf kommt, und dass nach Ausheilung dieser Infektion eine lebenslange Immunität besteht. Somit gelang ihm erstmals die Vakzinierung eines Menschen gegen Pocken. Daraus entwickelte sich 1874 eine weltweite Impfpflicht, die jedoch erst 1967 unter Schirmherrschaft der

World Health Organisation (WHO) durch ein weltweit angelegtes Impfprogramm realisiert werden konnte. 1977 wurden Pocken offiziell von der WHO für ausgerottet erklärt. 1980 wurde auf Anraten der World Health Assembly (WHA), einer Versammlung der Mitgliedsländer der WHO, die Schutzimpfung in allen Ländern wieder aufgehoben.

Die Applikation von Vaccinia-Viren geht jedoch mittlerweile über die alleinige Verwendung als Impfstoff hinaus.

So haben Vaccinia-Viren in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle als Tumorthapeutikum eingenommen. Neben anderen onkolytischen Viren wie etwa Adenoviren oder Herpesviren zählen Vaccinia Viren zu den vielversprechendsten Kandidaten innerhalb der Gruppe der onkolytischen Viren [10].

Innovative biotechnologische Methoden ermöglichten es zudem, das Vaccinia-Virus dahingehend zu modifizieren, dass es als Träger von Tumorantigenen fungiert. Ein weiterer Ansatz war es Gene, die für etablierte Krebstherapeutika kodieren in das Genom zu inserieren, um die viral induzierte Tumorregression noch weiter zu optimieren.

3.2.1. Taxonomie der Poxviridae

Die Familie der Poxviren wird in zwei Unterfamilien unterteilt: die Entomopoxvirinae und die Chordopoxvirinae. Diese Unterscheidung begründet sich durch die Wahl ihres Wirtsorganismus. Entomopoxvirinae infizieren ausschließlich Insekten, wohingegen Chordopoxvirinae Vertebraten als Wirt bevorzugen. Jede Unterfamilie wird weiter in zahlreiche Gattungen unterteilt.

Eine Gattung der für den Mensch relevanten Chordopoxvirinae sind die Orthopoxviren. Zu diesen zählen sowohl das humanpathogenen Variola-Virus als auch das Vaccinia-Virus [11].

3.2.2. Morphologie des Vaccinia-Virus

Pockenviren, und somit auch Vaccinia-Viren, zählen zu den großen DNA-Viren. Sie besitzen eine etwa 130-300 bp umfassende doppelsträngige DNA, die an den Enden Haarnadelschleifen aufweisen [12].

Die DNA ist in einem hantelförmigen Kern verpackt, in dem außer der DNA noch weitere virale Enzyme, wie eine DNA-abhängige RNA-Polymerase oder ein RNA-Prozessierungs-Enzym, lokalisiert sind [9].

Der Kern eines reifen Virion ist von einer Hülle umgeben, die aus einer Lipidmembran mit nicht-glykosylierten viralen Proteinen besteht [12].

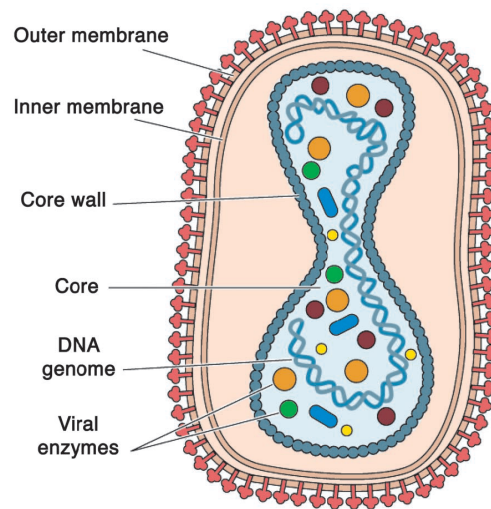


Abb. 3.2.2. Mature Virus (MV) aus Harrison *et al.*, 2004

Reife Virionen (mature virus; MV) werden in zwei Arten unterteilt:

- IMV: intracellular mature virion
- EEV: extracellular enveloped virion

Wie die Nomenklatur bereits andeutet, befinden sich IMV innerhalb der Zelle, und EEV außerhalb der Zelle.

Weiterhin unterscheiden sich beide Virusformen durch ihre Anzahl an umgebenden Lipidmembranen: IMV sind von einer Membran umschlossen, EEV dagegen von zwei [13].

Eine weitere Unterscheidung erfolgt aufgrund der unterschiedlich exprimierten Oberflächenproteine [14-15].

EEV entstehen aus IMV, wenn IMVs das intrazelluläre Membrannetzwerk durchlaufen. Der genaue Mechanismus ist dabei wie folgt: wenn IMVs eine *trans*-Golgi-Zisterne [16] oder ein Endosom [17] durchlaufen erhalten sie eine zweite Hülle. In diesem Stadium werden die Virionen als IEV (intracellular enveloped virus) bezeichnet. Um die Zelle verlassen zu können, werden diese Viruspartikel entlang von Mikrotubuli zur Zelloberfläche transportiert [18-19], und fusionieren dort mit der Plasmamembran. Nachdem die zusätzliche Membran auf der Zellinnenseite mit der Plasmamembran verschmilzt, wird das Virus durch Exocytose aus der Zelle entlassen.

Meist lösen sich diese Viruspartikel jedoch nicht von der Membran ab, sondern verbleiben als CEV (cell-associated enveloped virus) [20] an der Plasmamembran. Nur ein sehr geringer Teil (ca. 0,5%) löst sich wirklich von der Zelle ab und liegt dann als EEV vor [14].

Prozentual die größte Gruppe machen aber IMVs aus, und somit kommt es erst nach Zelllyse zur Infektion von Nachbarzellen.

Das Vaccinia-Virus repliziert im Cytoplasma der Wirtszelle. Das bedeutet, dass das Virus unabhängig von der Wirtszelle ist, vor allem bezüglich der DNA-Replikation und mRNA-Synthese. Das Virus benötigt nur wenige Proteine des Wirtes für die mRNA-Synthese [21]. Diese weitgehende

transkriptionelle Unabhängigkeit der Poxviren ist eine ihrer Besonderheiten und unterscheidet sie auch von den übrigen DNA-Viren. Diese besitzen weit weniger selbst codierte Transkriptionsproteine und sind somit in viel höherem Maße von der Wirtszelle abhängig.

3.2.3. Lebenszyklus des Vaccinia-Virus

Wenn ein IMV-Partikel eine Zelle infiziert, so findet dies im Wesentlichen in drei Schritten statt: Virusanheftung, Fusionsproteinaktivierung und Membranfusion.

Die Anheftung des Virus an die Zelle erfolgt indem bestimmte Oberflächenmoleküle eines IMV an Glykosaminoglykane (GAGs) der Zelle binden. Der genaue Mechanismus der Viruspartikelbindung an die Membran ist noch nicht vollkommen verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass die folgenden vier Proteine an der Bindung essentiell beteiligt sind: A21, A28, H2, L5. Alle vier Proteine besitzen eine N-terminale hydrophobe Domäne [22-23]. Eine weitere Gemeinsamkeit der Proteine besteht darin, dass sie alle untereinander und zusätzlich noch mit anderen IMV-Membranproteinen assoziiert sind. Der Zusammenschluss dieser Proteine dient wahrscheinlich als ein Eintritts/Fusionskomplex [22].

Nachdem das Virus sich an die Zellmembran geheftet hat, findet nach Aktivierung der Fusionsproteine die Fusion mit der Zellmembran statt. Dabei verschmilzt die IMV-Hüllmembran entweder mit der Zellmembran oder mit der Membran eines endocytotischen Vesikels [24-25]. Die IMV-Oberflächenantigene bleiben nicht außerhalb der Zelle zurück, sondern werden in die Plasmamembran eingebettet [26].

Bei EEV verläuft die Infektion aufgrund der zusätzlichen Membran etwas anders. Diese Membran muss vor Eintritt in die Zelle entfernt werden, da sonst ein Partikel mit noch intakter Hülle in die Zelle eintreten würde. Dabei haben Vaccinia-Viren eine bislang einzigartige Strategie entwickelt. Normalerweise entfernen membran-umgebene Viren ihre Hülle durch Membranfusion vor Eintritt in die Zelle [24]. Vaccinia-Viren hingegen entfernen ihre zweite Hülle durch einen Liganden-abhängigen Auflösungsprozess. Das Resultat ist, ebenso wie bei der Infektion mit IMV, der Eintritt des Viruskerns in die Zelle.

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte finden nun im Cytoplasma der Wirtszelle statt, ebenso die DNA-Replikation.

Nach einer Infektion mit Vaccinia-Viren finden in der Zelle starke Veränderungen der Zellfunktion, des Metabolismus und der Morphologie statt. Alle diese Virus-bedingten Veränderungen werden unter dem Begriff „cytophatic effects“/CPE [27-28] zusammengefasst.

Ein erster Hinweis auf eine Infektion der Zelle mit Vaccinia-Viren ist eine veränderte Plasmamembran-Permeabilität, die allein auf dem Eintritt des Virus und nicht durch Expression viraler Proteine beruht.

Späte CEPs sind beispielsweise die Inhibierung der Wirtspolypeptidbiosynthese [29], die Abrundung der Zellen bedingt durch virale Polypeptidsynthese [30] und die beginnende Zellwanderung. Die Tatsache, dass uninfizierte Zellen adhären sind, infizierte Zellen aber wandern, deutet auf eine Änderung in der Organisation des Cytoskeletts hin, aufgrund der Expression viraler Proteine. Wenn die späten Gene der Viren exprimiert werden, kommt es zur Ausbildung von Oberflächenmikrovilli [31] und zur Bildung zellulärer Fortsätze [27].

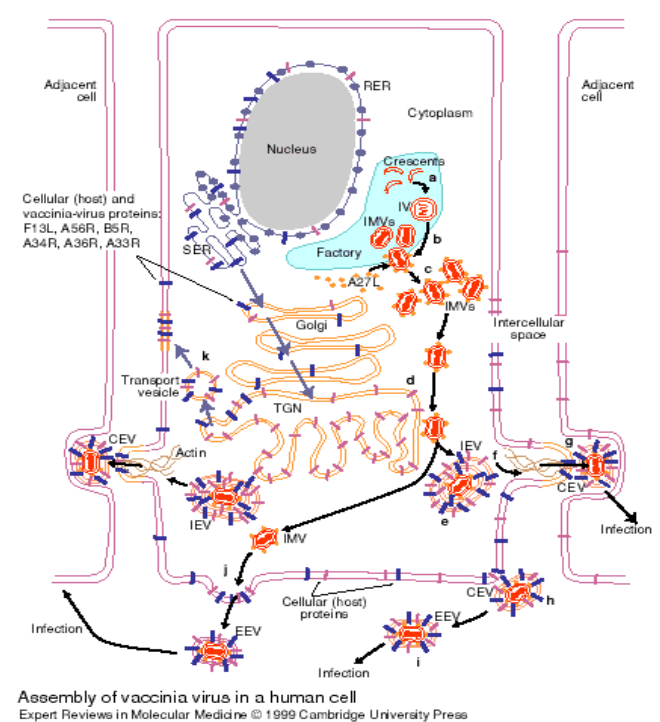


Abb.3.2.3. Lebenszyklus des Vaccinia-Virus

3.2.4. DNA-Replikation bei Vaccinia-Viren

Nachdem der Viruskern in die Zelle eingeschleust wurde, assoziiert er mit Mikrotubuli und wird entlang dieser Komponente des Cytoskeletts bis zur cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Reticulums (ER) transportiert [32].

Während der Viruskern noch verschlossen ist, erfolgt die Synthese der ersten 100 frühen viralen Proteine.

Erst dann öffnet sich der Kern an den langen Seiten und entlässt seine parentale DNA zusammen mit den assoziierten Proteinen [33]. Dieser DNA-Protein-Komplex ist auch der Origin der DNA-Replikation [34]. Vermutlich sind die gebundenen Proteine an der Replikation beteiligt. Der genaue Initiationsmechanismus ist jedoch noch nicht verstanden. Eine bis jetzt unerklärliche Besonderheit ist

Schließlich wird die replizierte DNA in die neu gebildeten Membranhüllen aufgenommen, wodurch schließlich neue IMV-Partikel entstehen. Ein sehr geringer Anteil der IMV-Partikel durchläuft daran anschließend den weiteren Syntheseweg der EEV-Partikel. Diese EEVs werden entweder in das umgebende Medium freigegeben, oder bleiben am Ende langer Filopodien auf der Zelloberfläche haften (CEV/cell-associated enveloped virus [20]). Letztere sind für die Zell-Zell-Ausbreitung der Viren sehr wichtig.

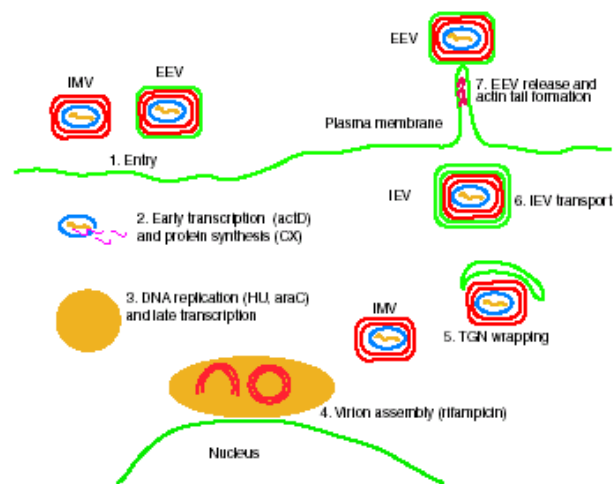


Abb. 3.2.4. Lebenszyklus des Vaccinia-Virus aus Schramm und Locker, 2005

3.2.5. Transkription der viralen DNA und Translation

Die Genomreplikation und die Assemblierung neuer Viruspartikel wird durch die zeitliche Regulierung der Genexpression gesteuert. Man unterscheidet generell zwischen drei verschiedenen Gruppen von Genprodukten: frühe, intermediäre oder späte Genprodukte. Zu den früh im Infektionszyklus exprimierten Genen zählen: Proteine der DNA-Replikation [37-38], Proteine der Nukleotidsynthese [38-39], Proteine zur Kernentpackung und Freisetzung der parentalen DNA [40-41], Proteine der Gentranskription [42] und Proteine zur Umgehung der Immunantwort des Wirts [43-45]. Intermediäre und späte Genprodukte sind Proteine für die Morphogenese und Assemblierung der Viren [46].

Ein entscheidender Punkt bei der Kontrolle der Genexpression ist die Transkriptionsinitiation, durch verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren werden zu definierten Zeitpunkten der Proteinbiosynthese hergestellt, um zu einem späteren Zeitpunkt bei der Initiation der Transkription früher, intermediärer oder später Gene mitzuwirken.

Transkriptionsfaktoren für intermediäre Gene werden als frühe Proteine synthetisiert und Transkriptionsfaktoren später Gene als intermediäre Proteine. Um die Transkription früher Gene zu initiieren, müssen die erforderlichen Transkriptionsfaktoren als späte Gene des vorherigen Zyklus

synthetisiert werden und anschließend mit in die neuen Virionen verpackt werden. Sie gelangen somit als fertiges Produkt bereits zu Beginn der Infektion in die Zelle und können sofort die Transkription früher Gene einleiten. Daher können bereits wenige Minuten nach Eintritt des Virus in die Zelle die ersten mRNAs synthetisiert werden [21]. Insgesamt zählen etwa 50 % aller viralen Proteine zu den frühen Genen [47]. Somit wird ein Großteil der mRNAs noch in dem verschlossenen Viruskern synthetisiert. Alle drei Genklassen werden von einer RNA-Polymerase transkribiert. Diese Polymerase ist äußerst komplex: sie besteht aus neun Untereinheiten und ist etwa 500 kD groß.

Die fertig transkribierten mRNAs werden durch porenähnliche Strukturen des Viruskerns mit ca. 7 nm Durchmesser [48] ATP-abhängig in das Cytoplasma entlassen [40, 49]. Die mRNAs akkumulieren an definierten, etwas entfernt liegenden Stellen in der Zelle.

Da die mRNAs des Virus von Wirtsribosomen umgeben sind, deutet diese darauf hin, dass sie translationskompetent sind [33].

Intermediäre und späte Transkription findet im Cytoplasma statt. Dadurch wird sichergestellt, dass die intermediäre und späte Transkription nicht vor Beginn der DNA-Replikation stattfinden. Bei Transkription intermediärer und später Gene spielen erstmals auch Proteine des Wirtes bei Initiation und Termination eine Rolle [21].

3.3. Charakterisierung des rekombinanten Vaccinia Virus GLV-1h68

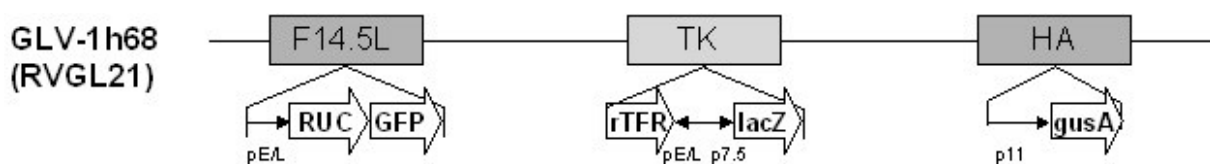


Abb.3.3. Vaccinia Virus GLV-1h68

In dieser Arbeit wurde mit einem attenuierten Vaccinia-Virus gearbeitet. Eine für diese Arbeit essentielle Modifikation des parental Virusstammes war das Einbringen von zwei unterschiedlichen Reportergenen, was die histologische Charakterisierung der viralen Infektion auf zwei unterschiedliche Methoden ermöglichte.

Die Detektion des Virus war zum einen mit Hilfe von Fluoreszenz durch das inserierte GFP (green fluorescent protein / grün fluoreszierendes Protein) und zum anderen durch die exprimierte *Renilla*-Luziferase mit der dadurch vermittelte Lumineszenz möglich.

Diese beiden Reportergene wurden als Fusionsprotein (*RUC-GFP*) unter Kontrolle des early/late Promotors in den F14.5L-Lokus inseriert, was eine Expression des Reportersystems sowohl zu frühen als auch zu späten Zeitpunkten der viralen Genexpression ermöglicht.

Begründen lässt sich dieses Einbringen eines doppelten Reportersystems dadurch, weil keines der beiden Reportersysteme in gleichem Maße allen Ansprüchen der Virusdetektion gerecht werden kann. Nur durch Kombination beider Reporter Gene ist ein Nachweis sowohl *in vivo* und *in vitro* optimal möglich.

Fluoreszierende Proteine haben den Vorteil, dass sie ein gutes Nachweissystem auf Zellkulturebene darstellen, indem sie eine Detektion und Quantifizierung auf zellulärer Ebene erlauben.

In vivo ist die Applikation von Fluoreszenz semi-quantitativ, weil Anregungs- und Emissionsspektren aufgrund der Absorption nur etwa 1-5 mm Gewebe durchdringen können.

Luziferasen sind dagegen ein ideales System, um eine Enzymaktivität in Echtzeit *in vivo* im intakten Organismus zu detektieren.

Durch Synthese eines multicistronischen Vektors, der beide Reportersysteme in einem Konstrukt vereinigt, ist es möglich, ein ideales Nachweissystem sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu generieren.

3.4. Krebspathologie

Krebserkrankungen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen weltweit [50]. Dabei ist Krebs ein Überbegriff für eine höchst diverse pathologische Erscheinung. Sowohl im Krankheitsbild, als auch in der Ursache ist eine Krebserkrankung äußerst vielfältig [51].

Insgesamt werden ungefähr 100 verschiedene Erkrankungsformen mit der Bezeichnung Krebs zusammengefasst. Die verschiedenen Formen einer Krebserkrankung wurden aber bedingt durch bestimmte pathologische Charakteristika in verschiedene Kategorien unterteilt.

Dabei werden Krebsarten, die in Haut oder Epithelien der Organe beginnen als Karzinome bezeichnet wohingegen Sarkome ihren Ursprung in Knochen, Knorpel, Blutgefäßen, Muskel oder Stütz- und Bindegewebe haben. Leukämien sind sämtliche Krebserkrankungen des blutbildenden Gewebes, zum Beispiel des Knochenmarks. Lymphome und Myelome sind Erkrankungen von Immunzellen.

Die grundlegende Veränderung, welche die Grundlage aller Krebserkrankung darstellt, ist eine genetische Veränderung einer Zelle, welche unkontrollierte Zellteilung zur Folge hat. Die Ursache wie es zu dieser Mutation kommt, kann wiederum sehr vielfältig sein.

Durch Karyotypisierungsstudien stellte sich jedoch in den letzten Jahren heraus, dass diese Mutationen bevorzugt in folgenden zwei Genloki erfolgen: innerhalb der Proto-Onkogene oder der Tumor-Suppressor-Gene. Durch Mutationen und dadurch verbundene vermehrte Aktivierung können Proto-Onkogene zu karzinogenen Onkogenen transformiert werden. Tumor-Suppressor-Gene dagegen tragen durch mutationsbedingte Inaktivierung zur Krebsentstehung bei, indem zum Beispiel wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus gestört werden.

Durch Anhäufung solcher Mutationen und durch Fehler in den DNA-Reparaturmechanismen kann es schließlich zu einer Krebserkrankung kommen.

Kanzerogene, welche diese Mutationen hervorrufen sind zum einen in unserer Umwelt zu finden. Dazu zählen chemische Verbindungen wie beispielsweise in Form von Zigarettenrauch, oder ionisierende Strahlung.

Zum anderen können auch körpereigene Fehlfunktionen zu solchen Mutationen führen. Dazu zählen beispielsweise hormonelle Schwankungen oder Fehlfunktionen des Immunsystems. Diese Fehlfunktionen können stressbedingt spontan auftreten, aber auch aus erblicher Vorbelastung resultieren. Weiterhin wurde beschrieben, dass auch chronische virale oder bakterielle Infektionen Auslöser einer Krebserkrankung sein können. Nachweislich sind virale Infektionen für etwa 12 % aller Krebsarten weltweit verantwortlich [52-53]. Dabei sind die häufigsten Viren, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen gebracht werden: Humanes Papillomavirus (HPV), Hepatitis-B und -C Virus, Epstein-Barr Virus sowie das humane T-lymphotrope Virus.

3.4.1. Das Tumormikromilieu

Histologische Studien solider Tumore ließen erkennen, dass es sich hierbei um ein äußerst heterogenes Gefüge verschiedenster zellulärer und nicht-zellulärer Komponenten handelt.

Neben dem eigentlichen Kompartiment der Tumorzellen besteht ein Tumor zu einem sehr wesentlichen Anteil aus konvektivem Gewebe, wie beispielsweise extrazellulärer Matrix, Blut- und Lymphgefäßsystem und den damit assoziierten zellulären Komponenten wie Endothelzellen, Fibroblasten oder Immunzellen, was in seiner Gesamtheit als Tumorstroma bezeichnet wird [54].

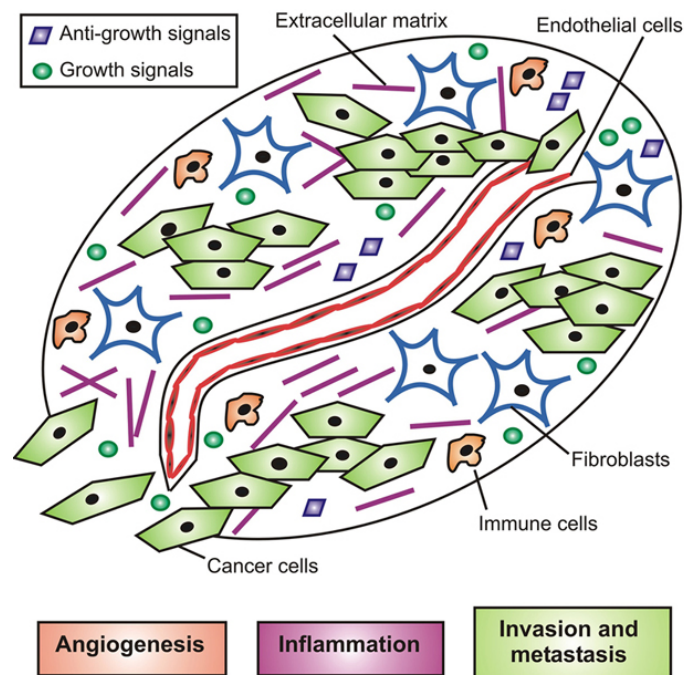


Abb. 3.4.2.: Tumormikromilieu (aus: [Nyberg et al.](#); Tumor microenvironment and angiogenesis)

Das Zusammenspiel der beiden Kompartimente Tumorzellen und Tumorstroma ist essentiell für Wachstum und Entwicklung eines Tumors. Nur bei einer ausreichenden Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen durch zuleitende Blutgefäße ist ein konstantes Wachstum möglich.

Die Evolution eines Tumors wird dabei durch Signalaustausch zwischen diesen beiden Kompartimenten gesteuert. Dabei findet die Kommunikation durch spezifisch sezernierte Cytokine oder Chemokine statt.

Vor allem die vom Tumorstroma sezernierten Signale sind äußerst wichtig, da diese zur phänotypischen Determinierung eines Tumors beitragen [55].

Jedoch auch Tumorzellen können durch Sekretion spezifischer Signale Einfluss auf die Tumorarchitektur nehmen, und dadurch als primäres Ziel ihre eigenen Wachstumsbedingungen optimieren. Ein Beispiel dafür ist Tumorangiogenese: durch Sekretion der Tumorzellen von VEGF

(*vascular endothelial growth factor*) und weiteren Wachstumsfaktoren ist die induzierte Reaktion des Stromas eine Neubildung von Gefäßen im Tumor [56].

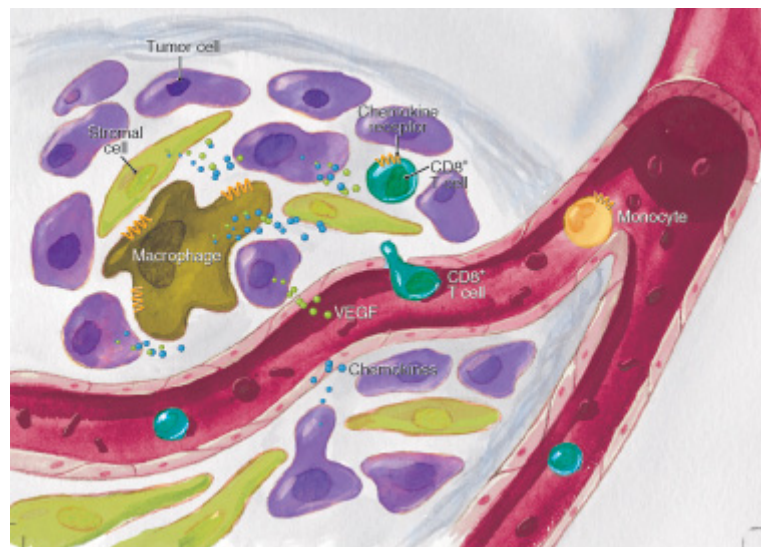


Abb. 3.4.2.: Tumorzellvermittelte VEGF Sekretion (aus: R&D systems: Cytokine Bulletin: Chemokines & Anti-tumor Immune Responses; 2005;)

Weiterhin wurde beobachtet, dass auch Immunzellen auf Grund spezifischer chemotaktischer Moleküle wie beispielsweise CCL2 (= MCP-1 / monocyte chemotactic protein-1) oder GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in das Tumorgewebe infiltrieren [57-58]. Genauere Untersuchungen führten zur Erkenntnis, dass Tumorgewebe neben der beobachteten Immunzellrekrutierung auch noch zahlreiche weitere Ähnlichkeiten mit einer chronischen Entzündung aufweist [59].

All diese vorläufigen Erkenntnisse hatten zur Folge, dass mit Hilfe präziser histologischer Studien ein besseres Verständnis über die Architektur und Kommunikation innerhalb eines Tumors erlangt werden sollte. Diesbezügliche Studien wurden unter dem Begriff „Charakterisierung des Tumormikromilieus (*tumor-microenvironment*)“ zusammengefasst.

Ein genaues Verständnis des Tumormikromilieus eröffnet vielfältige und vor allem zielgerichtete therapeutische Intervention und nimmt somit einen wichtigen Punkt der Tumorforschung ein.

3.4.2. Krebs und Inflammation

Wie bereits angedeutet, wurden zahlreiche Parallelen zwischen einer Entzündung und einem Tumor aufgedeckt. Erste Erkenntnisse darüber sammelte bereits im frühen 19. Jahrhundert Rudolf Virchow, der schon zum damaligen Zeitpunkt eine Präsenz von Leukozyten im Tumor beschrieb.

Genauere Untersuchungen deckten auf, dass dieses Immunzellinfiltrat sich äußerst heterogen gestaltet, und sich sowohl aus Zellen des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems

zusammensetzt, wobei aber der prozentuale Anteil der Zellpopulation des angeborenen Immunsystems überwiegt. Höchste Präsenz zeigen somit Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dentritische Zellen und Granulozyten [57] [60].

Entscheidende Parameter für die genaue Zusammensetzung des Immunzellinfiltrates scheinen zum einen das Organmikromilieu in dem der solide Tumor wächst, als auch das Stadium des Tumorwachstums zu sein.

Vergleicht man die klassische Wirkungsweise der Immunzellen bei einer Wundheilung mit ihrer Wirkungsweise innerhalb eines Tumors so werden fundamentale Unterschiede deutlich:

Bei einer Wundheilung helfen Immunzellen neue extrazelluläre Matrix zu generieren und geschädigte Zellen zu eliminieren [61]. Inflammation und induzierte Zellproliferation sind dabei ein lokaler und zeitlich limitierter Prozess, der nach Ausheilung einer Wunde komplett abgeschlossen ist.

Anders verhält es sich jedoch im Falle einer chronischen Entzündung. Hierbei kann das durch die aktivierten Immunzellen kreierte wachstumsfördernde Milieu eine maligne Entartung der Zellen fördern [57]. Beschrieben wurde dies beispielsweise für *Helicobacter pylori*- Infektion, welche eine Magenkreberkrankung zur Folge haben kann [62], oder auch für Infektionen mit dem *Humanen Papillomavirus* (HPV) [63] oder *Chlamydien*, welche als Spätfolge ein Zervixkarzinom mit sich bringen können. In all diesen Fällen versucht die Infektion also ein inflammatorisch geprägtes Milieu, dass bedingt durch mangelnde Terminierung eine Tumorentstehung und Tumorentwicklung begünstigt.

Diese Beobachtungen machten erste körperschädigende bis hin zu kanzerogene Aspekte des Immunsystems deutlich.

Eine wichtige Immunzellsubpopulation im Kontext Tumorentstehung und –entwicklung sind Makrophagen. Dabei unterscheidet sich die Funktion der Makrophagen im Tumor grundlegend von der im gesunden, nicht malignen Gewebe, und bei kaum einer weiteren Population wird der Unterschied zwischen unterschiedlicher Aktivierungsstadien hin zu Tumor-attackierenden oder konträr zu Tumor-fördernden Effekten stärker deutlich.

Im gesunden Organismus haben Makrophagen die Fähigkeit Tumorzellen als körperfremd zu klassifizieren und können diese nach Detektion lysieren. Diese Makrophagensubpopulation wird als M1-Makrophagen (klassisch aktivierte Makrophagen / anti-Tumor- Makrophagen) bezeichnet. Zudem haben diese nach der Lyse der Tumorzellen die Fähigkeit, selektiv spezifische Tumor-assoziierte-Antigene (TAAs) T-Zellen zu präsentieren und somit die adaptive Immunantwort zu aktivieren. Um diesen Effekt zu verstärken, haben diese Makrophagen die Fähigkeit immunstimulatorische Zytokine zu sezernieren und dadurch Proliferation und anti-Tumor-Wirkung der T- und NK-Zellen noch weiter zu verstärken.

Im Gegensatz dazu stehen die M2-Makrophagen (alternativ aktivierte Makrophagen / pro-Tumor Makrophagen). Diese M2 Makrophagen sind im Tumormikromilieu integriert und tragen positiv zum Wachstum und Metastasierung des Tumors bei.

Sowohl M1 als auch M2-Makrophagen stammen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle- den Monozyten- ab. Je nach umgebendem Zytokinstimulus kann ein Monozyt in eine der beiden Makrophagensubpopulationen ausdifferenzieren. Im Falle eines INF- γ -, LPS-, TNF oder GM-CSF-Stimulus erfolgt die klassische Differenzierung hin zu einem M1-Makrophagen. Erfolgt jedoch eine Stimulierung durch IL-4, IL-10 oder IL-13, einem Cytokinmikromilieu wie es beispielsweise innerhalb des Tumors vorherrscht, differenziert sich ein einwandernder Monozyt hin zu einem alternativ aktivierten M2-Makrophagen.

Eine alternative Bezeichnung für M2-Makrophagen lautet Tumor-assoziiertes Makrophage (TAM). Im Gegensatz zu M1-Makrophagen zeichnen sich diese nicht durch einen klar definierten Phänotypen aus, sondern es können große Unterschiede bedingt durch Tumorart oder Tumorkompartiment vorliegen [64]. Ihnen gemein ist jedoch eine enorm verminderte Antigen-präsentierende Eigenschaft. Die Art und Weise wie TAMs positiv auf das Tumorwachstum einwirken ist dabei sehr vielfältig. Zum einen sind TAMs in hoher Konzentration in Bereichen der aktiven Tumorzellinvasion lokalisiert. Durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen leisten sie Pionierarbeit in der Ausbreitung der malignen Zellen in das gesunde Gewebe [65].

Nach der Akkumulation neoplastischen Gewebes helfen TAMs weiterhin durch Produktion von pro-angiogenen Zytokinen, wie beispielsweise VEGF, TNF- α oder IL-8, die Vaskularisierung des neu gebildeten Tumorgewebes voranzutreiben. Unterstützend sekretieren TAMs Enzyme aus der Familie der Matrixmetalloproteasen, die durch eine Umstrukturierung (*remodelling*) des unvascularisierten Tumorgewebes, Blutgefäße unterstützen ihren Weg durch den Tumor zu bahnen.

In einem Effekt der positiven Rückkopplung sind TAMs auch bei der Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Milieus beteiligt, indem sie Zytokine wie beispielsweise TGF- β , IL-10 oder Prostaglandin E₂ sezernieren, und dadurch infiltrierende Monozyten gleich weiter zu M2-Makrophagen differenziert werden.

Diese zahlreichen Parallelen zwischen Tumor und Inflammation wurden von Dvorak *et al.* unter der Hypothese „Ein Tumor ist eine Wunde, die niemals verheilt.“ zusammengefasst.

Eben diese Erkenntnis, dass in Tumor und Wunde ähnliche Prozesse ablaufen und infiltrierte inaktive Immunzellen in einen aktivierten Zustand überführt werden können, ermöglicht zahlreiche neue Möglichkeiten der Tumorthherapie. Onkolytische Viren sind dabei nur ein Beispiel dafür. Diese haben die Fähigkeit durch die Infektion eines soliden Tumors der sich also im Zustand einer chronischen

Infektion befindet, in den Status einer akuten Infektion umzuwandeln, und somit eine Tumorregression einzuleiten.

3.4.3. Strategien der Krebstherapie

Zur Bekämpfung von Krebserkrankungen haben sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene Therapiekonzepte etabliert, die ihre Anwendung abgestimmt auf das jeweilige Krankheitsbild finden. Nach Diagnose eines soliden Primärtumors ist der erste Schritt zumeist die operative Entfernung. Dabei werden jedoch meist eventuell vorhandene Metastasen nicht entdeckt und können daher mittels operativer Techniken auch nicht entfernt werden [66].

Präventiv wird daher ein operativer Eingriff meist mit einer Radio- oder Chemotherapie kombiniert. Auch wenn diese beiden Therapiekonzepte die Möglichkeit bieten auch versteckt befindliche Metastasen zu erreichen, sind die Applikationen leider auch mit zahlreichen negativen Nebenwirkungen assoziiert. Bei einer Radiotherapie mit ionisierender Strahlung hat der Patient meist schon während der Behandlung mit Übelkeit, Müdigkeit und Haarausfall zu kämpfen, und längerfristig kann eine Radiotherapie sogar eine Neubildung von Tumorgewebe begünstigen.

Ähnlich verhält es sich mit den Chemotherapeutika. Allen Derivaten ist die Eigenschaft eines Zytostatikums gemein, welche ihren Wirkungsschwerpunkt auf schnell proliferierenden Zellen haben. Jedoch ist eine hohe Teilungsaktivität nicht eine Eigenschaft, die ausschließlich auf Tumorgewebe zutrifft, sondern auch auf einige Subpopulationen des Immunsystems. Daher sind auch hier zahlreiche Nebenwirkungen beobachtet worden. Beispielsweise das in dieser Arbeit angewandte Cyclophosphamid zeigte in klinischer Anwendung positive Ergebnisse bezüglich des Tumorarrests, hatte aber zeitgleich Übelkeit, Blasenentzündungen und eine reduzierte Leukozytenbildung zur Folge. Die Optimierung hin zu einer zielgerichteten Chemotherapie, mit geringerer Schädigung gesunden Gewebes war daher in den letzten Jahren Ziel intensiver Studien.

Erfolg versprechende Ergebnisse haben in letzter Zeit auch Immuntherapien gezeigt, welche durch den Einsatz von Cytokinen, Antikörpern oder Vakzinen das eigene Immunsystem des Patienten stimulieren soll, selbst zielgerichtet gegen die malignen Zellen vorzugehen.

Ein weiterer Therapieansatz versucht die Tumorarchitektur maßgeblich zu beeinflussen. In diesem Gebiet leisteten Folkman *et al.* in ihren Studien die Tumorangionese zu inhibieren Pionierarbeit [67]. So war Bevacizumab das erste klinische Tumortheraeutikum, welches als monoklonaler Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor), als Ziel hatte eine Gefäßneubildung im Tumor zu verhindern, und somit den Tumor von einer Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abzuschneiden.

Ein neuer äußerst vielversprechender Therapieansatz sind nun onkolytische Viren, die neben einer Anwendung des parentalen Stammes auch schon teilweise mit Hilfe biotechnologischer

Methoden weiter modifiziert wurden. Diese Modifikationen versuchen beispielsweise klassische Therapiekonzepte mit den positiven Effekten der onkolytischen Viren zu kombinieren. So konnte beispielsweise Frentzen *et al.* [68] zeigen, dass eine Injektion von Vaccinia-Virus, welches genomisch modifiziert wurde einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF zu exprimieren bessere tumortherapeutische Effekte zeigte (bis hin zur totalen Tumorregression) als eine Applikation von Avastin (klinisch verwendeter monoklonaler Antikörper gegen VEGF) allein.

3.5. Angewandte Tumormodelle

3.5.1. Die humane Brustkrebszelllinie GI-101A

Bei GI-101A-Zellen handelt es sich um eine 1993 von Hurst *et al.* isolierte und charakterisierte humane Brustkrebszelllinie. Die Zellen entstammen einem humanen Brustkrebsepithel, das aus einem infiltrierenden Brustkarzinom gewonnen wurde.

Es ist möglich, diese humanen Zellen dem Modellorganismus Maus zu implantieren. In der vorliegenden Arbeit wurden GI-101A-Zellen athymischen Nacktmäusen subkutan implantiert. Nach sechs bis acht Wochen entsteht ein Primärtumor an der Stelle der Implantation. Nach zehn bis zwölf Wochen lassen sich bereits Metastasen in Lunge und Lymphknoten nachweisen. Die Zelllinie ist somit in Mensch und Maus tumorös und metastasierend [69].

Das Wachstum von Brusttumoren ist oft eng mit dem Verlust der Östrogenabhängigkeit assoziiert. Der Östrogenrezeptor ist in die normale Proliferation der Brustzellen involviert. Er wird im Epithel der Brustgänge exprimiert und reagiert auf zirkulierendes Östrogen [70]. Ungefähr 70 % der Brusttumore sind noch Östrogenrezeptor-positiv (ER+; estrogen receptor+). Im Verlauf der Tumorprogression verlieren jedoch die meisten Tumore ihre Östrogenabhängigkeit durch den kompletten Verlust der Östrogenrezeptorgenexpression (ER-). Das Östrogen-unabhängige Wachstum führt letztendlich auch zur metastasierenden Verbreitung der Krankheit.

In dieser Hinsicht weisen GI-101A-Zellen eine Besonderheit auf, denn sie exprimieren weiterhin den Östrogenrezeptor und das Wachstum der Zellen ist auch *in vitro* noch hormonabhängig [69], was bedeutet, dass dem Kulturmedium Östrogen zugesetzt werden muss.

3.5.2. Die humanen Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL

Ein Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor der Pigmentzellen (Melanozyten). Er neigt dazu frühzeitig sowohl über Blutbahnen, als auch über das Lymphsystem zu metastasieren und ist daher die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrankheit mit weltweit stark steigender Anzahl an Neuerkrankungen.

Bei 888-MEL und 1936-MEL handelt es sich um ein autologes Tumormodell, denn diese beiden Melanomzelllinien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs aus einem einzelnen Patienten (Patient 888) aus metastatischem Tumorgewebe isoliert.

Das erste Melanom wurde im Dezember 1988 festgestellt und sofort operativ entfernt. Dabei konnte aber bereits festgestellt werden, dass das Melanom bereits zwei Lymphknoten kolonisiert hatte und somit eine Metastasierung höchst wahrscheinlich war. Somit war es wenig erstaunlich, als im Frühling 1989 Metastasen detektiert wurden. Aus dieser Melanommetastase wurde eine Biopsie entnommen und die erste Zelllinie 888-MEL generiert. Als therapeutische Intervention entschied man sich für eine Immuntherapie, wobei der Patientin TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*) injiziert wurden, welche die körpereigene Immunantwort aktiv gegen definierte MAGEs (*melanoma antigen-encoding gene*) richten sollte. Der Therapieansatz war erfolgreich, denn bei der Patientin konnte eine komplette Regression aller Metastasen festgestellt werden.

Im Oktober 1992 wurden aber erneut Metastasen entdeckt und erneut wurde die Methode der TIL-vermittelten Immuntherapie angewandt. Aus dieser Metastase konnte eine weitere Zelllinie (1290-MEL) generiert werden. Auch dieses Mal konnte die Patientin komplett geheilt werden.

Im Lauf der kommenden neun Jahre erfuhr diese Patientin noch drei weitere Ausbrüche nach einer vermeintlichen Heilung, bevor sie bedingt durch den letzten Krankheitsausbruch 2001 verstarb.

Bei jedem erneuten Auftreten wurden Biopsien aus dem Tumor entnommen und daraus Zelllinien generiert.

Table 1. Time and site of biopsies in patient 888

Cell line name	Date of biopsy	Source
Not done	December 1988	Primary melanoma, right arm
888-MEL	21 June 1989	Subcutaneous, soft palate
1290-MEL p14	6 October 1992'	Uterine metastasis
1290-MEL p54	6 October 1992	Uterine metastasis
1858-MEL a (Fragment)	30 September 2000	Subcutaneous, R flank
1858-MEL b (Medimachine)	30 September 2000	Subcutaneous, R flank
1858-MEL c (Wash)	30 September 2000	Subcutaneous, R flank
1936-MEL (Medimachine)	13 June 2001	Subcutaneous, R chest wall
1962-MEL	28 August 2001	Subcutaneous, R breast

R flank=right flank.

Abb. 3.5.2.: Krankheitsverlauf der Patientin 888 (aus Sabbatino *et al.*)

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den beiden Zelllinien 888-MEL und 1936-MEL gearbeitet. Diese beide Zelllinien waren von großem Interesse, da bedingt durch den therapeutischen Index bezüglich

GLV-1h68 Virotherapie 888-MEL als respondierend (Therapeutischen Index: 88.0) und 1936-MEL als geringfügig-respondierend eingestuft werden konnte (Therapeutischer Index: 13.7).

Somit bildet dieses Zelllinienpaar eine optimale Grundlage, um die virale Kolonisierung in der Frühphase der Infektion zu studieren und im Besonderen Tumorzellen und notwendige stromale Komponenten für eine erfolgreiche Vaccinia-Virus Infektion zu untersuchen.

Um ein besseres genetisches Verständnis der verschiedenen isolierten Tumorzelllinien zu erhalten wurden in einem ersten Schritt durch Sabbatino *et al.* Karyotypisierungsstudien aller fünf Zelllinien durchgeführt [71].

Eine Gemeinsamkeit die all diesen Zelllinien gemein ist, ist eine Mutation des β -Catenin-Gens und eine unbalancierte Methylierung des Androgenrezeptor.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass allen Zelllinien-obwohl sie einen unterschiedlichen Phänotyp aufwiesen-ein gemeinsamer konstanter genetischer Kern gemein war, und dass die Theorie der Krebs –Stammzelle von der ausgehend alle späteren Metastasen abstammen auf dieses Modell höchstwahrscheinlich zutraf. Es war somit also unwahrscheinlich, dass sich jede erneute metastatische Neubildung aus der vorherigen ergab sondern dass alle Metastasen aus demselben Primärtumortumor entstammten.

Table 2. Detailed karyotype analysis of close to diploid cell lines

Id (ploidy)	m	Karyotype	Marker chromosomes	
888-MEL (16/25)	1	47, XX, -10, -11, dup (12q), -14, -16, -18, -19, +20, +mar (6)	3p, 3q, 7q, 10, 14, 17	
	2	47, XX, -10, -11, dup (12q), -14, -16, -18, +20, +mar (5)	3p, 3q, 7q, 10, 17	
	3	47, XX, -10, -11, dup (12q), -14, -16, -18, -19, +20, +mar (6)	3, 7q, 10, 14, 16, 17	
	4	47, XX, -10, -11, dup (12q), -14, -16, -18, -19, +20, +mar (6)	3p, 3q, 7q, 10, 14, 17	
	5	48, XX, +1, -10, -11, -12, -14, -16, mar (6)	3p, 7, 10, 14, 17	
1290-MEL (6/24)	1	47, XX, de (1), del (6), del (9p), -10, -11, -16, -17, iso (17q), -18, +mar (6)	3p, 7, 12q, 17	
	2	44, XX, -10, -12, -14, -15, -16, -17, iso 17q, -18, +mar (4)	3p	
	3	45, XX, -8, -9, -10, -11, -14, -15, -16, -17, iso (17q), +mar (7)	3p, 7	
	4	48, XX, -3, cfb (5q), -6, -9, -11, -16, -17, iso (17q), -18, +19, +20, +mar (6)	ins (2), 3, 7, 12	
	5	47, XX, del (6), -9p, -10, -11, -16, -17, iso (17q), -18, +19, +21, +mar (5)	3, 7,	
	6	47, XX, -9, -11, -16, -17, iso (17q), -18, +19, +mar (4)	7	
	8	46, XX, -3, -6, -10, -11, -13, -15, -16, -17, iso (17q), -18, +mar (7)	3, 6p, 7, rob (13;15)	
	10	47, XX, -6, -9, -10, -11, -13, -17, -18 +mar (7)	3p, 6, 7, 13, 17	
	11	42, XX, -5, cfb (6p), -9, del (10p), -11, -12, -14, -16, cfb (16q), -17, -18,	7, 11, 12, 14, 17	
	12	46, XX, -6, -10, -11, -14, -16, -17, iso (17q), -18, +mar (6)	6, 7, 10, 11,	
	13	46, XX, +4, -6, del (9p), -10, -11, -14, -16, -17, -18, +mar (6)	3p, 6, 7, 11, 17	
	14	45, XX, -6, del (9p), -10, -11, -14, -16, -17, -18, +mar (6)	6, 7, 11, 17	
	1858-MEL (2/18)	1	46, X, -14, -16, -17, -18, +20, -X, +mar (5)	3p, 10, 17, X
		2	48, X, cfb (1), +2, -7, del (9p), del (10p), -14, -16, -17, -X, +mar (6)	3p, 7, 17
3		46, X, cfb (p), -7, del (9p), del (10p), -14, -16, -17, -18, -X, +mar (6)	3p, 7, 17, X	
4		46, X, del (2), -7, del (9p), del (10p), -16, -17, -18, -X, +mar (5)	3p, 7, 17, X	
5		45, XX, cfb (1p), -6, -7, -8, del (9p), del (10), cfb (14q), -15, -16, -17, -18, +21 +mar (5)	3p, 6, 7	
6		46, X, -8, del (9p), del (10), -14, -16, -17, -18, +mar (6)	3p, 7, 17, X	
7		46, X, -8, -10, cfb (12q), -14, -16, -17, -18, del (21), -X, +mar (7)	3p, 17, X	
8		46, X, -2, -3, del (9p), del (10p), -16, -17, -18, -21 -X, +mar (7)	3p, 7, 17, X	
9		45, X, -8, del (9p), del (10p), -14, -16, -17, -18, +20, -22, -X, +mar (5)	3p, 7, 17, X	
10		47, X, -8, del (9p), del (10p), -12, -14, -16, -17, -X, +mar (7)	3p, 7, 17, X	
11		48, XX, -7, -8, del (9p), -10, del (13q), -14, -16, -17, -18, +20, +mar (8)	3p, 7, 14, 17	
12		46, X, +3, -8, del (9p), del (10p), -17, -18, -X	17, X	
13		45, X, -8, del (9p), del (10p), -14, -16, -17, -18, -X, +mar (5)	3, 7, 8, 17, X	
1936-MEL (10/12)		Not done (most metaphases either triploid or tetraploid)		
1962-MEL (9/25)	1	44, X, -8, -9, -14, -16, -17, 18, -20, -X, +mar (6)	7, 17, X	
	2	46, XX, +5, -10, -11, -16, -17, -18, +mar (4)		
	3	48, X, +2, -9, -10, -14, -16, -17, -20, -X, +mar (8)	3p, 10, 17, X	
	4	45, X, -4, -9, -11, -14, -16, -17, -18, del (X), -X, +mar (7)	3p, 7, 17, X	
	5	46, X, +1, -9, -10, -14, -16, -17, -18, -X, +mar (6)	3p, 7, 10, 17	
	6	47, X, +2, -9, del (10p), -14, -16, -17, -18, -X, +mar (6)	3p, 7, 14, 17, X	

Abb. 3.5.2.:Karyotypisierungsstudien der aus Patientin 888 gewonnenen Zelllinien (aus Sabbatino *et al.*)

Auch diese beiden Zelllinien konnten nach Implantation bei athymischen Nacktmäusen solide Tumore ausbilden. Da diese Melanomzellen äußerst schnell proliferieren waren an der Stelle der Tumorzellimplantation nach nur drei Wochen Primärtumor von etwa 200 mm³ zu erkennen. Somit sind auch diese beiden Zelllinien in Mensch und Maus tumorös.

3.6 Aufgabenstellung

Obwohl in zahlreichen Studien bereits vielversprechende Ergebnisse onkolytischer Virotherapie beschrieben wurden, sind grundlegende Mechanismen der viral vermittelten Onkolyse immer noch nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, ein generelles Verständnis der Wirkungsweise des onkolytischen Vaccinia-Virus GLV-1h68 zu erlangen.

In einem ersten Aspekt dieser Arbeit sollten Tumorzell- und/oder stromale Komponenten, die für eine erfolgreiche GLV-1h68-Infektion eines soliden Tumors essentiell sind, bestimmt werden.

Hierfür sollte mit einem autologen Tumormodell gearbeitet werden, wobei die beiden verwendeten Zelllinien aus einem Patienten entstammen, aber eine unterschiedliche Reaktion auf GLV-1h68-Infektion zeigen. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, unabhängig von Organ- oder Spezies-spezifischen Eigenschaften, notwendige Komponenten und Bedingungen der Tumormikroumgebung für eine erfolgreiche GLV-1h68-Infektion zu charakterisieren.

Für diese Charakterisierung sollte, neben mikroskopischen Techniken, die Methode der RNA-Microarray-Analyse angewandt werden, um Einblicke auf translationeller Ebene zu erhalten. Durch Immunzelldepletion vor Virusapplikation sollte die Rolle des Immunzellinfiltrates in der Tumormikroumgebung für die Effizienz der folgenden Virusinfektion charakterisiert werden.

Als ein zweiter Aspekt sollte auch die späte Phase einer GLV-1h68-Infektion histologisch charakterisiert werden, um Beiträge von viraler Zerstörung der Tumervaskulatur, antitumorale Immunreaktion und Onkolyse bei der Tumorrogression zu untersuchen. Dies sollte durch histologische Charakterisierung mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen definierter Tumorkompartimente erzielt werden. Als Tumormodell sollten hierfür humane Brustkarzinomzellen verwendet werden.

Durch ein besseres Verständnis des Ausmaßes, in dem GLV-1h68 sowohl zu frühen, als auch zu späten Zeitpunkten der Infektion in die Tumormikroumgebung eingreift, sollten Beiträge für eine zielgerichtete Applikation von Vaccinia-Viren als Tumorthapeutikum in klinischen Studien geleistet werden.

4 Materialien

4.1 verwendete Chemikalien und Enzyme

Materialien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Beetle-Luziferin (Potassium Salt)	Promega, Mannheim
Benzonase	Merck, Darmstadt
biotinyliertes- <i>Lycopersicum esculentum</i> Lektin	Vector Laboratories Burlingame, CA
Borsäure (H ₃ BO ₄)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
1x BSS	PAA, A-Pasching
Carboxymethylcellulose	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Camptothecin	Sigma, Steinheim
Coelenterazin	Sigma, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
p-Cumarsäure	Sigma, Steinheim
Crystal violet	Sigma, Steinheim
Cyclophosphamid Monohydrate	Sigma, Steinheim
DAPI (6-Diamin-2`-phenylindol-dihydrochlorid)	Roth, Karlsruhe
DEPC-behandeltes Wasser	Fluka, CH-Buchs
Dimethylformamid	Fluka, CH-Buchs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAA, A-Pasching
50 bp DNA-Marker	New England Biolabs, US- Ipswich
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas, St.Leon-Rot
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol 96 %	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Ethanol p.a.	Riedel deHaen, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	Sigma, Steinheim
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, A-Pasching
Glucose	Sigma, Steinheim
Glutamax	Invitrogen, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	PAA, A-Pasching
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma, Steinheim
Luminol	Amersham, Freiburg
Low Melt Agarose	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Matrigel Matrix (growth factor reduced)	BD Biosciences, Heidelberg
Medium 199 mit Earl`s Salzen	GIBCO®Invitrogen; Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]	Fluka, CH-Buchs
Natrium-EDTA (Na ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA (Na ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma, Steinheim
Nonidet P-40 (Igepal)	Sigma, Steinheim
Orthophosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Östradiol	Sigma, Steinheim
Paraformaldehyd	Applichem, Darmstadt

1x PBS	PAA, A-Pasching
Penicillin/Streptomycin	PAA, A-Pasching
Poly-L-Lysin	Sigma, Steinheim
Ponceau S	Sigma, Steinheim
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Progesteron	Sigma, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching
Taq DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
10x Taq-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, CH-Buchs
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Fluka, CH-Buchs
Trypsin-EDTA	PAA, A-Pasching
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma, Steinheim

Lösungen für Immunfluoreszenz:

- Blockier-Lösung: 0,3 % Triton X-100
5 % (v/v) hi FBS
- Glycerin-Lösung: 60 % Glycerin (v/v)
ad 1 x PBS
- LMP-Agarose: 5 % (w/v) LMP-Agarose
ad 1 x PBS
- Mounting-Medium: 80 % (v/v) Glycerin
ad 1 x PBS
- Paraformaldehyd: →4 g PFA in warmem H₂O_{bidest.} lösen
→NaOH zugeben, bis Lösung klar ist
→mit HCl pH 7,4 einstellen
→10 ml 10x PBS zugeben
→mit H₂O_{bidest.} auf 100 ml auffüllen
- 10x PBS: 81,8 g NaCl
2 g KCl
29 g Na₂HPO₄-12 H₂O
2 g KH₂PO₄
ad 1 l H₂O bidest

Lysepuffer zur Proteinisierung aus Zellen:

- 2x Stocklösung: 300 mM NaCl
2 mM EDTA
20 mM Hepes
pH 7,4
- für 20 ml Protein-Lysepuffer: 10 ml Stocklösung
10 ml H₂O_{bd}
0,1M DTT
100 µl Igepal (10%ig)
eine Complete Mini Proteasen-Inhibitorentablette

<u>Lysepuffer zur Proteinisolierung aus Tumoren:</u>	50 mM	Tris-HCl
	2 mM	EDTA
	2 mM	PMSF
	Complete Mini Protease-Inhibitoren-Tablette (1 Tablette auf 10 ml Lysepuffer)	
	pH 7,4	
<u>5x Probenpuffer für DNA:</u>	50 %	TE-Puffer
	50 %	Glycerin
	0,04 %	Xylencyanol
	0,04 %	Bromphenolblau
<u>PBS++:</u>	1x PBS	
	2,5 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
<u>1x SDS-Probenpuffer für Proteine:</u>	200 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	5 % (v/v)	SDS
	1 mM	Na ₂ EDTA
	8 M	Harnstoff
	0,1 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
	0,2 %	Bromphenolblau
<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	440 mM	Tris-HCl
	2 M	Glycin
	1,5 %	(w/v) SDS
	pH 8,3	
<u>TBE-Puffer:</u>	890 mM	Tris
	890 mM	H ₃ BO ₄
	25 mM	Na ₂ EDTA
	pH 8,2	

<u>10x TBT:</u>	1,5 M	NaCl
	60 mM	Tris-Base
	190 mM	Tris-HCl
	20 %	Tween 20
<u>TE-Puffer (10/1):</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
<u>1x Towbin-Puffer:</u>	0,025 M	Tris-Base
	0,192 M	Glycin
	20 %	MeOH
	pH 8,3	

4.3 verwendete Kits

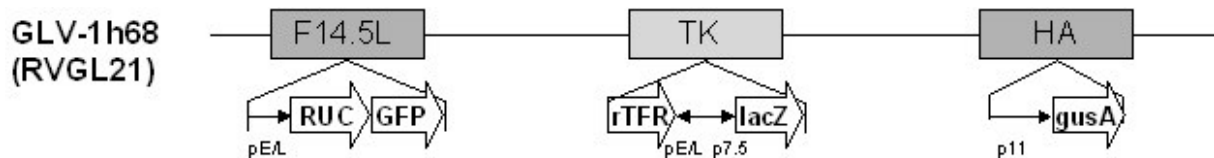
DNA-free™ Kit	Ambion, UK-Cambridgeshire
miRNeasy® MiniKit	Qiagen, Hilden
QIA® shredder	Qiagen, Hilden
Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St.Leon
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin

4.4 Synthetische Oligonucleotide

GFP fwd:	5'- GCG TGC AGT GCT TTT CCA G -3'
GFP rev:	5'- AGG GCA GAC TGG GTG GAC -3'

4.5 Rekombinantes Viruskonstrukt GLV-1h68

Zur histologischen Charakterisierung Vaccinia Virus-infizierter Tumore wurde das rekombinante Vaccinia Virus Genelux Virus-1h68 (GLV-1h68) verwendet, welches bereits in vorangegangenen *in vivo* und *in vitro* Studien charakterisiert wurde[72].



GLV-1h68 trägt im Genort F 14.5 L ein Fusionsgen aus *Renilla*-Luziferase (RUC) und grün fluoreszierendem Protein (GFP) hinter einem early/late-Promotor (pE/L). Der Thymidinkinase-Lokus (TK) wurde durch Insertion des nicht exprimierten reversen Transferrin-Rezeptor-Gen (rTFR) sowie des Markergens β -Galaktosidase (*lacZ*), welches von dem Promotor p7.5 kontrolliert wird, ersetzt. Ein weiteres Markergen, das für die β -Glucuronidase (GusA) codiert, ist unter der Kontrolle des viralen Promotors p11 im HA-Lokus (Hämagglutinin-Gen) lokalisiert.

Alle rekombinanten Viren wurden von Dr. Q. Zhang und Dr. N. Chen, Genelux Corp., San Diego, USA, konstruiert und zu Analysezwecken zur Verfügung gestellt.

4.6 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller
anti-Maus	Ziege	Acris, Hiddenhausen
anti-Kaninchen	Ziege	Sigma, Steinheim
anti-Ziege/Schaf	Maus	Sigma, Steinheim
monoklonaler anti-Maus CD31	Ratte	BD PharMingen; San Diego; CA; USA
monoklonaler anti-Maus CD31	Hamster	Chemicon International; Temecula; CA; USA
polyklonaler anti-Maus Kollagen-IV	Hase	Abcam; Cambridge; UK
monoklonaler anti-Maus MHCII	Ratte	eBioscience, San Diego; CA; USA
monoklonaler anti Maus CD45	Ratte	eBioscience, San Diego; CA; USA
monoklonaler anti-Maus α -smooth muscle actin (SMA) cy3-konjugiert	Maus	Sigma, Steinheim
Phalloidin-TRITC		Sigma, Steinheim
Hoechst 33342		Sigma, Steinheim
unspezifisches Ratten IgG	Ratte	Jackson ImmunoResearch; PA; USA

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Quelle	Hersteller
anti-Kaninchen (IgG) Cy3- konjugiert	Esel	Jackson ImmunoResearch; PA; USA
anti-Ratte (IgG) Cy3- konjugiert	Esel	Jackson ImmunoResearch; PA; USA
anti-Ziege (IgG), Cy3-konjugiert	Esel	Jackson ImmunoResearch; PA; USA
anti-Streptavidin Cy3-konjugiert		Sigma, Steinheim
anti-Hamster (IgG) Cy5- konjugiert	Esel	Jackson ImmunoResearch; PA; USA

4.7 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien

4.7.1 Zelllinien

- bEnd 3-Zellen:** adhärent wachsende murine Endothelzellen isoliert aus dem cerebralen Cortex (BALB/c), (G.Hämmerling; Deutsches Krebsforschungszentrum; Heidelberg)
- CV-1-Zellen:** adhärent wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*)
- GI-101A-Zellen:** adhärent wachsende humane Brustdrüsen Adenokarzinomzellen
- 2H11-Zellen:** adhärent wachsende murine Endothelzellen; isoliert aus dem vaskulären Epithel eines soliden Tumors (C3H/HeJ); transformiert mit SV40 (Papovavirus); (ATCC:CRL-2163)
- HT-29-CBG:** adhärent wachsende humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie mit inserierter click-beetle green Luciferase (CBG), gewonnen aus der Ursprungszelllinie HT-29
- HUVEC-Zellen:** adhärent wachsende humane Endothelzellen gewonnen aus der humanen Nabelschnur (HUVEC = human umbilical vein endothelial cells); erworben bei PromoCell; Heidelberg (C-12200); (ATCC: CRL-1730)
- J774A.1-Zellen:** adhärent wachsende murine Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie; isoliert aus Aszitesflüssigkeit (BALB/cN); (ATCC: TIB 67)
- 888-MEL-Zellen:** adhärent wachsende humane Melanomzellen; isoliert aus Patienten 888 (Extraktion Juni 1989) (zur Verfügung gestellt von Dr. F.Marincola; National Institutes of Health; Bethesda; USA)

1936-MEL-Zellen: adhärent wachsende humane Melanomzellen; isoliert aus Patienten 888 (Extraktion Juni 2001)
(zur Verfügung gestellt von Dr. F.Marincola; National Institutes of Health; Bethesda; USA)

4.7.2 Zellkulturmedien

<u>bEnd 3-Zellen:</u>	500 ml	DMEM
	50 ml	hi FKS
	6 ml	Glucose
<u>CV-1-Zellkulturmedium:</u>	500 ml	DMEM
	50 ml	hi FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
<u>GI-101A-Zellkulturmedium:</u>	500 ml	RPMI 1640
	100 ml	hi FKS
	6 ml	Glucose
	6 ml	HEPES
	6 ml	Natriumpyruvat
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	300 µl	BE2 (Östradiol/Progesteron)
<u>2H11-Zellen:</u>	500 ml	DMEM
	50 ml	hi FKS
	6 ml	Glucose
<u>HT-29-CBG:</u>	500 ml	RPMI 1640
	14,67 ml	Natrium-Bicarbonat
	50 ml	FKS
	1 ‰	Blastizidin (immer frisch den Zellen zugegeben; alle 2-3 Tag erneuert)

<u>HUVEC-Zellen:</u>	500 ml	Medium M199 mit Earl's Salzen
	100 ml	hi FKS
	6 ml	Natriumpyruvat
	6 ml	HEPES
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
<u>J774A.1-Zellen:</u>	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	hi FKS
<u>888-MEL / 1936-MEL:</u>	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	hi FKS
	5 ml	Glutamax

4.8 Geräte und sonstige Materialien

Anästhesie-Anlage	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
DNA-Gelelektrophorese-Kammer	BioRad, München
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
FastPrep TM FP120	Bio101, Thermo
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filmkassette	Dr.Goos Suprema, Heidelberg
Filterspitzen	Hartenstein, Würzburg
Flow-Hood LaminAir	Kendro, Langenselbold
Glaswaren	Schott, VWR Brand
Geldokumentation	PeqLab, Erlangen
Infrarot-Lampe	Petra, Burgau
Korsolex Plus	Borde Chemie
Kanülen	Braun, CH-Emmenbrücke
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Lysing Matrix D Tubes	MP Biomedicals, Heidelberg
Mikroskope	
<ul style="list-style-type: none"> • Axiovert 200M • DMIRB • Leica MZ 16 FA • Leica TCS SP2 	<p>Zeiss, Göttingen</p> <p>Leica, Wetzlar</p> <p>Leica, Wetzlar</p> <p>Leica, Wetzlar</p>
Messröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulose Transfer-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
NightOWL LB 981 imaging system	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Objekträger und Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg
Sekundenkleber	Pattex
Parafilm	Hartenstein, Würzburg
PCR Biometra	Schleicher & Schuell, Dassel
Rasierklagen	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Real-time PCR (MJ Research)	BioRad, München

Real-time-PCR-strips	Abgene
Reagenzgefäße: 0,5; 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße: 15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilme	Konica, München
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Schredder Fastprep	Thermo Scientific, Karlsruhe
Semi-Dry Blotapparatur	PeqLab, Erlangen
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann Coulter, Krefeld
Vibratom VT1000S	Leica, Wetzlar
Vortex	Labinco, NE-Breda
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturinkubatoren	RS Biotech, UK-Irvine
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg

4.9 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in dieser Arbeit athymische Nacktmäuse verwendet (HSD: Atthymic Nude-*Foxn1nu* NU/NU; Harlan Winkelmann, Borcheln). Diese Tiere besitzen keinen Thymus und sind nicht in der Lage T-Zellen zu generieren. Somit besitzen sie kein adaptives Immunsystem. Als einzige Lymphozytenpopulation treten B-Zellen auf.

Alle Versuchstiere wurden als Gruppen in separierten, sterilen Käfigen mit steriler Einstreu und bestrahltem Nagerfutter nach den Richtlinien der Regierung von Unterfranken Spezies- und Stammgerecht gehalten.

4.10 Software

- Adobe Photoshop 7.0 für Bildbearbeitung
- Axiovision 4.5 für Bildaufnahme (inverses Mikroskop, Zeiss)
- NIH ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) für Bildanalyse
- Magellan 5 für ELISA-Reader
- Metamorph Imaging für Bildaufnahme (inverses Mikroskop, Leica)
- Microsoft Word 2008 für Textverarbeitung
- Microsoft Excel 2008 für Diagramme und Statistik
- Leica IM1000 4.0 für Bildaufnahme (Stereomikroskop, Leica)
- Leica Confocal 2.16 für Bildaufnahme (konfokales Mikroskop, Leica)
- Cerious Thumbs Plus 6.0 für Bildbearbeitung
- WinLight für Biolumineszenz-Imaging

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzellen

Bei der Arbeit in der Zellkultur ist es sehr wichtig, dass unter sterilen Bedingungen gearbeitet wird. Um dies sicherzustellen, werden alle Arbeiten unter der Flow-Hood (LaminAir, Kendro) durchgeführt und alle Gebrauchsgegenstände und Lösungen vor Benutzung autoklaviert. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wird den Kulturmedien zusätzlich Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Zellen werden in sensorgesteuerten Inkubatoren inkubiert, die die exogenen Parameter (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) aufrechterhalten, wodurch ein optimales Wachstum der Zellen ermöglicht wird.

Der Boden der Zellkulturflaschen und -schalen besitzt eine spezielle Oberflächenbeschichtung. Durch diese Beschichtung können sich die Zellen mit ihren extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen an den Boden der Zellkulturflasche anheften.

Teilung und Wachstum sind in diesen Zellkulturflaschen jedoch nicht unbegrenzt möglich. Vor Erreichen von 100 % Konfluenz sollten die Zellen passagiert werden, damit es nicht zur Ausbildung einer Bi- bzw. Multilayer kommt.

Während des Wachstums der Zellen muss die Nährstoffzufuhr sichergestellt sein. Dabei ist zu beachten, dass im Laufe von 2-3 Tagen die Inhaltsstoffe verbraucht werden und sich Stoffwechselprodukte der Zellen und zum Teil auch tote Zellen im Überstand anreichern. Um den fortschreitenden Verbrauch der Nährstoffe im Medium kontrollieren zu können, ist im Medium ein pH-Indikator enthalten, der durch Farbumschlag von rot nach gelb den Verbrauch anzeigt.

Kulturmedium und Waschpuffer sollten vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden, um eine schonende Behandlung der Zellen zu gewährleisten.

Beim Passagieren von Zellen wird zunächst das Medium abgenommen. Die Zellen werden mit Hank's BSS gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer sowie Mediumreste zu entfernen. Anschließend werden die Zellen für ca. 5 min mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen. Trypsin ist eine Endopeptidase, die spezifisch nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein die Peptidbindung spaltet. Durch kräftiges Klopfen an das Kulturgefäß kann das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden unterstützt werden. Die Proteolyse wird durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt, denn dieses enthält die Trypsin-Inhibitoren Calcium und Magnesium. Nach Zugabe des Mediums werden durch Auf- und Abpipettieren zusammenhängende Zellen voneinander getrennt, um eine einheitliche Zellsuspension zu erhalten. Je nach Bedarf wird diese Zellsuspension in einem bestimmten Verhältnis in ein neues Kulturgefäß mit Medium ausgesät.

5.1.1.1 Kultivierung von CV-1-Zellen

Bei CV-1-Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze. Da CV-1-Zellen sehr stoffwechselaktiv sind, werden sie alle drei bis vier Tage passagiert.

5.1.1.2 Kultivierung von GI-101A-Zellen

GI-101A wurden aus einem humanen Brustadenokarzinom isoliert. Bei dem Passagieren der Zellen ist zu beachten, dass erst nach ca. fünf bis sechs Tagen eine konfluente Zellschicht erreicht wird. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen nach beschriebener Methode passagiert.

5.1.1.3 Kultivierung von HUVEC-Zellen

Bei HUVEC-Zellen handelt es sich um humane Endothelzellen, welche unmittelbar nach der Geburt aus der humanen Nabelschnur gewonnen werden (HUVEC = human umbilical vein endothelial cells). Beim Kultivieren dieser Zellen ist besonders darauf zu achten, dass diese Zellen 80 % Konfluenz nicht überschreiten sollten, da bei einem zu dichten Zellrasen die Zellen in einen Zustand des Wachstumsarrests übergehen. Eine Subkultivierung dieser Zellen war daher alle drei bis vier Tage erforderlich.

5.1.1.4 Kultivierung von 2H11-Zellen und bEnd 3-Zellen

Sowohl bei 2H11, als auch bei bEnd 3 handelt es sich um murine Endothelzellen. Bei einem Passagierverhältnis von 1:20-1:40 war eine Subkultivierung der Zellen alle vier bis fünf Tage erforderlich.

5.1.1.5 Kultivierung von J774A.1-Zellen

Anders als bei den bisher beschriebenen Zelllinien erfolgte bei dieser Makrophagen-Zelllinie das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß nicht enzymatisch durch Inkubation mit Trypsin-EDTA, sondern die adhärenz Zellen wurden mittels eines Zellschabers vorsichtig abgelöst und anschließend durch Auf- und Abpipettieren in entsprechendem Kulturmedium vereinzelt. J774A.1 wurden alle drei bis fünf Tage subkultiviert.

5.1.1.6 Kultivierung von 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen

888-MEL und 1936-MEL sind beides humane Melanomzelllinien, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Patient 888 isoliert wurden [71].

Beide Zelllinien wurden in einheitlichem Medium kultiviert, und im Abstand von vier Tagen passagiert.

5.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer

In zahlreichen Versuchen sowie bei dem Passagieren von Zellen ist eine exakte Bestimmung der Zellzahl notwendig. Die Zellzahl lässt sich mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmen.

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen Objektträger, in den ein Gitternetz eingätzt ist. Mit aufgelegtem Deckgläschen ergibt sich ein definiertes Flüssigkeitsvolumen, welches durch Kapillarkräfte eingesogen wird. Das Gitternetz besteht aus vier großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wird aus jedem der vier großen Quadrate jeweils eine Reihe von vier kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt.

Aufgrund der Kenntnis des Volumens und durch Auszählen definierter Quadrate lässt sich die Zellzahl mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times 1000 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension}$$

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für längere Zeit lagern zu können, werden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zellen, die zu 90-100 % konfluent sind, werden einmal mit Hanks BSS gewaschen und mit Trypsin vom Kulturgefäß abgelöst. Nach dem Abzentrifugieren (1000 rpm, 5 min, RT) und Resuspendieren wird die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen werden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst bei -20°C eingefroren. Anschließend werden die Zellen UN bei -80°C gelagert. Darauf folgend kann die längerfristige Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff erfolgen.

Einfriermedium:	90 %	Einfriermedium
	10 %	DMSO

Zum Auftauen werden die Zellen 30 s im 37°C Wasserbad erwärmt. Durch Hinzupipettieren von 1 ml Kulturmedium tauen die Zellen vollständig auf. Nach Zugabe von weiteren 4 ml Kulturmedium wird die Zellsuspension abzentrifugiert (1000 rpm, 1 min, RT) und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach dem Überführen in eine Kulturflasche sind die Zellen nach etwa 24 h adhären und das Kulturmedium kann erneuert werden.

5.1.4 Mycoplasmen-Nachweis

Mycoplasmen sind parasitär lebende Bakterien. Eine Mycoplasmen-Kontamination kann mikroskopisch nicht erkannt werden. Da aber eine solche in bis zu 30 % aller Zellkulturen auftritt und

den Stoffwechsel und das Wachstum sowie generell die Vitalität der Zellen beeinflusst, ist es notwendig, auch etablierte Zelllinien in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen zu testen. Hierfür wurden zahlreiche Techniken entwickelt. Ein schneller und effektiver Nachweis erfolgt mithilfe des VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin) durch konventionelle PCR.

5.1.5 MTT-Proliferations-Assay

Um die Zellproliferation mittels reproduzierbarer Parameter darstellen zu können, wurde durch Mosman *et al.* die Methode des MTT-Proliferations-Assay etabliert.

Nach dem Anfärben vitaler Zellen mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) über einen definierten Inkubationszeitraum werden diese durch die Zugabe von 1N HCl in Isopropanol lysiert. Die colorimetrische Auswertung erfolgt anschließend in 96-well-Platten mittels eines ELISA-Readers (optische Dichte bei 570 nm).

5.2 Mausexperimente

5.2.1 Versuchstiere

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren handelt es sich um fünf bis sechs Wochen alte weibliche, athymische nu^{-}/nu^{-} Mäuse (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}), geliefert von Harlan-Winkelmann (Borchen).



Abb.5.2.1. weibliche, athymische nu^{-}/nu^{-} Mäuse (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}); Harlan

Der *nu*-Lokus auf Chromosom 11 ist autosomal rezessiv. Da es sich bei diesen mutagenen Mäusen um den Genotyp nu^{-}/nu^{-} handelt, kommt es zu folgender Merkmalsausprägung: die Tiere sind vollkommen unbehaart, nur an vereinzelt Stellen ist Haarwuchs möglich. Weiterhin besitzen die Tiere einen dysfunktionalen rudimentären Thymus. Das bedeutet, dass eine T-Zell-Defizienz vorliegt und die Tiere nicht in der Lage sind cytotoxische Effektorzellen zu generieren. Die B-Zellen hingegen sind funktionell aktiv.

Die Tiere eignen sich für die Krebsforschung, da aufgrund der Immundepletion Xenotransplantate nicht abgestoßen werden. Weiterhin eignen sie sich, bedingt durch diesen Phänotyp, sehr gut für immunologische Untersuchungen wie zur Erforschung von Autoimmunkrankheiten oder zur Antikörperproduktion.

Die Tiere werden einem Lichtrhythmus von 12 h hell – 12 h dunkel gehalten, da es sich um Albinoten handelt, ist die Lichtintensität abgeschwächt, weil diese Tiere sehr empfindlich gegenüber Licht sind und zu Bindehautentzündungen neigen.

Das Wachstum der Tiere ist in Abbildung 5.2.1 dargestellt:

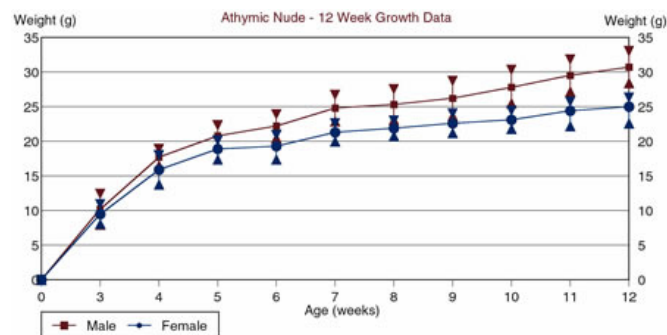


Abb.5.2.1 Wachstumskurve von weiblichen, athymischen nu^{-}/nu^{-} Mäusen (Hsd: Athymic Nude-Foxn1^{nu}); Harlan

Bei Implantation sollten die Mäuse ca. 5-6 Wochen alt sein. Tiere, die gentechnisch veränderte Mikroorganismen oder Pathogene in sich tragen, werden im Tierstall unter biologischer Sicherheitsstufe 2 gehalten.

5.2.2 Implantation von soliden Tumoren

Für die Implantation solider Tumore wurden 5-6 Wochen alte, weibliche athymischen *Nude*-Mäuse verwendet.

Unabhängig vom untersuchten Tumormodell wurden die Zellen nach folgendem Protokoll für die Implantation vorbereitet: Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 95 % in Gewebekulturflaschen kultiviert. Für die Implantation der Zellen wurden diese zunächst gewaschen, trypsinisiert und pellertiert (1000 rpm; 5 min; RT). Durch zweimaliges waschen mit PBS⁺⁺ wurden abgestorbene Zellen ausgewaschen und die lebenden Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und im gewünschten Volumen PBS⁺⁺ resuspendiert.

Für die verschiedenen Tumormodelle wurden optimale Implantationsdosen experimentell ermittelt. So wurde für die Implantation von GI-101A Tumoren eine Zellsuspension von 5×10^6 Zellen/100 μ l PBS [73] vorbereitet. Hingegen war für die Erzeugung der Melanomtumore abweichende Tumorzellmengen erforderlich. Um solide 888-MEL-Tumore zu erzeugen wurden 4×10^6 Zellen/

100 µl PBS implantiert, und um 1936-MEL-Tumore zu generieren, war eine Konzentration von $7,5 \times 10^5$ Zellen/100 µl PBS erforderlich.

Die Implantation der Tumorzellen mit einer 29G½ Insulin-Spritze erfolgte subkutan am rechten Oberschenkel der Tiere, nachdem die Injektionsstelle mit Alco-Preps desinfiziert war.

Bei allen Implantationen/Injektionen war stets darauf zu achten, dass die Substanzen steril, isoton und von neutralem pH-Wert waren.

Das Tumorwachstum wurde mithilfe einer digitalen Schieblehre in regelmäßigen Abständen dokumentiert und das Tumolvolumen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumolvolumen} = \frac{\text{Länge}^2 \times \text{Breite}}{0,25}$$

5.2.3 Anästhesie der Mäuse

Zahlreiche Versuche, wie beispielsweise das im Anschluss beschriebene Biolumineszenz Imaging, erfordern eine Narkose der Tiere. Dafür werden die Tiere in einer verschlossenen Inhalationskammer mit einem Inhalationsanästhetikum begast.

In dieser Arbeit wurde als Anästhetikum Isofluran verwendet. Dabei handelt es sich um den Wirkstoff Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethyl-ether ($\text{CHF}_2\text{-O-CHClCF}_3$). Isofluran ist ein leichtflüchtiges Anästhetikum. Da es weder explosiv noch brennbar ist, ist es ungefährlich in der Handhabung und Anwendung. Es wird vom Tier gänzlich über die Lunge ausgeschieden und wird auf Grund des anorganischen Fluorids kaum im Körper metabolisiert. Nach Inhalation kommt es zu einer Allgemeinanästhesie. Da Isofluran einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten Blut/Gas hat, findet eine rasche Reaktion auf steigende oder sinkende Isoflurankonzentrationen statt.

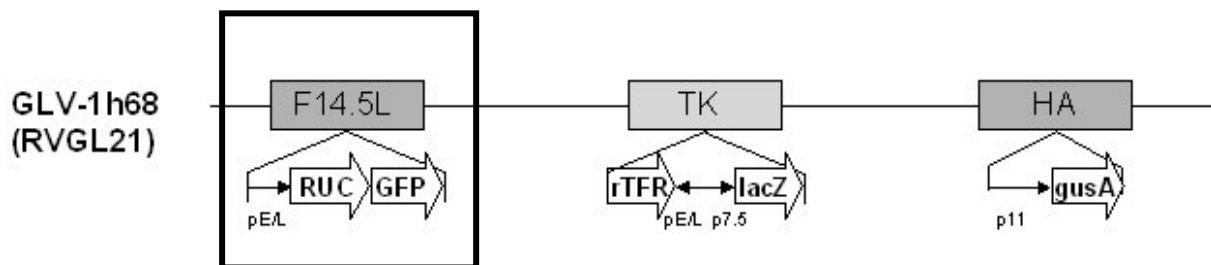
Isofluran kann in Sauerstoff- oder Sauerstoff/Lachgas-Mischungen verabreicht werden. Die Konzentrationen werden dabei ungefähr folgendermaßen gewählt:

- Induktion der Narkose: 4 % Isofluran
- Erhaltung der Narkose: 1,5-3 % Isofluran

5.2.4. *real-time* Detektion der viralen Replikation im Tumorgewebe mittels Lumineszenz und Fluoreszenz

Als semi-quantitative Methode zur Detektion der viralen Replikation nach GLV-1h68-Infektion der Versuchstiere dienten in dieser Arbeit zum einen Fluoreszenzmikroskopie mittels eines Stereo-Fluoreszenzmikroskop und zum anderen Biolumineszenz-Imaging mit Hilfe des *Low-Light*-Imagers.

Möglich war dies, da das zu charakterisierende Virus GLV-1h68 das Reportergenkonstrukt *Ruc*-GFP exprimiert.



Dieses bifunktionelle Reportersystem ermöglichte zum einen die virale Ausbreitung durch die GFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen, und zum anderen durch Lumineszenz am *LowLight*-Imager.

Die Detektion der viralen Genexpression durch GFP wird in der Forschung vor allem auf Einzelzell-Niveau angewandt. Diese Methode fand in dieser Arbeit aber auch zur schnellen Überprüfung des Infektionsstatus solider Tumore im lebenden Versuchstier Anwendung.

Zur Ermittlung der viralen Ausbreitung in Zellverbänden diente die Lumineszenz. Mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens kann die Kolonisierung des Tumorgewebes mit rekombinanten Vaccinia-Viren im lebenden biologischen System eindeutig analysiert werden.

5.2.4.1 Detektion der Fluoreszenz

Die lebenden Tiere wurden unter dem Stereo-Fluoreszenzmikroskop (MZ16 FA, Leica, Heerbrugg, Schweiz) fixiert. Anschließend wurde die virale GFP-Expression durch Exposition mit UV-Licht mit dem entsprechenden UV-Filtern überprüft. Durch eine angeschlossene Digital-CCD-Kamera (DC500, Leica) konnten auch Aufnahmen der fluoreszierenden Tumore gemacht werden.

5.2.4.2 Detektion der Lumineszenz

Die Lumineszenz bietet eine weitere Möglichkeit die Ausbreitung von Viren in der lebenden Maus über den kompletten Verlauf der Infektion hinweg zu detektieren.

Luziferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luziferine mit Sauerstoff reagieren und es zur Biolumineszenz kommt.

Luziferasen sind im Laufe der Evolution aus anderen Enzymen, den Oxygenasen hervorgegangen. Luziferasen wurden in verschiedenen Tieren entdeckt. Diese sind aber nicht alle identisch sondern zeigen speziesspezifische Eigenschaften. Unterschieden wird dabei zwischen *Firefly*-Luziferasen (aus dem Leuchtkäfer) bei denen Luziferol, ATP und Sauerstoff zu CO_2 , AMP und Licht reagieren und *Renilla*-Luziferasen, die nur Luziferol, Sauerstoff und kein ATP zur Reaktion benötigen. Die Luziferase der nordamerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) war die erste Luziferase, die intensiv biochemisch untersucht wurde.

In dieser Arbeit wurde mit der *Renilla*-Luziferase, in Form eines *Ruc-GFP* Fusionsgens gearbeitet. Dieses wurde durch Fusion der cDNA für *Renilla*-Luziferase (*ruc*) mit der cDNA, welche für GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* codiert, erzeugt.

Die katalysiert biochemische Reaktion ist die oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin in Anwesenheit von Sauerstoff. Dies erzeugt blaues Licht mit einem Emissionswellenlängen-Maximum von 478 nm, welches mit Hilfe des *Low-Light*-Imagers gemessen werden konnte. Die Intensität der Lumineszenz-Reaktion wurde zur Messung der Luziferase-Menge genutzt.

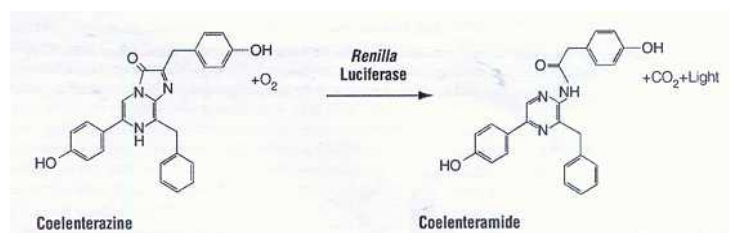


Abb.5.2.4. Katalytische Umwandlung von Coelenterazin in Coelenteramid durch *Renilla*-Luziferase

Vorbereitend für den Versuch musste das Substrat in PBS gelöst werden und in entsprechender Menge Coelenterazin-Puffer verdünnt werden. Anschließend wurden die Tiere narkotisiert. Dabei wurde zunächst die initiale Narkose durch Begasung mit 3 % Isofluran eingeleitet. Anschließend wurden das Substrats Coelenterazin i.v. injiziert (5 μl Coelenterazin gelöst in 95 μl Coelenterazin-Puffer). Für das anschließende *real-time* Monitoring wurden die Tiere in einen *Low-Light* Imager überführt, welcher zur Aufrechterhaltung der Narkose mit einem Anästhesiemodul in Form von Einzelbeatmungsmasken (1.5 % Isofluran/ 0,2l Sauerstoff/min) und mit einem Wärmetisch ausgestattet war.

Die Photonenemission wurde mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera gemessen und unter Verwendung der WinLight Software ausgewertet.

5.2.5 Tumorentnahme

Um weitere Analysen der Tumore durchzuführen, wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet und die Tumore entnommen.

Bei der Präparation war darauf zu achten, dass umgebendes Bindegewebe, Muskelgewebe, Knochen, Haut und Haare möglichst gründlich entfernt wurden, da diese bei der späteren Herstellung von Homogenisaten oder Gewebeschnitten stören.

Nach kurzem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Tumore bis zur weiteren Verwertung bei -80 °C gelagert.

5.2.6 Herstellung von Tumorhomogenisaten

Tumorhomogenisate wurden mit Hilfe eines *Fast-Prep-cell-disrupter* in speziellen Reaktionsgefäßen mit Keramikkügelchen hergestellt. Zunächst wurde das Tumorgewebe grob zerkleinert und mit PBS in Reaktionsgefäße gegeben. Hierbei war es wichtig, dass das Verhältnis von Gewebe zu PBS immer gleich war (z.B.: 1 g Gewebe auf 1,5 ml PBS).

Die gefüllten Reaktionsgefäße wurden in den *Fast-Prep-cell-disrupter* gegeben und dreimal für 30 sec zerkleinert. Dazwischen wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt. Das Tumorgewebe wurde dadurch ausreichend zerkleinert.

Um noch vorhandene Zellaggregate zu lösen, folgten drei freeze-thaw-Zyklen. Durch eine abschließende Zentrifugation (1300 rpm; 20 min; 4 °C;) wurde im Überstand das Tumorhomogenisat erhalten. Dieses wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, zum Schockgefrieren kurzzeitig in flüssigen Stickstoff überführt und daraufhin bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

5.3 Vaccinia Virus- Infektion

5.3.1 *in vitro*-Infektion mit Vaccinia-Viren

Vor Beginn einer Infektion ist es wichtig, eine ausreichende Anzahl an Kulturgefäßen auszusäen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellen am Tag der Infektion eine ausreichende Konfluenz aufweisen, aber auch im Fall einer längeren Infektionsbeobachtung ein Weiterwachsen der Zellen möglich ist.

Die einzelnen Ansätze müssen alle aus einer Zellsuspension stammen, so dass, stellvertretend für alle anderen Zellkulturschalen, die Anzahl der Zellen in einer Kulturschale repräsentativ für alle weiteren vor der Infektion bestimmt werden kann.

Es ist wichtig das Virus vor jeder Infektion dreimal für je 30 sec bei 4 °C zu sonifizieren (Sonifier Branson 450), um Virusaggregate zu trennen.

Unmittelbar vor einer Virusinfektion sollten folgende Vorbereitungen getroffen werden: von den Zellen wird zunächst das Medium abgenommen und die Zellen werden mit Hank's BSS gewaschen.

Anschließend wird die Zellzahl eines Kulturgefäßes bestimmt und die Virusmenge für die Infektion berechnet. Dies erfolgt auf Basis der gewünschten Infektionsrate (= Rate der infektiösen Partikel pro Zelle). Die Angabe multiplicity of infection (MOI) 1 bedeutet, dass theoretisch jede Zelle mit einem Viruspartikel infiziert werden kann, bei MOI 0,5 entspricht dies einer Infektionsrate von 0,5 Viren pro Zelle.

Der Virustiter wird in pfu/ml (plaque forming units/ml) angegeben.

Mit Hilfe dieser beiden Werte lässt sich das Infektionsvolumen bestimmen:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{MOI}}{\text{pfu/ml}} = \text{benötigte Virusmenge (Volumen)}$$

Die benötigte Virusmenge wurde in einem definierten Volumen Medium aufgenommen, so dass die Zellen in der Kulturschale gut bedeckt waren. Die Virussuspension wurde mittels eines Vortex durchmischt und anschließend zu den Zellen gegeben.

War die Virusmenge zu gering und daher schlecht zu handhaben, wurden entsprechende Verdünnungen der Virussuspension angesetzt und anschließend, wie beschrieben, auf die Zellen gegeben.

Die Inkubationszeit mit den Viren betrug eine Stunde. Um zu gewährleisten, dass dabei die Viren gleichmäßig verteilt waren, wurde während der einstündigen Inkubationszeit zweimal im Abstand von je 20 min das Kulturgefäß geschwenkt.

Eine Stunde nach Infektion (1 hpi = 1 hour post infection) wurde das Virus-Inokulum abgenommen, und nach 1x Waschen mit Hank's BSS durch frisches Kultur-Medium ersetzt.

5.3.2 *in vivo*-Infektion mit Vaccinia-Viren

Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 150-300 mm³ erfolgte die intravenöse Applikation des rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h68 durch eine einmalige Injektion von 5 x 10⁶ oder 1 x 10⁸ plaque forming units (pfu) in 100 µl PBS in die rechte laterale Schwanzvene.

Die Viren wurden vor Injektion aufgetaut und zum Lösen aufgetretener Virusaggregate 3x für 30 sec sonifiziert.

Um den Injektionsvorgang zu erleichtern, wurden die Tiere zur Gefäßweiterung für 5 min mit einer Infrarot-Wärmelampe bestrahlt.

Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in der Injektionslösung befinden, da Injektion von Luft zu Embolien und zum Tod der Tiere führen kann.

Die Injektionsstelle wurde vor der Infektion mit Alco-Preps desinfiziert.

5.3.3. *in vitro*- Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um die virale Ausbreitung von GLV-1h68 optisch darstellen zu können, wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

Dafür wurden die jeweils zu untersuchenden Zellen in entsprechenden Inkubationsgefäßen ausgesät und bei Erreichen von ca. 80 % Konfluenz mit definierter MOI infiziert. Auch hierbei war es wichtig als Referenzwert eine uninfizierte Probe parallel zu allen Schritten mitlaufen zu lassen.

Uninfizierte und infizierte Zellen wurden unmittelbar nach der Infektion (~ 0hpi) und anschließend zu bestimmten Zeitpunkten im Durchlicht und mit UV-Filter am Fluoreszenzmikroskop analysiert und mittels der angeschlossenen Kamera fotografiert.

Bei den Aufnahmen wurde versucht immer dieselbe Position der Platte auszuwählen, sodass die virale Ausbreitung ausgehend von einem bestimmten Viruspatch untersucht werden konnte.

5.3.4. Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay

Die Methodik des Plaque Assays ermöglicht es die genaue Anzahl an viralen Partikeln in einer Lösung zu bestimmen. Bei dieser Lösung kann es sich um aufgereinigtes Virus, viral infiziertes Zell- oder Tumorslysat handeln.

Die einzelnen Arbeitsschritte sollen hier am Beispiel von Zellslysatproben erklärt werden, sind jedoch identisch bei aufgereinigtem Virus oder Tumorslysatproben.

Um die definitive Anzahl an Viruspartikeln in einer Zellslysatprobe bestimmen zu können wurden zunächst CV-1-Zellen in 24-well Platten ausgesät.

Vorbereitend für die Infektion wurde von jeder Probe eine Verdünnungsreihe bis 10^{-9} in Infektionsmedium (2 % FKS) angefertigt.

Die Infektion wurde auch hier wieder wie unter 5.3.1. beschrieben durchgeführt: zunächst wurde das Medium von den Zellen abgenommen und anschließend die Zellen mit Hank's BSS gewaschen.

Die Zellen wurden dann im Duplikat mit je 250 μ l einer Verdünnung der Virussuspension infiziert.

1 hpi wurde zu dem Infektionsmedium 1 ml Carboxymethylcellulose-Medium hinzugegeben. Carboxymethylcellulose (CMC) bildet ein engmaschiges Netzwerk aus Cellulosefasern, wodurch die Virusausbreitung gehemmt wird.

Zwei Tage nach der Infektion wurden pro well 250 μ l Crystal Violet hinzugegeben.

Nach mindestens drei Stunden Inkubation bei RT wurde der Farbstoff im Wasserbad abgewaschen. Nach dem Trocknen der Zellkulturplatten an der Luft, konnten die einzelnen Plaques auf einem Leuchtschirm ausgezählt werden. Jeder einzelne Plaque war auf ein Viruspartikel zurückzuführen. Damit ließ sich der Virustiter mit Hilfe folgender Formel bestimmen:

$$\frac{\text{\# plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Infektionsvolumen (hier: 0,25 ml)}} = \text{Titer (pfu/ml)}$$

CMC-Medium:

7,5 g	CMC
500 ml	DMEM (+ Antibiotika, + 5 % FKS)

Crystal Violet:

1,3 g	Crystal violet
50 ml	Ethanol
300 ml	Formaldehyd 37 %
650 ml	H ₂ O _{bidest.}

5.3.5. Analyse des viralen Replikationsverhaltens

Möchte man das *in vitro*- oder auch *in vivo*- Replikationsverhalten eines Virus untersuchen, wurde ebenfalls die Methodik des Plaque Assays angewandt.

Bei Zelllysaten wurden dafür zunächst die Zellen, bei welchen das Replikationsverhalten von GLV-1h68 untersucht werden sollte, in entsprechenden Inkubationsgefäßen ausgesät. Bei Erreichen von 90-95 % Konfluenz erfolgt die Infektion mit GLV-1h68. Das Replikationsverhalten wurde zu den Zeitpunkten 1, 6, 12, 24, 48 und 72 hpi untersucht. Bei Erreichen dieser Stundenwerte wurde zum einen je 1 ml Überstand abgenommen aber auch ein Lysat der infizierten Zellen durch trypsinieren erzeugt. Beide Proben (Zellen und Überstand) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C bis zur Weiterverwertung gelagert.

Durch drei darauf folgende freeze-and-thaw-Zyklen werden die Zellen lysiert. Mittels des daran anschließenden Plaque Assay konnte dann der Virustiter der Proben bestimmt werden.

Zur Untersuchung der viralen Replikation im Tumorgewebe oder in Organen, wurden zunächst die Tumore oder betreffenden Organe zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion entnommen und Lysate in PBS hergestellt. Anschließend konnte auch hier der virale Titer mittels Plaque-Assay ermittelt werden.

5.4. Proteinanalytische Methoden

5.4.1. Proteinextraktion aus Zellen

Für eine Proteinextraktion wurden zunächst die Zellen, in denen das veränderte Proteinexpressionsprofil nach Virusinfektion untersucht werden sollte, in entsprechenden Inkubationsgefäßen ausgesät. Bei Erreichen von 90-100 % Konfluenz wurden die Zellen mit Virus infiziert (5.3.1.). Für nachfolgende Experimente war es wichtig, eine uninfizierte Petrischale als Negativkontrolle parallel zu allen Schritten mit auszusäen und, abgesehen von der Infektion, die Zellen wie die Infektionsproben zu behandeln. Dadurch generierte man einen Referenzwert, von dem ausgehend erhöhte oder verringerte Proteinextraktion durch Virusinfektion untersucht werden konnte.

Zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion fand die Proteinextraktion aus den Zellen statt.

Insgesamt ist bei Proteinisolation auf ein absolut steriles Arbeiten zu achten, um eventuelle Kontamination mit Proteasen zu verhindern. Ebenso ist darauf zu achten, dass die Proben ab dem Zeitpunkt der Proteinisolation unter möglichst eisgekühlten Bedingungen gehalten werden, um ebenfalls eine Proteindegradation zu vermeiden.

Bei der Proteinextraktion wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen, und anschließend die Zellen mit Hank's BSS gewaschen.

Zu den Zellen wurde anschließend Lysepuffer hinzupipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit wurden mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst.

Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt, und anschließend beide Extraktionsproben zu einer einheitlichen Suspension vereint.

Um Proteine, welche intrazellulär lokalisiert sind untersuchen zu können, mussten die Zellen aufgeschlossen werden. Dafür wurden die Proben 10-15 sec mit Hilfe eines Vortexers durchmischt.

Durch zwei aufeinander folgende Zentrifugationen (2 min; 4 °C; 12000rpm) wurden anschließend die Zell- und Membranbestandteile abzentrifugiert. Die Proteine blieben dabei im Überstand.

Der Überstand wurde abgenommen und in ein separates Reaktionsgefäß überführt, um es daraufhin in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

5.4.2. Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford

Um Zelllysate zur weiteren Analyse verwenden zu können, muss die Proteinkonzentration bestimmt werden. Dafür wurde ein von Bradford (1976) etabliertes Verfahren durchgeführt, das darauf beruht, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 in Gegenwart von Proteinen unter sauren Bedingungen von 465 nm zu 595 nm verschiebt.

Zunächst wurden Lösungen mit definierten Proteinmengen von 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 µg/µl BSA erstellt.

Von jeder dieser Probe wurde dann 1 µl zu 799 µl H₂O_{bidest.} zugegeben und mit 200 µl Bradford-Lösung vermischt. Die Lösungen wurden in Küvetten überführt und in einem Photometer, das vorher mit einer Referenz (800 µl Wasser + 200 µl Bradford-Reagenz) geeicht wurde, bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der Eichkurve konnte nun die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

Bradford-Reagenz:

50 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
25 ml	Ethanol 96 %
50 ml	Phosphorsäure 85 %
25 ml	H ₂ O _{bidest.}

5.4.3. Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Von Laemmli wurde die Methode der SDS-PAGE (sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel-electrophoresis) entwickelt [74]. Diese SDS-PAGE wird verwendet, um Proteine in Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse aufzutrennen.

Zunächst wurde aus Acrylamid- und Bisacrylamidmonomeren durch Polymerisation ein inertes, stark vernetztes Gel hergestellt, das als Matrix für die Proteinauftrennung diene. Die Polymerisation der Acrylamid- und Bisacrylamidmonomeren erfolgt dabei durch Zugabe von APS und TEMED.

Ein Gel besteht aus zwei Komponenten: einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Die Auswahl der Konzentration des Trenngels hängt von der Größe der zu untersuchenden Proteine ab.

Durch Änderung der Monomerkonzentration kann die Porengröße so eingestellt werden, dass die gewünschte Proteinfraction aufgrund ihrer Größe verlangsamt und somit aufgetrennt wird.

Proteingele wurden nach folgendem Schema gegossen:

	<i>Trenngel 10 %</i>	<i>Trenngel 12 %</i>	<i>Sammelgel 5 %</i>
<i>H₂O_{bidest.}</i>	<i>12,3 ml</i>	<i>10,2 ml</i>	<i>7,6 ml</i>
<i>Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)</i>	<i>9,9 ml</i>	<i>9,9 ml</i>	<i>1,63 ml</i>
<i>1,5 M Tris pH 8,8</i>	<i>7,5 ml</i>	<i>7,5 ml</i>	-
<i>0,5 M Tris pH 6,8</i>	-	-	<i>3,12 ml</i>
<i>10 % SDS</i>	<i>300 µl</i>	<i>300 µl</i>	<i>125 µl</i>
<i>10 % APS</i>	<i>150 µl</i>	<i>150 µl</i>	<i>62,5 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>15 µl</i>	<i>15 µl</i>	<i>12,5 µl</i>

Das Gel wurde in einer Apparatur gegossen, die aus zwei durch Silikon-Abstandhalter getrennten Glasplatten besteht. Die gesamte Apparatur wurde durch Klammern zusammengehalten.

Nach Einfüllen der Trenngel-Lösung wurde zur Ausbildung einer glatten Oberfläche mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet, bis die Polymerisation abgeschlossen war.

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Gelkamm eingesetzt.

Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen. Das Gel konnte nun in die Gelelektrophoreseapparatur eingesetzt werden. Als Laufpuffer wurde 1x Laemmli-Puffer verwendet.

Bevor die Proben in die Geltaschen eingefüllt werden konnten, mussten die Proben für 5 min bei 95 °C auf einem Heizblock in Probenpuffer erhitzt werden.

Die entscheidenden Inhaltsstoffe des Probenpuffers sind Natriumdodecylsulfat, β -Mercaptoethanol und Harnstoff. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark negativ geladenes Detergenz, das an hydrophobe Bereiche der Proteinmoleküle bindet. Es kommt ungefähr auf zwei Aminosäuren ein SDS-Molekül. Proteine entfalten sich dadurch und lösen sich aus möglichen Aggregaten. SDS maskiert die proteineigene Ladung und fügt gleich großen Proteinen gleich viel negative Ladung an.

β -Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel. Es reduziert alle Disulfidbrücken in den Proteinen und löst so die meisten Untereinheiten voneinander. Harnstoff wirkt ebenfalls denaturierend. Zur Kontrolle wie weit die Lauffront bereits in das Gel hineingelaufen ist beinhaltet der Probenpuffer Bromphenolblau. Durch die blaue Färbung sind die einzelnen Spuren gut im Gel zu erkennen.

Nachdem die Proben in die Geltaschen eingefüllt wurden, wurde Spannung (130 - 180 V) angelegt und die Proteine begannen im Gel zu wandern. Da die Proteinproben selbst nun eine negative Ladung besitzen wanderten sie zum positiven Pol.

Alle Proteine gleicher Größe wandern mit derselben Geschwindigkeit, da ihre native Struktur entfaltet ist, und sie als langgestreckte Polypeptidketten vorliegen.

Das Proteingemisch wurde somit in einzelne Banden aufgetrennt. Das Molekulargewicht der Proteine der einzelnen Banden ließ sich durch Vergleich mit einem Marker, welcher koelektrophoretisch aufgetrennt wurde, bestimmen.

1x SDS-Probenpuffer:

200 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
5 % (v/v)	SDS
1 mM	Na ₂ EDTA
8 M	Harnstoff
0,1 %	β -Mercaptoethanol
0,2 %	Bromphenolblau

10× Laemmli-Puffer:

440 mM	Tris
2 M	Glycin
1,5 % (w/v)	SDS
pH 8,3	

5.4.4. Färbung der Proteingele mit Coomassie Blau G250

Die Gelfärbung mit Coomassie Blau G250 ist eine Standardmethode zur Visualisierung der Proteinbanden nach der Gelelektrophorese (5.4.3.).

Die Methode ist sehr einfach und schnell, jedoch nur semi-quantitativ. Handelt es sich um sehr geringe Proteinmengen, empfiehlt sich die wesentlich sensitivere Silberfärbung anzuwenden.

Die Nachweisgrenze bei Coomassie-Färbungen liegt bei 0,1-2 µg Protein pro Bande.

Die Coomassie-Färbung folgt unmittelbar auf die Gelelektrophorese. Dabei wurde das Gel aus der Gelelektrophoreseapparatur herausgenommen und das Sammelgel abgetrennt. Das verbleibende Trenngel wurde in eine Färbeschale mit Coomassie-Färbelösung gegeben und ÜN bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war und die einzelnen Proteinbanden gut sichtbar waren.

Das Gel kann nun in einer Gelfixierlösung einige Wochen aufbewahrt werden.

Coomassie-Färbelösung:

250 ml	Isopropanol
100 ml	Essigsäure
650 ml	H ₂ O _{bidest.}
0,03 %	Coomassie Brilliant Blue G250

Gelentfärbelösung:

30 %	Methanol
10 %	Essigsäure

Gelfixierlösung:

10 %	Essigsäure
------	------------

5.4.5. Western-Blot

5.4.5.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Durch eine Coomassie-Färbung werden alle Proteine, welche in der vorherigen Gelelektrophorese aufgetrennt wurden sichtbar. Möchte man aber nur einige spezifische Proteine eines Proteingemisches nachweisen, wird ein Western-Blot durchgeführt.

Der Name Western-Blot leitet sich von dem Erfinder der Blotting Technik E. Southern ab, der diese Methode ursprünglich für DNA-Fragmente etablierte. In Anlehnung an seinen Namen wurden die entsprechende Detektion von RNA-Fragmenten als Northern-Blot, und die Proteinauftrennung mit anschließendem blotten als Western-Blot bezeichnet.

Der erste Schritt eines Western-Blots ist der Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran [75].

Dieser Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blottapparatur. Dabei wandern die denaturierten Proteine im Ionengradienten und werden dadurch auf die Membran überführt, auf welcher sie, bedingt durch hydrophobe Wechselwirkungen, haften bleiben.

Bei der Semi-Dry-Methode wird die Blottapparatur nach folgendem Schema aufgebaut:

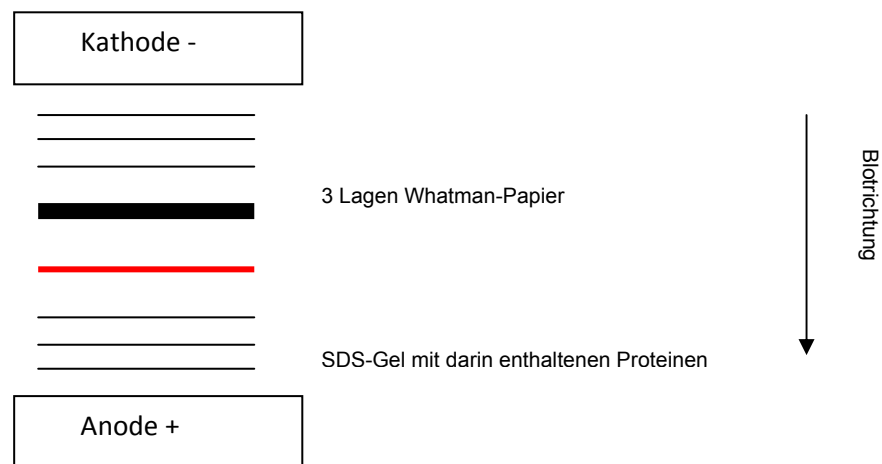


Abb.5.4.5.1. Aufbau der Blottapparatur für die Durchführung eines Western-Blot

Beim Aufbau der Blottapparatur ist es wichtig, dass Whatman-Papiere, Nitrocellulosemembran und auch das Gel zunächst mit Towbin-Puffer angefeuchtet werden, bevor sie luftblasenfrei übereinander gestapelt werden. Nun kann die Apparatur an das Netzgerät angeschlossen werden und eine Stromstärke angelegt werden.

Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können wieder renaturieren und teilweise ihre native Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen, nicht jedoch ihre Quartärstruktur.

Die notwendige Stromstärke richtet sich nach der Größe des Gels und ist mit Hilfe folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Stromstärke [mA]} = \text{Gelfläche [cm}^2\text{]} \times 0,8$$

Diese Stromstärke ist für eine Blotdauer von 2 Stunden ausgelegt. Nach dieser Zeit wurde der Blot möglichst schnell auseinander gebaut und mit einer PonceauS-Färbung fortgeföhren. Dabei ist es wichtig darauf zu achten, dass die Membran nicht austrocknet.

Towbin-Puffer:

0,025 M Tris-Base
0,192 M Glycin
20 % MeOH
pH 8,3

5.4.5.2. Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran

Um die Effizienz des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran nach dem Blotten zu überprüfen, lässt sich die Membran mit Ponceau S anfärben.

Dafür wurde die Membran für ca.10 min bei RT auf dem Schüttler in PonceauS-Färbelösung inkubiert. Nachdem der Hintergrund durch vorsichtiges waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ entfärbt wurde, ließen sich rote Proteinbanden erkennen.

Der Vorteil dieser Methode ist ihre Reversibilität: die angefärbten Proteinbanden können mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ durch längeres waschen wieder vollständig entfärbt werden.

PonceauS-Färbelösung:

0,5 % (w/v) Ponceau S
1 % (v/v) Essigsäure

5.4.5.3. Immundetektion mittels ECL-Methode

Nachdem die Proteine mittels Western-Blot auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht wurden, können mittels Immundetektion definierte Proteine nachgewiesen werden.

Die ECL-Methode ist eine sehr sensitive, nicht-radioaktive Lumineszenz-Nachweismethode für spezifische Antigene, die direkt oder indirekt mit HRP-markierten („horseradish peroxidase“; Peroxidase aus Meerrettich) Antikörpern konjugiert sind. Diese Peroxidase katalysiert unter

alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol zu 5-Aminophtalsäure unter Katalysatorwirkung von Wasserstoffperoxid.

Durch die Oxidation von Luminol kommt es zu einer Lichtemission, die durch Auflegen eines Röntgenfilms erfasst werden kann.

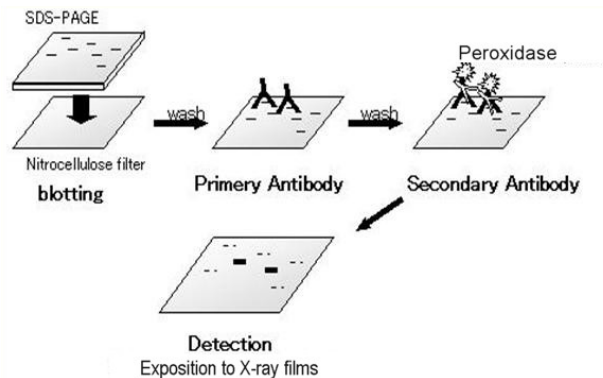


Abb. 5.4.5.3. ECL-Reaktion

Die einzelnen Arbeitsschritte der Immundetektion sind wie folgt:

Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran mit einer Suspension aus Magermilchpulver in 1x TBT blockiert und anschließend mit einem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser bindet selektiv nur an Epitope des gesuchten Proteins. Die Inkubationszeit betrug 1,5 h bei RT. Vor der Reaktion wurde der Antikörper in 1x TBT verdünnt (1: 500-1: 10.000).

Anschließend wurde die Membran einige Male in 1x TBT gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Erst durch die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Detektion des Proteins ermöglicht. Der Sekundärantikörper bindet selektiv an den Primärantikörper. Auch der Sekundärantikörper wurde zuvor in 1x TBT verdünnt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Bei beiden Antikörperreaktionen ist darauf zu achten, dass es sich um möglichst frische Antikörperlösungen handelt.

Um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen wurde anschließend wieder 3-5-mal mit 1x TBT gewaschen.

Für die ECL-Reaktion wurde die Membran in die Luminollösung gegeben und für 1 min leicht geschwenkt.

Durch Auflegen eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer konnte das bei der Reaktion emittierte Licht detektiert werden, da es an diesen Stellen zu einer Schwärzung des Röntgenfilms kam.

Bei allen Reaktionsschritten ist darauf zu achten, dass die Membran immer mit Flüssigkeit bedeckt ist und somit nicht austrocknen kann. Damit alle Stellen der Membran gleichmäßig mit Inkubationslösung bedeckt sind, sollten alle Reaktionen auf dem Schüttler durchgeführt werden.

Blockierlösung:

5 % (W/V) Magermilchpulver in 1× TBT

10× TBT:

1,5 M NaCl
60 mM Tris-Base
190 mM Tris-HCl
20 % Tween 20

ECL-Reagenz:

Lösung 1: 90 mM p-Cumarsäure

Lösung 2: 250 mM Luminol

Lösung 3: 1M Tris; pH 8,5

→ 0,5 ml Lösung 1

1,0 ml Lösung 2

20 ml Lösung 3

→ mit H₂O auf 200 ml auffüllen

→ 5 µl H₂O₂ (30 %) zu 10 ml Lösung geben

5.4.5.4. Strippen von Nitrocellulosemembranen

Eine Nitrocellulosemembran lässt sich zum Nachweis verschiedener Proteine verwenden, die nicht von demselben Antikörper verwendet werden.

Dafür ist es wichtig, dass nach jeder Immundetektion sämtliche gebundene Antikörper wieder von der Membran entfernt werden. Dies erreicht man durch Inkubation der Nitrocellulosemembran in ca. 10 ml Stripping-Puffer für 1 h bei RT.

Anschließend wird die Membran dreimal mit 1x TBT gewaschen. Daran anschließend kann eine erneute Immundetektion durchgeführt werden.

Stripping-Puffer:

100 µM β-Mercaptoethanol
2 % SDS
62,5 mM Tris-HCl
pH 6,7

5.5. Nachweis der Genexpression des rekombinanten Vaccinia Virus GLV-1h68 mittels RNA- und cDNA-analytischer Methoden

5.5.1. Analyse der Transkription mittels *real-time*-RT-PCR

RT-PCR steht für reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction. Hierbei handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, die Transkription von Genen zu vergleichen.

Dafür wurde zunächst aus Gewebe oder einzelnen Zellen RNA isoliert und diese mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der PCR wurde die cDNA amplifiziert und konnte in einem Agarosegel analysiert werden. Auf diese Art ist es möglich, die Transkription von Genen auf Grund der DNA-Mengen im Gel zu vergleichen.

Um aber eine noch genauere Quantifizierung der Transkription einzelner Gene zu ermöglichen wurde anschließend eine *real-time*-PCR der cDNA-Proben durchgeführt.

5.5.1.1. RNA-Isolierung aus Tumorgewebe

Die RNA-Isolierung erfolgt mit Hilfe des miRNeasy[®] MiniKit von Qiagen entsprechend dem zugehörigen Protokoll.

Bei diesem Kit wird bei einer hohen Zellkonzentration eine QIA[®] shredder-vermittelte Homogenisierung empfohlen. Diese wurde routinemäßig durchgeführt und anschließend die im Protokoll beschriebene Isolierung durchgeführt bei welchem im finalen Schritt die RNA an die mitgelieferten Säulen gebunden und mit Wasser eluiert werden.

5.5.1.2. DNase-Verdau der RNA-Proben

Bei einer RT-PCR ist es besonders wichtig, dass keine genomische DNA mehr in den Proben vorliegt, sondern nur cDNA, welche aus der mRNA mittels Reverser Transkriptase synthetisiert wurde. Ist dies nicht gewährleistet kann das Ergebnis verfälscht werden.

Um ausschließen zu können, dass keine DNA-Reste mehr vorliegen, werden zweimal ein DNase-Verdau der RNA-Proben durchgeführt.

Hierbei wurden zwei unterschiedliche Kits für den DNA-Verdau verwendet:

- RNase-Free DNase Set; Qiagen
- DNA-free[™] Kit; Ambion

Bei der anschließenden cDNA-Synthese wurde eine definierte Menge RNA eingesetzt. Dafür musste zunächst die RNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen $H_2O_{bidest.}$ als Referenzwert bestimmt werden. Diese RNA-Konzentrationmessung erfolgte in einer geeigneten, kalibrierten Quarzküvette.

5.5.1.3. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit.

In dieser Arbeit wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Diese waren komplementär zum Poly-A-Schwanz (3'-Ende) der mRNAs. Da auch die mRNA von Vaccinia-Viren am 3'-Ende polyadenyliert ist [12], können diese Primer auch hier verwendet werden.

Nach Anlagerung der Primer synthetisiert die Reverse Transkriptase einen zur mRNA komplementären cDNA-Strang.

Die cDNA-Synthese wurde entsprechend dem beigefügten Protokoll durchgeführt, wobei als Template 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

Im Anschluss daran wurde die DNA-Amplifikation mittels PCR durchgeführt werden.

5.5.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zuerst durch K. Mullis beschrieben. Diese Methode ermöglicht, bereits kleinste Mengen an DNA-Mengen nachzuweisen.

Benötigt werden dafür nur ein doppelsträngiges DNA-Fragment, welches die zu untersuchende Sequenz enthält, entsprechende Primer, DNA-Polymerase und dNTPs.

Zur Vereinfachung wird zunächst ein Mastermix angesetzt, der Puffer, dNTPs, $MgCl_2$ und Taq-Polymerase beinhaltet. Dieser wird in die PCR-Caps vorgelegt und zuletzt werden Primer (forward und reverse) und die zu amplifizierende DNA hinzupipettiert.

Im ersten Reaktionsschritt der PCR wird das doppelsträngige DNA-Molekül in zwei Einzelstränge durch Erhitzen auf 95 °C aufgetrennt (Denaturierung). Daraufhin wird durch Absenken der Temperatur das Primer-Annealing ermöglicht. Bei der Auswahl der Primer gilt es folgendes zu beachten, um eine effiziente und spezifische Amplifikation zu ermöglichen: Die Länge der Primersequenz sollte zwischen 18 und 28 Basenpaaren liegen und einen GC-Gehalt von 50- 60 % aufweisen. Zudem sollten die Primer an ihrem 3'-Ende zwei bis drei Guanin- oder Cytosin-Reste besitzen, um eine unspezifische Bindung an den Matrizenstrang zu vermeiden. Palindromreiche Sequenzen innerhalb der Primer fördern die Bildung von Haarnadelschleifen und sind somit zu meiden. Ein weiteres Kriterium, eine Vermeidung von Komplementarität zwischen den Primer-Paaren zum Verhindern der Bildung von Primer- Hybriden ist zusätzlich nötig.

Für die PCR, lässt sich die jeweils korrekte Hybridisierungstemperatur für einen neu designten Primer errechnen. Die Temperatur errechnet sich durch Addition von 2 °C für jedes Adenin - Thymin – Paar und 4 °C jedes Guanin – Cytosin -Paar. Die Unterschiede ergeben sich, weil Adenin und Thymin nur durch 2 Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden; Guanin und Cytosin hingegen durch drei und somit fester aneinander gebunden sind.

In der Summe sind Annealing-Temperaturen von 55-80°C tolerierbar. Es ist aber auch wichtig darauf zu achten, dass zwischen Annealing-Temperatur und der Temperatur in der Elongationsphase eine größere Temperaturdifferenz besteht.

Nachdem die Primer gebunden haben, kann die DNA-Polymerase an die Primer binden und es kommt zur Elongation. Wie alle Enzyme, so hat auch die Taq-Polymerase ein Wirkungsoptimum, welches bei 72 °C liegt. Nach ca. 30 Zyklen ist aber auch die Aktivität der thermostabilen Taq-Polymerase erschöpft und die PCR wird an diesem Punkt abgebrochen.

Zum Abschluss der PCR werden die Proben auf 4 °C herunter gekühlt und können bei dieser Temperatur bis zur weiteren Analyse im Agarosegel gelagert werden.

Reaktionsansatz für PCR:

32,75 µl	H ₂ O
5 µl	10× Taq-Puffer
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1,25 µl	Taq-Polymerase
2 µl	Primer fwd. (1:10-Verdünnung)
2 µl	Primer rev. (1:10-Verdünnung)
3 µl	MgCl ₂
3 µl	cDNA

5.5.1.5. Analyse der DNA-Proben in Agarose-Gelen

Um die vorausgegangene PCR überprüfen zu können, werden die Proben in einem 1,6%igen horizontalen Agarosegel in 1 × TBE-Puffer aufgetragen. Zu der Agaroselösung wird Ethidiumbromid hinzupipettiert (auf 50ml Agarose/1 × TBE kommen 5 µl Ethidiumbromid). Anschließend wird das Gel in eine Flachbettapparatur gegossen und ein Gelkamm eingefügt.

Nachdem das Gel fest geworden ist, wird das Gel in eine Gelelektrophorese-Kammer mit 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer gegeben, und der Kamm wieder entfernt.

Jetzt können auch die cDNA-Proben, welche zuvor mit 5x Probenpuffer gemischt wurden, in die Geltaschen pipettiert werden. In die erste Tasche wird ein DNA-Marker als Größenstandard geladen.

Nach Beladen des Gels erfolgt die Auftrennung bei 80 V.

Sind die Proben ausreichend aufgetrennt, wird das Gel unter UV-Licht fotografiert.

TBE-Puffer:

890 mM	Tris
890 mM	H ₃ BO ₄
25 mM	Na ₂ EDTA

5× Probenpuffer für DNA:

50 %	TE-Puffer
50 %	Glycerin
0,04 %	Xylencyanol

5.5.1.6. Untersuchung der GFP- und Viperin-Expression mittels quantitativer *real-time*-PCR

Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden können, wurde es durch Entwicklung der quantitativen *real-time* PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Mengen zu machen. Dies macht die *real-time* quantitative PCR zu einem unentbehrlichen Werkzeug sowohl bei Sequenzanalysen, Genklonierungs- und Genexpressionsstudien, als auch im diagnostischen Bereich zum Nachweis von verschiedenen Pathogenen.

In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produktdetektion sowie dessen Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte notwendig sind .

Die Grundlage, welche eine Quantifizierung der DNA ermöglicht, ist der Einbau von einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff in doppelsträngige DNA.

Man unterscheidet bei diesen Reporterfarbstoffen zwischen nicht-spezifischen, interkalierenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR Green und spezifisch interagierenden Farbstoffen wie TaqMan-Sonden oder MolecularBacon.

Beiden Stoffgruppen ist gemein, dass die Fluoreszenz proportional mit der Produktmenge ansteigt.

In dieser Arbeit wurde als Farbstoff SYBR Green verwendet. Funktionsprinzip dieses Farbstoffes ist, dass frei in Lösung befindliche SYBR Green-Moleküle kein Licht absorbieren können. In der kleinen Furche doppelsträngiger DNA gebundener Farbstoff kann jedoch nach Anregung fluoreszieren kann.

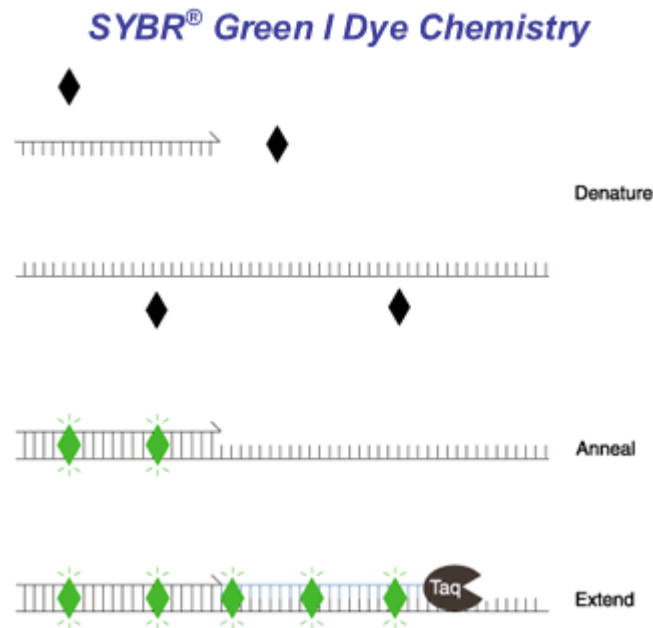


Abb. 5.5.1.6. Einlagerung von SYBR-Green in doppelsträngige DNA

Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen.

Wie bei der Endpunkt-PCR findet auch hier die Amplifikation zunächst exponentiell statt, erreicht jedoch durch nachlassende Polymeraseaktivität oder -verbrauch der übrigen Reagenzien ein Plateau. Für die Quantifizierung ist es wichtig, dass in der exponentiellen Phase gemessen wird.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem Threshold Cycle/ C_T -Wert, denn zu diesem Zeitpunkt verläuft die PCR exponentiell. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programm Opticon Monitor.

5.5.2. Analyse der Transkription mittels *Microarray*-Analyse

DNA-Microarrays finden zunehmend Anwendung in der Genomanalyse, der Diagnostik und bei Untersuchungen in der differentiellen Genexpression. DNA-Microarrays dienen dazu, die mRNA-Menge bestimmter Gene oder rRNA bestimmter Organismen nachzuweisen.

Die Microarray-Technologie wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Charakterisierung der Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL nach viraler Infektion mit GLV-1h68 angewandt. Dafür wurde die total RNA von uninfizierten und GLV-1h68 infizierten (5×10^6 pfu / 1×10^8 pfu) 888-MEL und 1936-MEL Xenografttumoren einen Tag nach GLV-1h68-Infektion mit Hilfe des RNeasy Mini kit (Qiagen) entsprechend dem beigefügten Protokoll isoliert. Die total RNA wurde zu anti-sense RNA (aRNA) amplifiziert und die Qualität beider Proben (total RNA und anti-sense RNA) wurde mit Hilfe des *Confidence Agilent Bioanalyzer 2000* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) analysiert.

Die Analyse der RNA Proben wurde mit freundlicher Unterstützung von Andrea Worschech am Institut Infectious Disease and Immunogenetics Section am Department of Transfusion Medicine (IDIS), Clinical Center, National Institute of Health, Bethesda, USA durchgeführt.

Whole genome mouse 36 k oligo arrays wurden direkt in dem Institut Infectious Disease and Immunogenetics Section am Department of Transfusion Medicine (IDIS), Clinical Center, National Institute of Health, Bethesda, USA gedruckt unter Nutzung von Oligos, welche von Operon (Huntsville, AL) erworben wurden. Das Operon Array-Ready Oligo Set (AROS™) V 4.0 beinhaltet 35852 longmer Proben, welche 25000 Gene repräsentieren und ca. 38000 Gentranskripte. Weiterhin beinhalten diese auch 380 Kontrollen. Das Design basiert auf Ensembl Mouse Database release 26.33b.1, Mouse Genome Sequencing Project, NCBI RefSeq, Riken full-length cDNA clone sequence, und weiteren Genbank Sequenzen. Ein Microarray besteht aus 48 Blockeinheiten, wobei ein Spot je Probe auf einem Träger gedruckt wurde.

Whole-genome human 36K oligo arrays, repräsentieren 25100 Gene des Operon Human Genome Array-Ready Oligo Set version 4.0. Diese wurden ebenfalls im Institut Infectious Disease and Immunogenetics Section of Transfusion Medicine, Clinical Center, National Institute of Health, Bethesda, USA gedruckt. Das Design dieser Arrays basiert auf Ensembl Human Database build NCBI-35c, mit kompletter Abdeckung des NCBI human Refseq dataset (04/04/2005).

Mausreferenz-RNA wurde durch Homogenisierung folgender Mausgewebe gewonnen: Lunge, Herz, Muskel, Nieren und Milz. Es wurden Homogenisate dieser fünf Organe von vier verschiedenen Tieren hergestellt, und die fünf Einzelproben jeweils eines Organs vereint.

Humane Referenz-RNA wurde aus humanen PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), welche aus gesunden Donoren isoliert wurden

Referenz-RNA und Test-RNA wurde direkt mittels des ULS aRNA Fluorescent labeling Kit (Kreatech, Netherlands) mit Cy3 für Referenz-RNA und Cy5 für Test-RNA angefärbt.

Hybridisierung beider Array-Plattformen erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 18-24 Stunden und anschließend wurden die Arrays zunächst gewaschen und daraufhin am Gene Pix 4000 scanner mit variablem PMT eingescannt, um eine optimale Signalintensitäten mit minimaler (< 1% Spot) Intensitätssättigung zu erreichen.

Die Ergebnisse wurden in eine speziell dafür generierte Datenbank (mAdb databank (<http://nciarray.nci.nih.gov>)) hochgeladen, bevor weitere Analysen mit Hilfe des BRBArrayTools (Biometric Research Branch, National Cancer Institute/ <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) durchgeführt werden konnten. Zur Auswertung der Daten wurden weiterhin Cluster und Treeview Software genutzt.

5.6. Histologie und Fluoreszenzmikroskopie

5.6.1. Agarose-Schnitt-Technologie

Für Histologiestudien wurden die Tumore entnommen und ÜN mit Fixativ (4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4) bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden die Proben dreimal für je 30 min bei RT in PBS gewaschen. Darauf folgte die Einbettung der zuvor halbierten Tumore in 5 % (w/v) low melt Agarose in PBS.

Nach Aushärtung der Agarose wurden die Proben mit Hilfe eines Vibratoms geschnitten. Es wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 100 µm angefertigt. Bevor die Schnitte mit Antikörper angefärbt werden konnten, mussten zunächst die Schnitte permeabilisiert und unspezifische Bindungen abgesättigt werden. Dies erfolgte durch Inkubation mit 1x PBS mit 0,3 % Triton X-100 und 5 % FKS.

Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (1:100 in PBS mit 0,3 % Triton X-100) erfolgte ÜN bei RT auf dem Schüttler. Nach drei zehninütigen Waschschritten in 1 x PBS, konnte mit der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:200 in PBS mit 0,3 % Triton X-100) fortgefahren werden. Die Inkubationsdauer betrug hierbei 5 Stunden.

Darauf folgend wurden die Schnitte fünfmal für 10 min in 1 x PBS gewaschen und dann ÜN in 60 % bei 4 °C gelagert. Am darauf folgenden Tag konnten die Schnitte in 80%iger Glycerol in 1 x PBS auf Objektträgern eingebettet werden.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenzmikroskop (Leica, MZ16F). Durch eine angeschlossene CCD-Kamera (Leica, DC500) konnten Aufnahmen von einzelnen Gewebeschnitten angefertigt werden, welche mittels der zugehörigen Software Leica IM1000 4.0 ausgewertet wurden, und gegebenenfalls durch Adobe Photoshop 7.0 [76] weiter bearbeitet wurden.

Zum anderen wurden Aufnahmen auch am TCS SP2 Konfokalen Mikroskops (Leica) angefertigt. Das konfokale Laser-Scanning Mikroskop ist mit einem Argon/Krypton Laser (488 nm, 568 nm, 647 nm), einem Helium/Neon Laser (633 nm) und einem Diode Laser (405 nm) ausgestattet. Die Intensitäten der von den Lasern emittierten Wellenlängen wurden separat eingestellt.

Die erstellten 8-bit Einzelbilder (1024x1024 Pixel) wurden mit Hilfe des Bearbeitungsprogramms Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet, überlagert und als RGB Farbbild gespeichert.

5.6.2. Paraffin-Schnitt-Technologie

Parallel zur Agarose-Schnitt-Technologie ermöglicht auch eine Einbettung von Tumorgewebe in Paraffin Gewebeschnitte von soliden Tumoren anzufertigen. Die Paraffin-Einbettung erfordert eine

aufwendigere Vorbearbeitung des Gewebes, verglichen zur Agarose-Schnitt-Technologie, jedoch wird eine sehr gute Strukturhaltung erzielt und es können Schnitte von bis zu 10 µm hergestellt werden.

5.6.2.1. Fixierung und Dehydrierung des Tumorgewebes

Vor der Fixierung des Tumorgewebes wurden Gewebeschnitte von ca. 3 mm Durchmesser angefertigt, in Rotilabo ®-Kassetten für Biopsien eingespannt und ÜN bei RT in 10 % Formalin-Lösung fixiert. Die Dehydrierung des Gewebes erfolgte durch eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe. Hierzu wurden die Gewebeproben für jeweils 1 h in den folgenden Lösungen inkubiert:

1. 0,9 % NaCl
2. 30 % EtOH in 0,9 % NaCl
3. 50 % EtOH in 0,9 % NaCl
4. 70 % EtOH in H₂O
5. 90 % EtOH in H₂O
6. 100 % EtOH

Die Proben konnten bis zur Weiterverarbeitung in 100 % EtOH bei -20 °C gelagert werden.

5.6.2.2. Paraffineinbettung der Gewebeproben

Bevor das Gewebe in reines Paraffin eingebettet werden kann, werden die Gewebeproben für jeweils 1 h in den folgenden Lösungen vorbehandelt:

1. 100 % EtOH, RT
2. EtOH/Xylol (1:1 Gemisch), RT
3. Xylol, RT
4. Xylol/Paraffin, 58 °C
5. Paraffin, 58 °C

Die Behandlung mit reinem Paraffin bei 58 °C erfolgt mit dreimaligem Wechsel der Paraffin-Lösung für drei Stunden, um eine vollständige Infiltrierung des Gewebes mit Paraffin sicherzustellen. Beim letzten Wechsel des Paraffinbades wurden die Gewebeproben dann in spezielle Einbettformen gegeben und mit flüssigem Paraffin übergossen, welche dann zu Paraffin-Blöcken aushärten konnten. Mit diesen Paraffinblöcken konnten dann Gewebeschnitte der gewünschten Schnittdicke präpariert werden.

5.6.2.3. Anfertigung der Gewebeschnitte

Die optimalen Bedingungen und Einstellungen am Mikrotom mußten an die Qualität des Gewebematerials angepasst werden. Die Blöcke wurden in die vorgesehene Fixierungsapparatur eingespannt, und der Block wurde solange geschnitten, bis eine einheitliche Schnittfläche durch das

gesamte Gewebe entstanden war. Die folgenden seriellen Schnitte wurden vom Messer mithilfe eines Pinsels vorsichtig entfernt und in ein kaltes Wasserbad überführt. Anschließend wurden die Schnitte in ein erwärmtes Wasserbad gegeben (40- 50 °C). Durch die erhöhte Temperatur kam es zur Expansion des Paraffins und schließlich zur Streckung der Gewebepreparate, welche dann vorsichtig auf einen Glasobjektträger aufgebracht werden konnten. Die Schnitte wurden zunächst auf einer Heizplatte getrocknet und schließlich ÜN in einem Heisschrank (37 °C) inkubiert.

Diese getrockneten Paraffinschnitte konnten an einem trockenen kühlen Ort (4-20 °C) gelagert werden.

5.6.2.4. Deparaffinierung und Rehydrierung

Die Deparaffinierung erfolgte durch Wärmebehandlung bei 55°C für 10 min. Nach Entfernen des überschüssigen Paraffins konnte die Rehydrierung der Gewebeschnitte durch eine Xylol Vorbehandlung und eine anschließende, in der Konzentration absteigende Alkoholreihe erfolgen:

1. Xylol, 3 min
2. Xylol, 3 min
3. Xylol, 3 min
4. 100 % EtOH, 3 min
5. 100 % EtOH, 3 min
6. 100 % EtOH, 3 min
7. 95 % EtOH in H₂O, 3 min
8. 80 % EtOH in H₂O, 3 min
9. H₂O, 5 min

5.6.2.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, insbesondere Zellkerne blau, wohingegen der synthetische Farbstoff Eosin zu einer Rotfärbung aller basischen Strukturen, wie zum Beispiel der Zellplasmaproteine führt. Dabei wurden folgende Färbeschritte durchgeführt:

1. Hämatoxylin, 3 min
2. Waschen der Objektträger in H₂O_{bidest}
3. Leitungswasser, 5 min
4. Schnelles Eintauchen (8-12 mal) in 70 % EtOH + 0,25 % konzentrierte HCl
5. Zweimaliges waschen in Leitungswasser, 1 min

6. Waschen in H₂O_{bidest}, 2 min
7. Eosin, 30 sec

Um das überschüssige Wasser aus den Gewebeschnitten zu verdrängen, war eine Dehydrierung nötig. Dies wurde durch eine ansteigende Ethanolreihe erzielt.

1. 95 % EtOH, 5 min
2. 95 % EtOH, 5 min
3. 95 % EtOH, 5 min
4. 100 % EtOH, 5 min
5. 100 % EtOH, 5 min
6. 100 % EtOH, 5 min
7. Xylol, 15 min
8. Xylol, 15 min
9. Xylol, 15 min

Um die Gewebeschnitte für eine dauerhafte Lagerung fixieren zu können wurden die Schnitte in der organischen Einbettlösung Permount fixiert

5.6.2.6. Anfärbung der Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern

Für die immunhistologische Färbung wurde das VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) verwendet. Hierbei wurden im initialen Schritt unspezifischer Bindungsstellen durch Serum-Inkubation (20 min) blockiert, um in der anschließenden Inkubation mit dem Primär-Antikörper eine spezifische Bindung zu ermöglichen. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in PBS gewaschen (5 min) und mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper inkubiert (30 min, Verdünnung nach Anleitung des VECTASTAIN Elite ABC Kits). Nach einem erneuten Waschschrift (PBS, 5 min) erfolgte die Antikörperdetektion mittels des Peroxidase-Systems (30 min, VECTASTAIN Elite ABC Reagent). Die Präparate wurden gewaschen (PBS, 5 min) und die Farbreaktion durch Zugabe des Substrats (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate, Verdünnung nach Anleitung im Kit, 2-10 min) hervorgerufen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift (PBS, 5 min).

Für die spätere Identifizierung von Gewebestrukturen erfolgte eine Gegenfärbung mit Vector Hematoxylin QS (5-45 sec). Die gefärbten Präparate wurden in Leitungswasser gespült und erneut dehydriert (3 mal 100 % EtOH für 1 min, 3 mal Xylol für 3 min). Zur Fertigstellung der Dauerpräparate wurden die Schnitte in der organischen Einbettlösung Permount fixiert.

6 Ergebnisse

6.1 Histologische Charakterisierung der frühen Phase einer GLV-1h68 Infektion in Melanomzelltumoren im Xenograftmodell

Obwohl onkolytische Viren zunehmend Anwendung als Tumorthapeutikum finden, ist der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht erschlossen. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, notwendige stromale Parameter und/oder Tumorzell-vermittelte Signale für eine effiziente Infektion mit GLV-1h68 und auch die anschließende schnelle und homogene virale Ausbreitung im Tumor zu charakterisieren.

Das Tumormikromilieu ist immer geprägt durch die Spezies und durch das jeweilige Organ, in dem der solide Tumor wächst. Dadurch bedingt sich die spezifische Tumorarchitektur, und diese kann Infektions- und Replikationsverhalten des VACV beeinflussen. Um diese speziesspezifische und organspezifische Beeinflussung auf das Tumorstroma auszuschließen, wurde die vorliegende Studie mit einem autologen Tumorzellsystem durchgeführt. Dabei handelt es sich um zwei Melanomzelllinien (888-MEL und 1936-MEL), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs aus wiederkehrenden Metastasen einer einzelnen Patientin (Patient 888) gewonnen wurden [71, 77]. Dabei ist bei 888-MEL-Tumoren nach GLV-1h68-Infektion ein regredierendes Verhalten der Tumore zu beobachten (*responder*; therapeutischer Index: 88,0), wohingegen 1936-MEL-Tumore nach Infektion ein nur minimal verlangsamtes Wachstum zeigen und das Tumolvolumen konstant zunimmt (*poor-responder*; therapeutischer Index: 13,7).

Die Tatsache, dass beide Zelllinien, unterschiedlich auf GLV-1h68-Therapie ansprechen, obwohl sie aus demselben Patienten entstammen, macht sie zu einem optimalen Modellsystem, um essentielle Grundlagen einer effizienten GLV-1h68-Infektion und Replikation zu untersuchen.

6.1.1 Charakterisierung der GLV-1h68-Infektion *in vitro*

6.1.1.1 Morphologische Untersuchung der Melanomzellen

Um ein grundlegendes Verständnis der viralen Replikation von GLV-1h68 in den beiden Zelllinien, 888-MEL und 1936-MEL, zu erlangen, bieten sich Fluoreszenzmikroskopie infizierter Zellen und als quantitative Methode, Plaque Assay Analyse von Zelllysaten infizierter Zellen an.

Um die daraus resultierenden Ergebnisse besser interpretieren zu können, empfiehlt es sich, durch mikroskopische Durchlichtaufnahmen die Morphologie der Zellen zunächst zu studieren.

Dafür wurden die beiden Zelllinie jeweils separat in eine Petrischale ausgesät und nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz Aufnahmen des Zellrasens am Mikroskop gemacht.

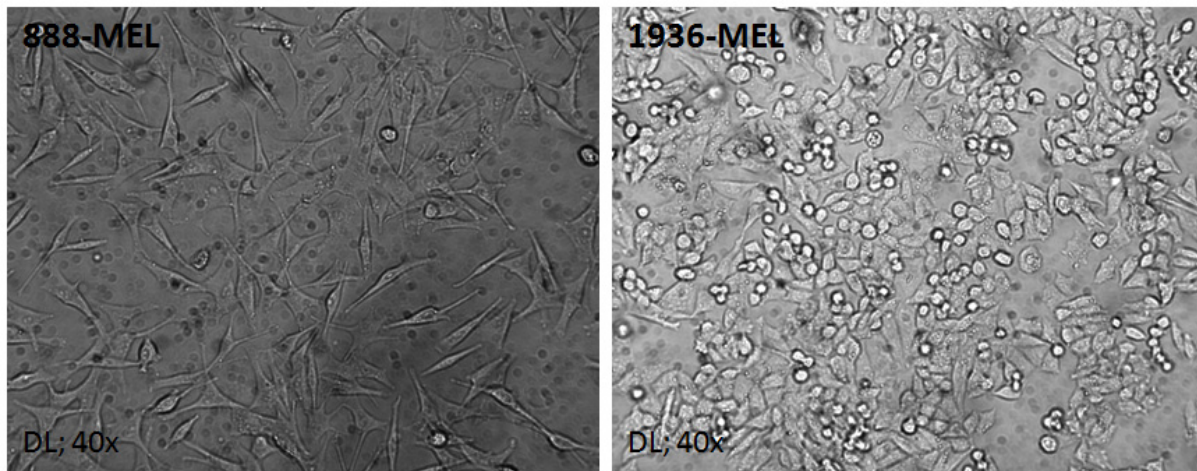


Abb.6.1.1.1: Morphologische Studien unifizierter 888-MEL und 1936-MEL-Zellen

888-MEL-Zellen (links) und 1936-MEL-Zellen (rechts) wurden separat in Petrischalen ausgesät, und nach

Auffällig war dabei, dass sowohl 888-MEL, als auch 1936-MEL-Zellen die Melanin-bedingte Braunfärbung, wie sie für zahlreiche Melanomzelllinien beschrieben wird, verloren hatten.

In der Zellform unterschieden sich die beiden Zelllinien stark voneinander. Während 888-MEL-Zellen spindelförmig und vergleichsweise groß waren, waren 1936-MEL-Zellen kugelförmig und nahmen nur ca. ein Drittel der Fläche einer 888-MEL-Tumorzelle ein.

Entscheidend für die Ausbreitung eines Virus ist der Kontakt der Zellmembranen, da die Ausbreitung der Viren zu einem wesentlichen Teil über CEVs (cell-associated enveloped virus) und IMVs (intracelluläre mature virus), welche nach Lyse der Zellen sezerniert werden, stattfindet.

Bei 888-MEL-Zellen ist kein Kontakt aller Zellmembranen gewährleistet, da die Zellen ungeordnet über und untereinander wachsen und dadurch keinen einheitlichen Zellrasen ausbilden. Dies kann eine Ausbreitung der Infektion über die Zellmembranen erschweren.

Bei 1936-MEL hingegen bildet sich ein dichter Zellrasen aus, wobei der Großteil der Zellmembranen dicht aneinander liegt, was eine Virusausbreitung begünstigt.

6.1.1.2 Fluoreszenzmikroskopie GLV-1h68-infizierter 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen

Um optisch verfolgen zu können, wie das Virus sich *in vitro* in den beiden Melanomzelllinien 888-MEL und 1936-MEL ausbreitet, wurde die Virus-vermittelte GFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop über eine Zeitspanne von 48 h verfolgt.

Dafür wurden zunächst 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen jeweils separat in 24-well-Platten ausgesät, und nach Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit GLV-1h68 (MOI 0,01) infiziert. Zu

definierten Stundenwerten nach der Infektion (6, 12, 24 und 48 hpi) wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop von den infizierten Zellen angefertigt. Um auch hierbei die Zellmorphologie berücksichtigen zu können, wurde zusätzlich eine Durchlichtaufnahme zu jedem Stundenwert angefertigt.

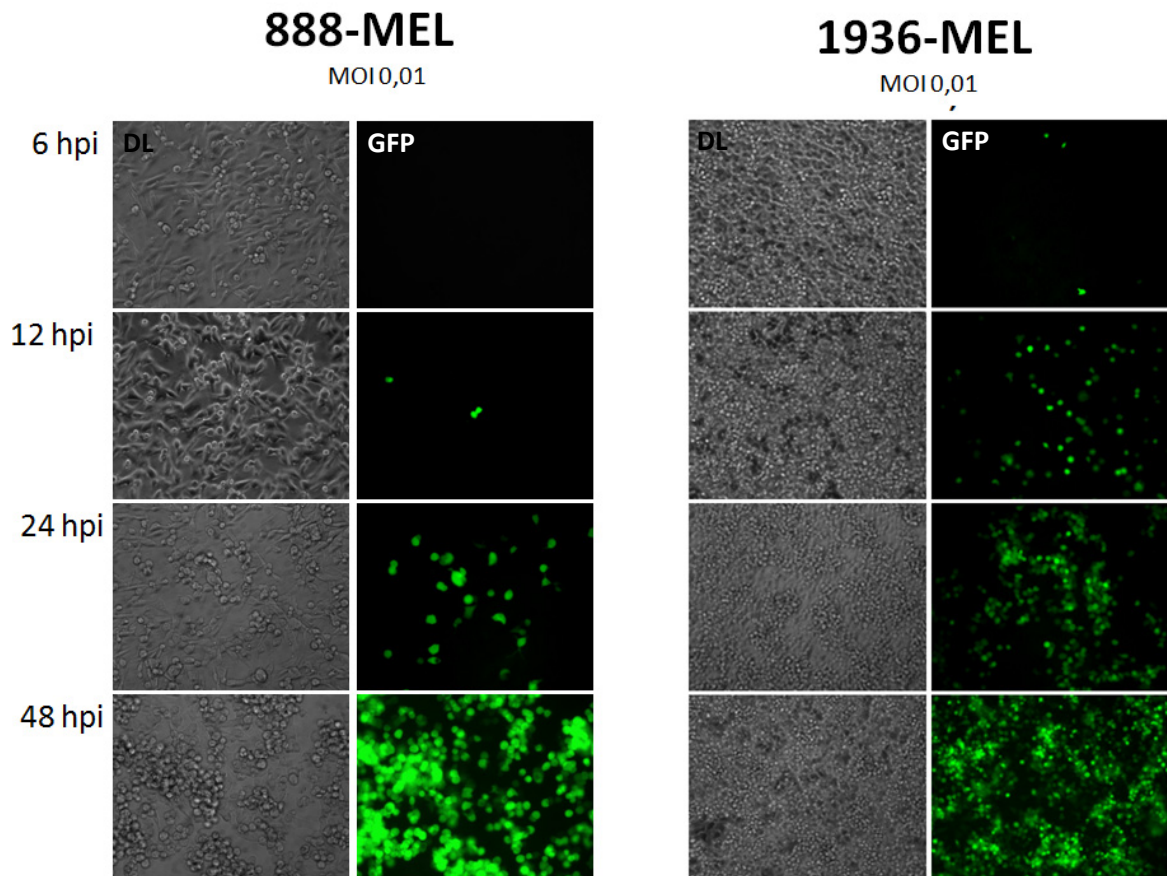


Abb.6.1.1.2: GFP-Expressionsstudien von 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen nach Infektion mit GLV-1h68

888-MEL-Zellen (links) und 1936-MEL-Zellen (rechts) wurden ausgesät und nach Erreichen von 80 % Konfluenz mit GLV-1h68 infiziert (MOI 0,01); 6, 12, 24 und 48 hpi wurden Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop gemacht; durch die Fluoreszenzaufnahme wurde die GFP-Expression dokumentiert. Zudem wurde jeweils eine DL-Bild angefertigt.

Es wurde beobachtet, dass sich die beiden Zelllinien *in vitro* mit gleicher Effizienz infizieren ließen. In beiden Fällen wurde ein einheitliches, sehr intensives Virus-bedingtes GFP-Signal festgestellt.

Dies ist unerwartet, da dieses Zelllinienpaar (auf Grund seiner therapeutischen Indices) beschrieben wurde *in vivo* auf GLV-1h68-Infektion deutlich anders zu reagieren: bei soliden 888-MEL-Tumoren erfolgt eine einheitliche Infektion mit Tumorregression, wohingegen in den 1936-MEL-Tumoren ein lokales, *patch*-artiges Ausbreitungsmuster beschrieben wurde, was sich bis zu späten Zeitpunkten der Infektion nicht ändert. Dies hat ein konstantes Tumorwachstum zur Folge.

Bei 888-MEL sind erste Virus-infizierte Zellen 12 hpi erkennbar, wohingegen bei 1936-MEL schon nach 6 h erste GFP-exprimierende Zellen zu erkennen waren.

6.1.1.3 Replikationsanalyse von GLV-1h68 in 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen

Um eine Quantifizierung der Virusreplikation *in vitro* vornehmen zu können, wurden Plaque Assay-Analysen von Überständen und Zelllysatsproben GLV-1h68-infizierter 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Zellen durchgeführt.

Dafür wurden separat 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen in 24-well-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit GLV-1h68 (MOI 0,01) infiziert. 6, 12, 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurde zum einen 1 ml des Überstand abgenommen, und zum anderen durch Trypsinisieren ein Zelllysats der infizierten Melanomzellen erzeugt.

Diese Proben wurden nach 3 freeze/thaw-Zyklen mittels Plaque Assay analysiert, um so den viralen Titer in jeder Probe bestimmen zu können. Der Versuch wurde im Triplet durchgeführt.

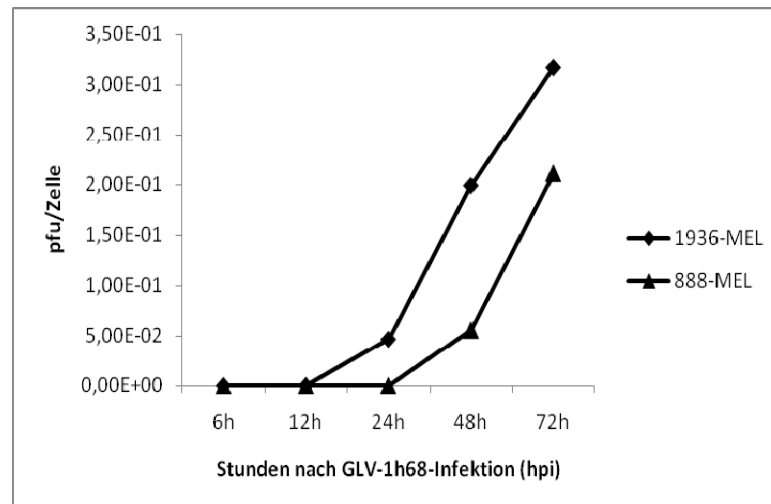


Abb.6.1.1.3: Replikationsverhalten von GLV-1h68 in 888-MEL und 1936-MEL *in vitro*

888-MEL- und 1936-MEL-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, und bei 80 % Konfluenz mit GLV-1h68 infiziert (MOI 0,01); 6, 12, 24, 48 und 72 hpi wurde der Überstand abgenommen, und durch Trypsinisieren der infizierten Zellen ein Zelllysate erzeugt. Der virale Titer wurde mittels Plaque Assay bestimmt. Der Ansatz erfolgte im Triplet. Dargestellt wurden pfu/Zelle zu den definierten Zeitpunkten nach Infektion.

Das Plaque Assay-Ergebnis (Abb. 6.1.1.3) bestätigte die Beobachtung der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 6.1.1.2): sowohl in 888-MEL-Zellen als auch in 1936-MEL-Zellen erfolgt eine effiziente Replikation von GLV-1h68. Vergleicht man den Verlauf der beiden Kurven, zeigt der Kurvenanstieg ein identisches exponentielles Replikationsverhalten in beiden Zelllinien. Ähnlich wie bei den Fluoreszenzaufnahmen, ist auch hier das Einsetzen der viralen Replikation bei 888-MEL verzögert und erst nach 24 h nachweisbar, wohingegen es bei 1936-MEL bereits 12 hpi beginnt. Erklären lässt sich dies durch die unter 6.1.1.1 beschriebene Zellmorphologie der 888-MEL-Zellen, welche die Ausbildung eines einheitlichen Zellrasens verhindert und somit die Ausbreitung der Infektion verlangsamt.

Sowohl das Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie, wie auch die Daten der Plaque Assay-Analyse, geben einen ersten Hinweis darauf, dass die *in vivo* beobachtete unterschiedliche virale Ausbreitung durch Komponenten der Tumormikroumgebung moduliert wird.

6.1.2 Charakterisierung der GLV-1h68-Infektion *in vivo*

Um die Parameter der tUmormikroumgebung, welche die Ausbreitung des Virus im Tumor essentiell beeinflussen, determinieren zu können, wurden weitere Studien im Mausmodell durchgeführt. Dabei wurden Nacktmäusen solide 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumore implantiert, und diese sowohl vor als auch nach GLV-1h68-Injektion charakterisiert.

6.1.2.1 Einfluss der Melanomzellimplantation auf das Körpergewicht

In einem ersten Versuch sollte der Einfluss der Tumorzellimplantation auf den gesamten Organismus untersucht werden, unabhängig von jeder weiteren Belastung einer Virusinfektion mit GLV-1h68.

Dafür wurde Mäusen ein 888-MEL- (4×10^6 888-MEL-Zellen) bzw. 1936-MEL- ($7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen) Tumor implantiert, und ab dem Zeitpunkt der Implantation wurde bis hin zu 32 Tage nach Implantation das Körpergewicht der Tiere gemessen.

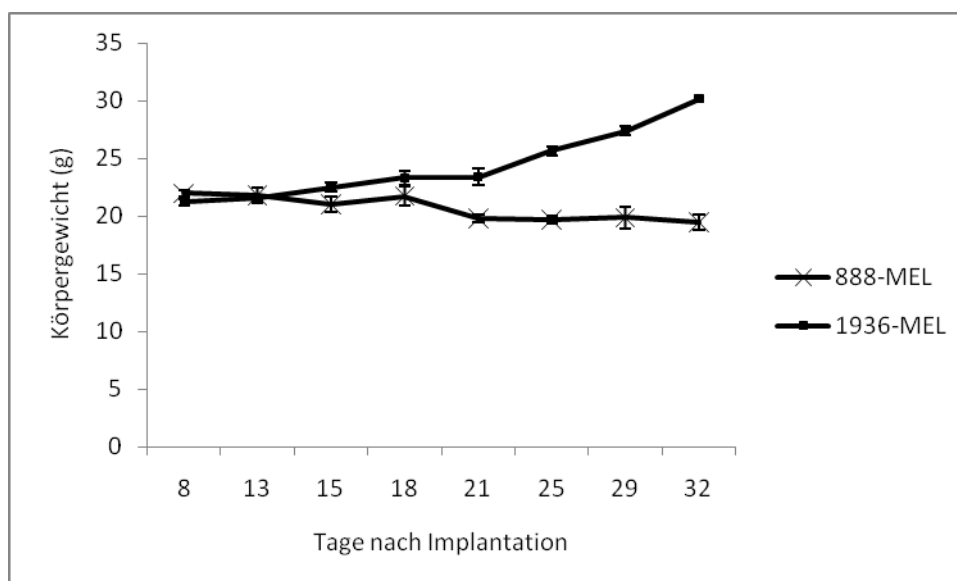


Abb.6.1.1.2: Auswirkungen der Implantation von 888-MEL oder 1936-MEL auf das Körpergewicht

Nach Implantation von 4×10^6 888-MEL-Zellen und $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen wurde der Einfluss der Implantation auf das Körpergewicht bis 32 Tage nach Implantation dokumentiert.

Bei Vergleich der beiden Gewichtskurven von 888-MEL- und 1936-MEL-Tumor-tragenden Mäusen, zeigte sich, dass die Tiere, welchen 888-MEL-Tumore implantiert wurden, konstant an Gewicht verloren.

Dieser starke Gewichtsverlust parallel zu einem anwachsenden Tumor wurde in der Literatur für Tumorzellen mit einem erhöhten metastatischen Potential beschrieben [78] und dürfte auch bei 888-MEL ein Indiz für metastatische Aktivität sein.

6.1.2.2 Replikationsanalyse von GLV-1h68 in soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren

Es wurde beschrieben, dass solide 888-MEL-Tumore regredierend auf eine GLV-1h68-Injektion reagieren (*responder*), 1936-MEL-Tumore aber konstant weiterwachsen und nur ein geringfügig verlangsamtes Wachstum zeigen (*poor-responder*). Dies sollte in diesem Versuch überprüft werden, und das genaue Regressionsverhalten bis 42 Tage post Infektion beschrieben werden.

Dafür wurden den Tieren 888-MEL- (4×10^6 888-MEL-Zellen) bzw. 1936-MEL- ($7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen) Tumore implantiert, und bei Erreichen einer Größe von 150-200 mm³ wurden die Tiere mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 infiziert. Das Tumolvolumen wurde alle 7 Tage mittels eines Messschiebers gemessen und in einer Wachstumskurve aufgetragen.

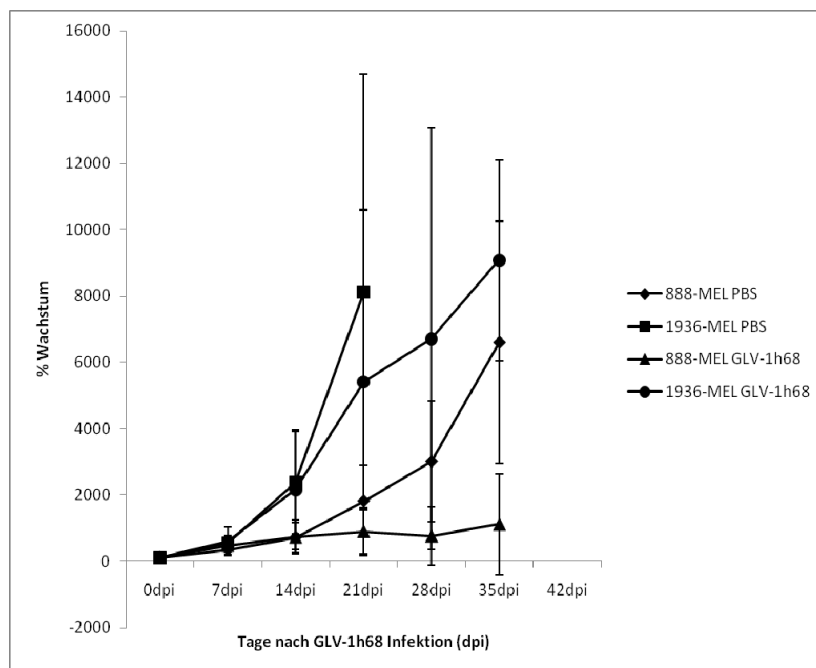


Abb.6.1.2.2: Tumorumfängen von GLV-1h68- bzw. mock-infizierten soliden 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren bis 42 dpi

Nach Implantation von 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen, wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 150 mm³ GLV-1h68 infiziert bzw. mock-infiziert und das Tumorstadium bis 42 dpi dokumentiert.

Das in Abbildung 6.1.2.2 dokumentierte Tumorstadium entspricht dem bereits in früheren an GLV-1h68-Studien beschriebenen Tumorstadium von respondierenden und nicht-respondierenden Tumoren.

Generell sind 888-MEL-Zellen *in vivo* deutlich langsamer proliferierend als 1936-MEL-Zellen, was sich durch den deutlichen Größenunterschied zwischen den mock-infizierten 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren zeigt.

Vergleicht man die Wachstumskurven mock- und GLV-1h68-infizierter Tiere in einer Gruppe, so ist bei 888-MEL mock-infizierten Tieren ein konstantes Wachstum bis zu Tag 42 erkennbar, und bei GLV-1h68 infizierten 888-MEL-Tumor tragenden Tieren findet nach 14 dpi ein Wachstumsarrest mit einer anschließenden Regression der Tumore statt.

Unmittelbar nach der Virusinjektion ist 7 dpi aber zunächst noch deutlich ein Anschwellen der GLV-1h68-infizierten 888-MEL-Tumore zu erkennen, wie es beispielsweise auch für GI-101A Tumore beschrieben wurde [72], dass aus der verstärkten Infiltration mit Immunzellen, bedingt durch die Infektion, resultieren kann.

Beim Vergleich von mock- und GLV-1h68-infizierten 1936-MEL-Tumoren war in beiden Fällen eine extreme Zellproliferation zu beobachten. Auch eine Infektion mit GLV-1h68 konnte darauf keinen Einfluss nehmen, und so war nach Virusinjektion, verglichen mit uninfizierten Tumoren nur ein minimal verlangsamtes Wachstum der soliden 1936-MEL-Tumore zu erkennen.

6.1.2.3 Verteilungsmuster der Viren im Tumor

Zur weiteren histologischen Charakterisierung einer GLV-1h68-Infektion in diesem autologen Melanomzellsystem sollte die Virusausbreitung im Tumor analysiert werden. Primär sollte dies zu frühen Zeitpunkten der GLV-1h68-Infektion erfolgen. Dennoch wurde aber in dieser ersten Untersuchung die Virusausbreitung auch bis hin zum späten Infektionsstadium beschrieben.

Das experimentelle Vorgehen war folgendermaßen: Mäusen wurden 888-MEL- (4×10^6 888-MEL-Zellen) bzw. 1936-MEL- ($7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen) Tumore implantiert, und bei einer Tumorgroße von 150-200 mm³ wurden die Tiere mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 infiziert. Zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion (7, 21, 42 dpi) wurden Aufnahmen der kolonisierten Tumore unter dem Stereomikroskop angefertigt.

Um das Ausmaß der Virusinfektion quantifizieren zu können, wurde mit Hilfe von Gewebeschnitten die Fläche GFP-positiver-Zellen als Indikator einer Virusinfektion gemessen.

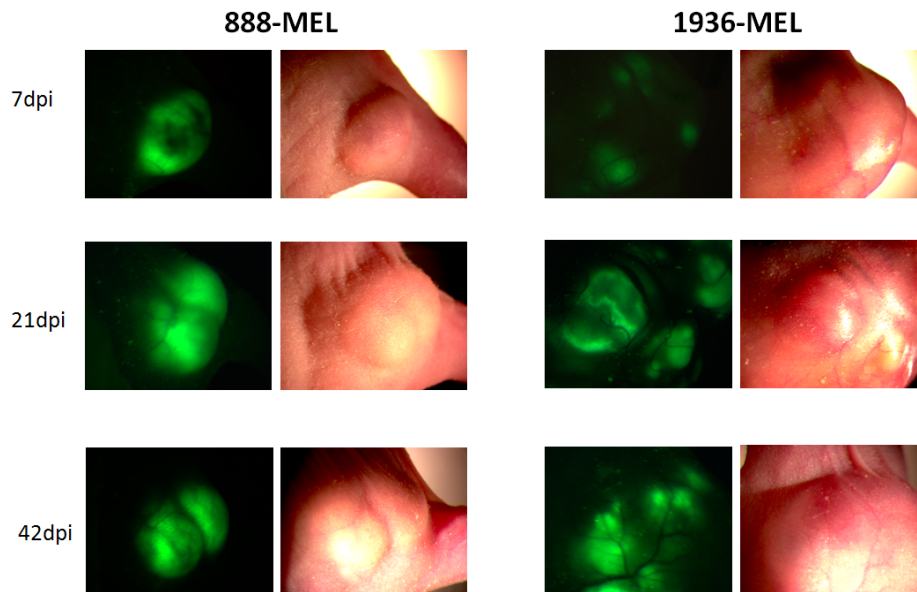


Abb.6.1.2.3 A: GFP-Expression zur Darstellung der Virusausbreitung von GLV-1h68 in soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren

Nach Implantation von 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen, wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 150 mm^3 GLV-1h68-infiziert bzw. mock-infiziert und die GFP-Expression bis 42 dpi dokumentiert.

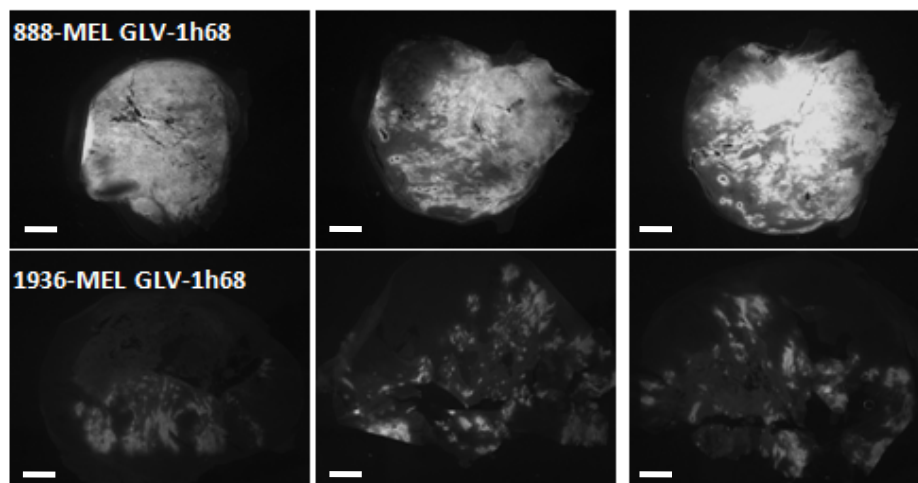


Abb.6.1.2.3 B: GFP-Expression zur Darstellung der Virusausbreitung von GLV-1h68 in soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren – 8-bit-Graustufenbilder für anschließende Auswertung mit ImageJ

oben: 888-MEL-Tumor-tragender Mäuse; GLV-1h68-infizierte (3 unterschiedliche Tumore). unten: 1936-MEL-Tumor-tragender Mäuse; GLV-1h68-infizierte (3 unterschiedliche Tumore). Stereomikroskopische Aufnahmen der GFP-Expression wurden in 8-bit-Graustufenbilder umgewandelt, womit die anschließende Analyse mit ImageJ erfolgte. Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

In Abbildung 6.1.2.3 A und B ist eine frühzeitige, komplette Virus-Kolonisierung des 888-MEL-Tumors zu erkennen. Bereits 7 dpi ist der gesamte Tumor kolonisiert. Quantitative Analysen unterstützen diese optische Darstellung der Virusausbreitung 7 dpi, und zeigten, dass 67,93% +/- 19,99 der gesamten Tumorfläche GFP-positiv war und damit GLV-1h68-infiziert.

Anders verhielt es sich bei den soliden 1936-MEL-Tumoren. Abbildung 6.1.2.3 A zeigt ein *patch*-förmiges Verteilungsmuster durchgängig bis 42 dpi. Diese Viruspatches nehmen 7 dpi 4,13% +/- 2,08 der gesamten Tumorfläche ein und somit bedeutend weniger als in 888-MEL-Tumoren. Die Ausbreitung des Virus im 1936-MEL-Tumor bleibt somit signifikant ($p = 5,71E-5$) hinter der Ausbreitung im 888-MEL-Tumor zurück

6.1.2.4 Analyse der Virusaufnahme in soliden 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren

Ein möglicher Grund, weshalb 7 dpi signifikant weniger Virus in 1936-MEL-Tumoren zu finden war als in 888-MEL-Tumoren, könnte eine unterschiedlichen initiale Dosis sein, die den Tumor nach systemischer Applikation erreicht.

Die Eintrittspforte für das Virus in den Tumor sind die Blutgefäße. Von dort aus beginnt sich die Virusinfektion auszubreiten (Abb.6.1.2.4 A). Blutgefäße können im Tumor stark abweichend von ihrer nativen Form und Struktur auftreten. So zeigen Tumore beispielsweise unterschiedliche Vaskularisierungsstadien und modifizieren somit die Blutmenge die einen Tumor durchströmt. Weiterhin spielt Vasodilatation und Permeabilität der Gefäße eine entscheidende Rolle.

Diese verschiedenen Parameter können die Menge an Viruspartikeln modifizieren, die aus dem zirkulierenden Blut in den Tumor aufgenommen werden.

Um zu überprüfen, ob möglicherweise in soliden 888-MEL-Tumoren in den ersten 24 h effizienter Virus aufgenommen wird als in 1936-MEL-Tumoren, und sich somit später auch der höhere virale Titer erklären lässt, wurde in zwei voneinander unabhängigen Studien, die Anzahl der viralen Partikel bestimmt die 1 dpi, vom Tumor aufgenommen wird.

Dies erfolgte zum einen mittels Plaque Assay Analyse von Tumorlysaten. Diese 888-MEL- bzw.1936-MEL-Tumore wurden bei einer Größe von 150-200 mm³ mit 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu GLV-1h68 infiziert, und 1 dpi wurden die Mäuse getötet und die Tumore entnommen. Die Tumore wurden lysiert, und mit diesen Lysaten wurde anschließend eine Analyse des viralen Titers mittels Plaque Assay durchgeführt.

Zum anderen erfolgte die Analyse der eingelagerten viralen Partikel indirekt durch *real-time*-RT-PCR. Auch hier wurde den Mäusen 888-MEL-, bzw.1936-MEL-Tumorzellen implantiert und bei ausreichendem Tumolvolumen mit 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu GLV-1h68 infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden die Mäuse getötet, die Tumore entnommen und RNA isoliert, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. In der anschließenden *real-time*-RT-PCR wurde mit Hilfe von

spezifischen Primern für die GFP-Gensequenz indirekt die Menge der eingelagerten Viruspartikel bestimmt.

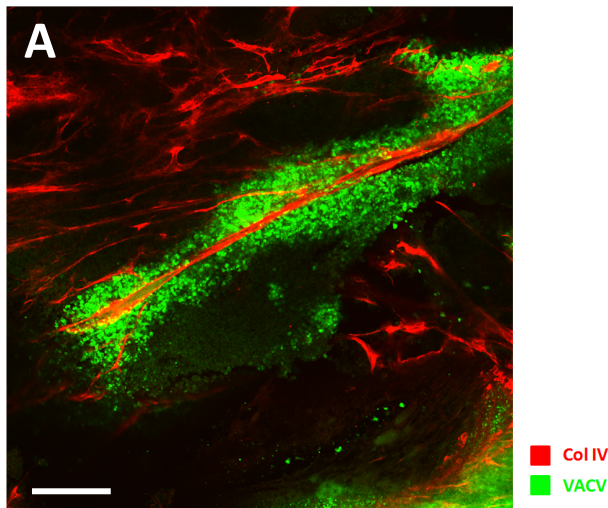
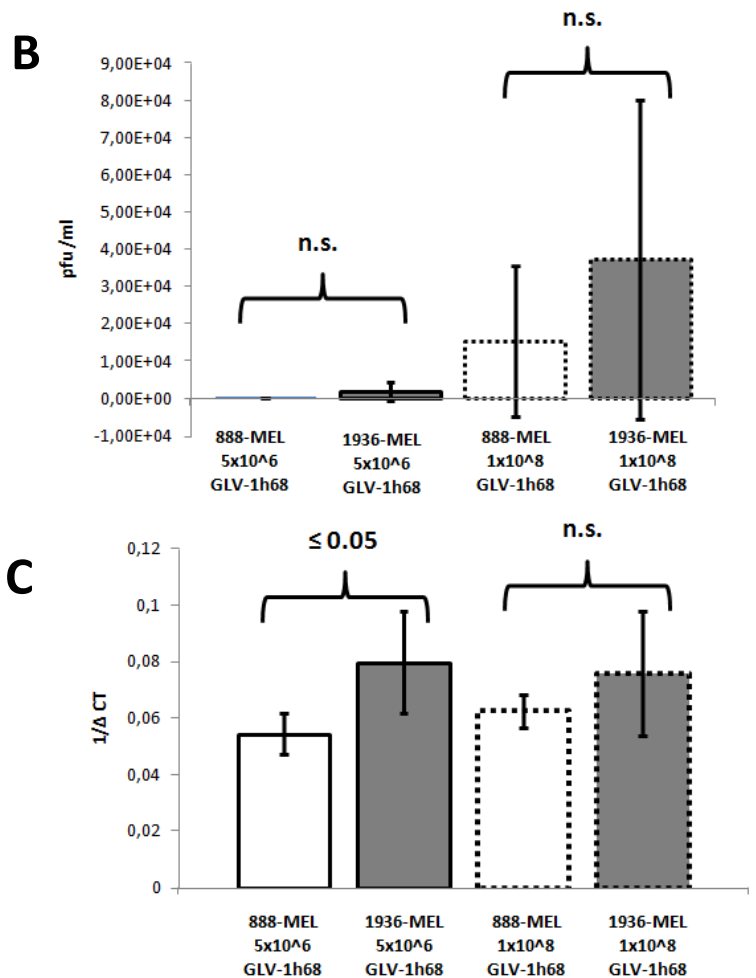


Abb.6.1.2.4: Virale Ausbreitung zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit GLV-1h68

(A) konfokalmikroskopische Aufnahme von aus dem Gefäß (ECM-Marker: Col-IV- Cy3) austretender Viruspartikeln (grün) 7 dpi in soliden 888-MEL-Tumoren. Die Größenbalken repräsentieren 200 μ m. Die Aufnahmen stellen repräsentative Beispiele dar. (B) Ergebnis der Plaque Assay Analyse von Tumorlysaten aus GLV-1h68 infizierten 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren (5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu) 1 dpi. (C) Ergebnisse der *real-time*-RT-PCR. Total-RNA wurde aus Tumorlysaten GLV-1h68 infizierter 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumore (5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu) 1 dpi isoliert und mittels Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit in cDNA transkribiert. Für die Amplifikation in der anschließenden *real-time*-PCR wurden GFP-spezifische Primer verwendet.



Diese beiden voneinander unabhängigen Studien zeigten ähnliche Ergebnisse. Es zeigte sich in beiden Studien, dass in 888-MEL keinesfalls mehr Viruspartikel in den ersten 24 h in das Tumorgewebe eingelagert werden als in 1936-MEL-Tumoren. Vielmehr hatte es nach erster Auswertung der Plaque Assay- Ergebnisse zunächst den Anschein, dass in soliden 1936-MEL mehr Viruspartikel den Tumor erreichen. Ein Student's T-Test zeigte jedoch, dass zwischen 888-MEL und 1936-MEL kein

signifikanter Unterschied vorlag, auch unabhängig von dem injizierten viralen Titer (5×10^6 oder 1×10^8 pfu). (Abb. 6.1.2.4 B).

Die Ergebnisse der Plaque Assay-Analyse wurden durch die Ergebnisse der *real-time*-RT-PCR unterstützt (Abb. 6.1.2.4 C). Im Fall der Virusinjektion mit 1×10^8 pfu GLV-1h68 war auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren zu erkennen, und die Anzahl der eingelagerten Viruspartikel war nahezu gleich.

Für eine Virusinjektion mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Viren im Tumor, und es war signifikant weniger GLV-1h68-bedingte GFP-Expression in 888-MEL-Tumoren nachweisbar als in 1936-MEL-Tumoren ($p = 0,046$).

Dies widersprach der zunächst postulierten These „mehr Virus- bessere Regression“.

Die Resultate weisen darauf hin, dass 888-MEL-Tumor-spezifisch-Faktoren der Tumormikroumgebung eine Virusausbreitung begünstigen.

6.1.2.5 Analyse der 888-MEL-Tumorarchitektur

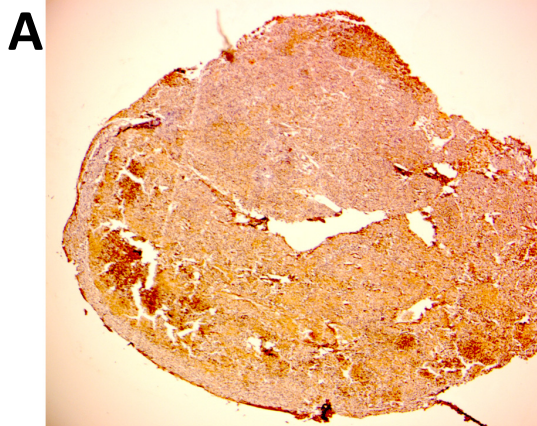
Tumore sind ein heterogenes Gefüge aus neoplastischen und nicht-neoplastischen Zellen. Jedes Tumormodell weist dabei eine unterschiedliche quantitative Zusammensetzung der verschiedenen Komponenten auf. Es wurde vermutet, dass die spezifische Tumormikroumgebung in soliden 888-MEL-Tumoren möglicherweise für die hohe Suszeptibilität mit GLV-1h68 und die hohe Replikationsrate verantwortlich ist.

Um einen Einblick in die Tumorarchitektur von soliden 888-MEL-Tumoren, und dabei genauer die Verteilung der neoplastischen und nicht neoplastischen-Zellen zu erhalten, wurden mittels des Melanom-spezifischen Antikörper S-100 Tumorzellen angefärbt. Diese Untersuchungen wurden in Paraffin-Gewebeschnitten durchgeführt.

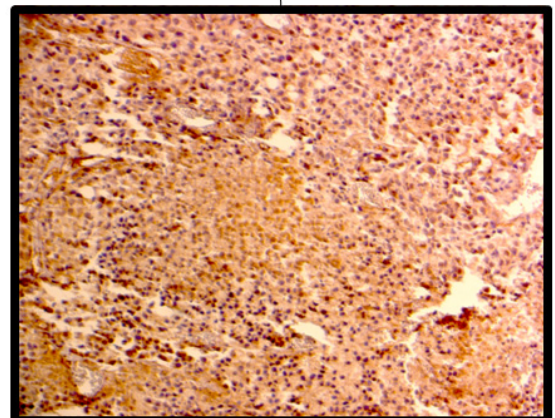
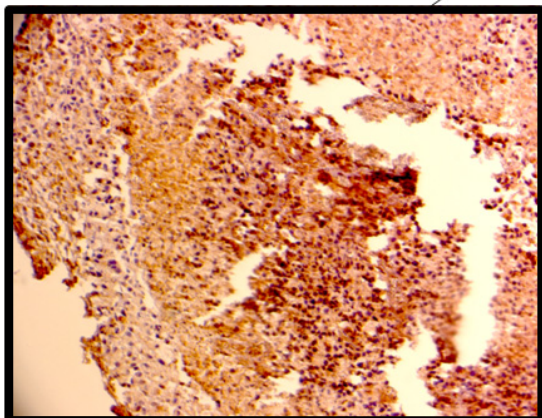
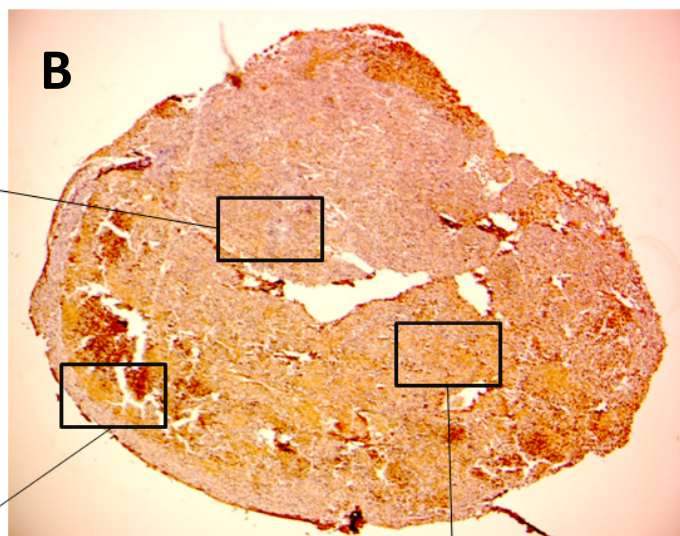
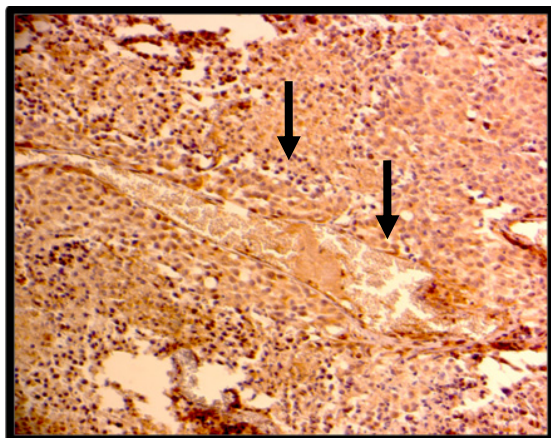
Zunächst wurden den Tieren 888-MEL-Tumorzellen implantiert, und bei einem Volumen von ca. 200 mm^3 wurden die Tumore entnommen und mit PFA fixiert. Nach Fixierung der uninfizierten 888-MEL-Tumore wurden diese zunächst dehydriert und schließlich in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung der Blöcke wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von $10 \mu\text{m}$ mit einem Mikrotom angefertigt. Um Epitope für Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Präparate deparaffinisiert, rehydriert und Fixierungs-bedingte Proteinvernetzungen durch Citrat-Puffer-Behandlung demaskiert. Die immunhistologische Färbung erfolgte unter Verwendung des VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories). Durch das Peroxidase-System wurden S100-positive Zellen braun angefärbt. Zur zusätzlichen Identifizierung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden erneut dehydriert und zur Herstellung der Dauerpräparate in organischer Einbettlösung fixiert.

Abb.6.1.2.5: Histologische Paraffin-Präparate nach Markierung des Melanomzell-spezifischen S100- Epitops.

Nach Fixierung der mock-infizierten 888-MEL-Tumore wurden



dieser zunächst dehydriert und schließlich in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung des Blocks wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 10 μm mit einem Mikrotom angefertigt. Um Epitope für Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Präparate deparaffinisiert, rehydriert und Fixierungs-bedingte Proteinvernetzungen durch Citrat-Puffer-Behandlung demaskiert. Die immunhistologische Färbung erfolgte unter Verwendung des VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories). Durch das Peroxidase-System wurden S100-positive Zellen braun angefärbt. Zur zusätzlichen Identifizierung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden erneut dehydriert und zur Herstellung der Dauerpräparate in organischer Einbettlösung fixiert. Dargestellt ist (A) eine Übersichtsaufnahme eines kompletten 888-MEL mock-infizierten S100-angefärbten Tumors, sowie (B) repräsentative Detailaufnahmen dieses Tumors.



Die Applikation des Peroxidase-Systems hat bei einem positiven Signal eine Braunfärbung des Gewebes zur Folge. Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe von Durchlichtaufnahmen am Stereomikroskop ausgewertet.

Bereits in der Übersichtsaufnahme in Abbildung 6.1.2.5 A waren braun gefärbter und damit S-100-positiver Zellen zu erkennen. Es war deutlich, dass die Tumorzellen nicht homogen über die gesamte Tumorfläche verteilt waren sondern akkumuliert auftraten, umgeben von nicht-neoplastischen Zellen. Dabei war die Dichte dieser Melanomzellaggregate insbesondere in der Randzone des Tumors und somit dem Bereich der aktiven Zellproliferation, erhöht. Im Kernbereich des Tumors waren deutlich weniger S-100-positive Tumorzellen zu erkennen (Abbildung 6.1.2.5 B).

Interessanterweise war bei der Analyse des Tumorkernbereichs eine hohe Dichte extrem kleiner Zellen zu erkennen, wie sie in der Literatur für Immunzellen beschrieben wurde (Abbildung 6.1.2.5 B; Pfeil). Da diese Aussage aber nur bedingt durch die Zellmorphologie gestützt wurde, sollte in einem nächsten Schritt diese Zellpopulation genauer charakterisiert werden.

6.1.2.6 Charakterisierung des Immunzellinfiltrates in soliden 888-MEL-Tumoren

Zur genaueren Charakterisierung des Immunzellinfiltrates, welches bei Paraffin-Gewebeschnitten von soliden 888-MEL-Tumoren zu erkennen war, wurden Gewebeschnitte mit dem monoklonalen Antikörper CD45 (Cluster of Differentiation 45) inkubiert. CD45 ist ein Glykoprotein, welches durch seine spezifische Expression auf der Zelloberfläche von Leukozyten, als allgemeiner Leukozytenmarker Anwendung findet.

Diese Studie wurde sowohl in soliden 888-MEL- als auch in 1936-MEL-Tumoren durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Infiltration CD45-positiver Zellen in beiden Tumormodellen stattfindet oder ob es sich hierbei um einen der entscheidenden Parameter handelt, welcher die Ausbreitung der GLV-1h68-Infektion in 888-MEL-Tumoren begünstigt. Zur Charakterisierung des Tumormikromilieus erfolgte diese Studie zunächst in uninfizierten Tumoren.

Dafür wurden 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumore implantiert, bei einem Tumolvolumen von ca. 250 mm³ entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt, welche mit einem CD45-spezifischen Antikörper inkubiert wurden. Durch anschließende Inkubation mit einem spezifischen cy3-gekoppelten Sekundärantikörper wurden CD45-positive Zellen rot angefärbt.

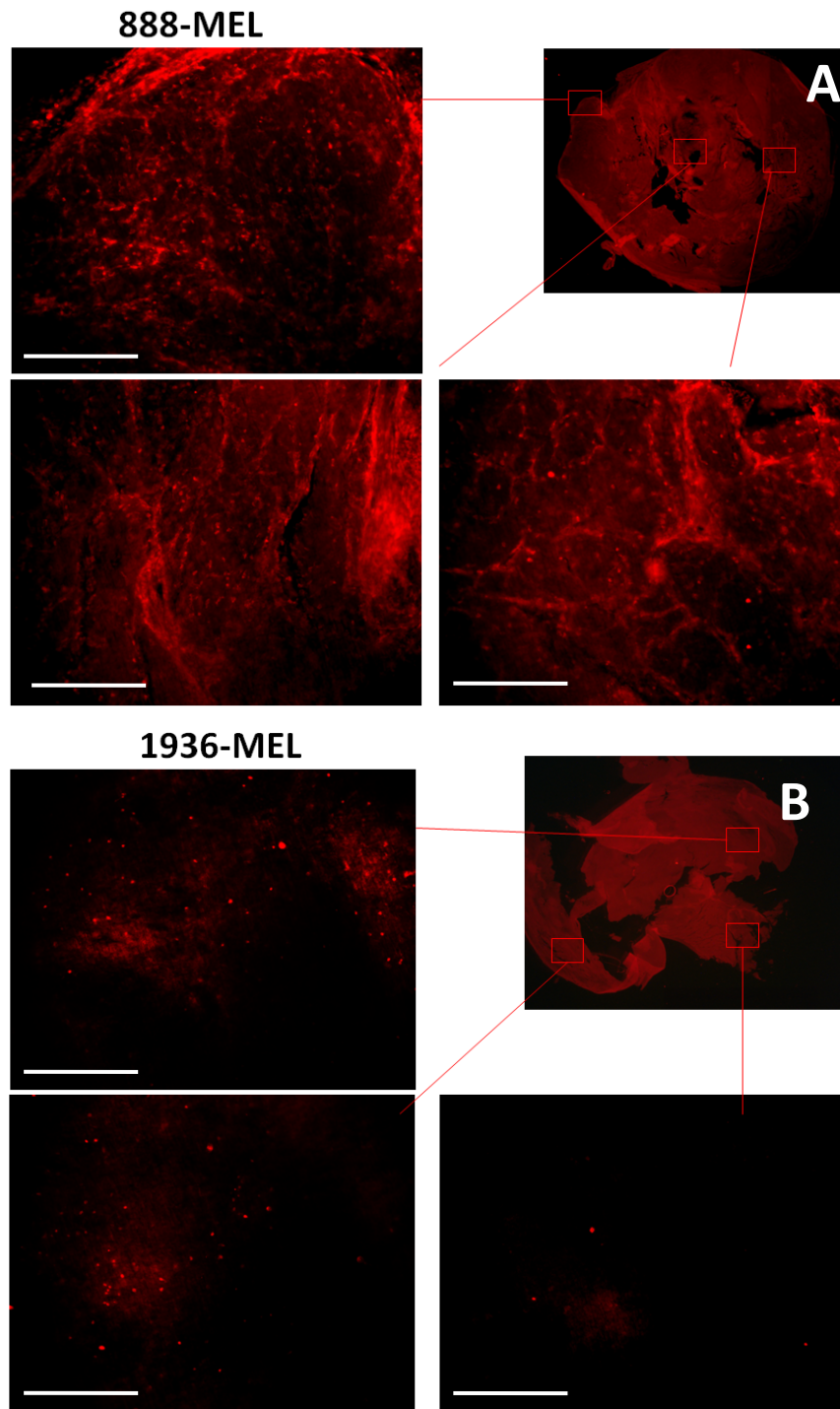


Abb.6.1.2.6: Immunhistologischer Nachweis der CD45-Expression in mock-infiziertem 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumorgewebe.

888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumore wurden bei Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 250 mm³ entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt, welche mit einem CD45-spezifischen Antikörper inkubiert wurden. Durch anschließende Inkubation mit einem spezifischen cy3-gekoppelten Sekundärantikörper wurden CD45-positive Zellen (rot) angefärbt. Dargestellt sind jeweils Übersichtsaufnahmen eines kompletten 888-MEL-(A) bzw. 1936-MEL-Tumorschnittes (B) mit jeweils 3 zusätzlichen Detailaufnahmen. Die Aufnahmen sind repräsentative Beispiele. Die Größenbalken repräsentieren 100 µm.

Die Auswertung am Fluoreszenzstereomikroskop ließ fundamentale Unterschiede des Tumormikromilieus bei 888-MEL-Tumoren, verglichen mit 1936-MEL-Tumoren, deutlich werden (Abbildung 6.1.2.6).

Zunächst bestätigte sich die Hypothese, dass es sich bei der Zellpopulation im Tumorkernbereich der 888-MEL-Tumore (Abbildung 6.1.2.5 B; Pfeil) um Immunzellen handelt. In einer vergleichenden Studie zwischen Gewebeschnitten von 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren, wurde aber zudem deutlich, dass dieses Infiltrat CD45-positiver-Zellen sich zwischen den beiden Tumormodellen quantitativ unterscheidet. Während das Tumorstroma bei soliden 888-MEL-Tumoren zu einem hohen Anteil aus CD45-positiven Zellen besteht, kann bei 1936-MEL-Tumoren nur eine äußerst geringe Menge CD45-positiver Zellen detektiert werden.

Dies deutet darauf hin, dass 888-MEL-Zellen intrinsische pro-inflammatorische Eigenschaften besitzen, welche unabhängig von einer GLV-1h68-Infektion sind und schon während des Tumorwachstums im uninfizierten Zustand eine ausgedehnte Rekrutierung von Immunzellen zur Folge hat.

6.1.2.7 Analyse transkriptioneller Unterschiede zwischen soliden 888-MEL- und 1936-MEL Tumoren

Um das Vorkommen und Funktion der infiltrierten Immunzellen in uninfizierten 888-MEL-Tumoren aufzuklären zu können, wurde eine globale Transkriptionsanalyse von GLV-1h68- bzw. mock-infizierten 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren mit Hilfe von Microarrays durchgeführt.

Dafür wurden den Mäusen 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumorzellen implantiert, und bei ausreichendem Tumolvolumen mit 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu GLV-1h68 infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden die Mäuse getötet, die Tumore entnommen und RNA isoliert, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem 36k humanen Kompletengenomarray und dem 36k Maus-Kompletengenomarray (*36k whole genome human and mouse arrays*). Ziel war es, zum einen Tumorzell-spezifische Beeinflussung (human Array) und zum anderen, die Beeinflussung durch den Wirtsorganismus (Mausarrays) auf das Tumormikromilieu zu untersuchen.

Um weiterhin zu untersuchen, ob intrinsische Eigenschaften der Zellen *in vitro* durch Beeinflussung des Tumormikromilieus *in vivo* verändert werden, wurden parallel dazu Zelllysate uninfizierter 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen erzeugt und ebenfalls mit dem 36k humanen Kompletengenom-Array hybridisiert.

Human arrays			
comparison	p value	# of diff. genes	perm. p value
888 PBS vs 1936 PBS	0.005	958	0.008
888 1x10 ⁸ vs 1936 1x10 ⁸	0.005	1319	0.008
888 PBS vs 888 5x10 ⁶	0.005	17	n.s.
888 PBS vs 888 1x10 ⁸	0.005	152	0.02
1936 PBS vs 1936 5x10 ⁶	0.005	37	n.s.
1936 PBS vs 1936 1x10 ⁸	0.005	24	n.s.
Mouse arrays			
comparison	p value	# of diff. genes	perm. p value
888 PBS vs 1936 PBS	0.005	204	0.04
888 1x10 ⁸ vs 1936 1x10 ⁸	0.005	363	0.008
888 PBS vs 888 5x10 ⁶	0.005	6	n.s.
888 PBS vs 888 1x10 ⁸	0.005	147	0.05
1936 PBS vs 1936 5x10 ⁶	0.005	9	n.s.
1936 PBS vs 1936 1x10 ⁸	0.005	14	n.s.

Abb.6.1.2.7.1: Übersicht der Transkriptionsanalyse von mock- bzw. GLV-1h68-infizierten (5x10⁶ und 1x10⁸ pfu GLV-1h68) soliden 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumoren.

Die höchste Anzahl differentiell exprimierter Gene wurde im Vergleich uninfizierter solider 888-MEL- mit uninfizierten soliden 1936-MEL-Tumoren identifiziert, sowohl bei Auslesung der humanen Arrays (958 differentiell exprimierte Gene) als auch der Maus-Arrays (204 differentiell exprimierte Gene) (Abbildung 6.1.2.7.1).

Bedingt durch die Virusinfektion wurden sowohl bei 888-MEL- als auch bei 1936-MEL-Tumoren nur eine geringe Anzahl von Genen im Vergleich zum uninfizierten Tumor differentiell exprimiert (Abbildung 6.1.2.7.1 und Abbildung 6.1.2.7.2 A).

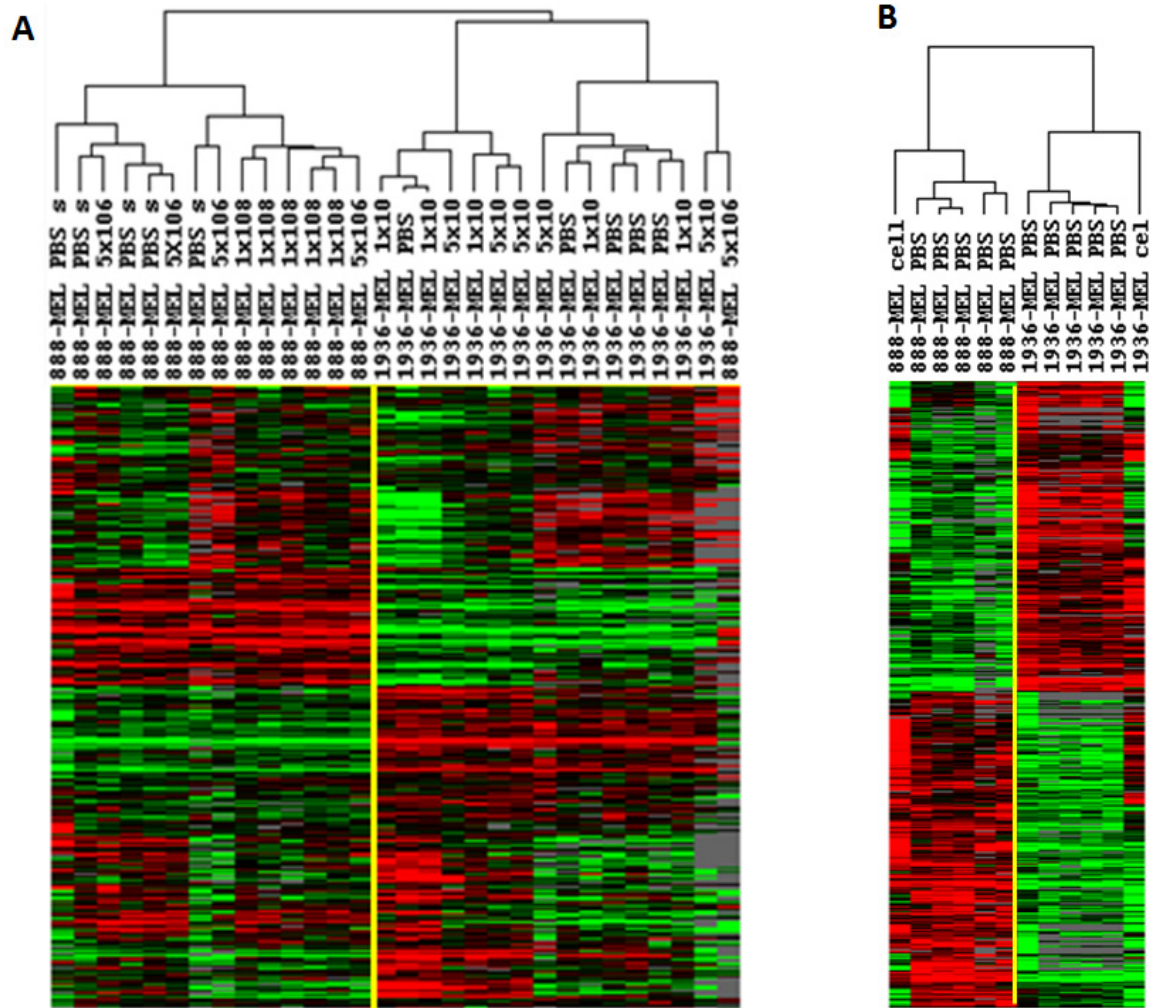


Abb.6.1.2.7.2: Cluster Analyse nach Hybridisierung der Proben mit dem 36k humanen Kompletengenomarray

(A) Darstellung aller Proben (B) Darstellung der mock-infizierten 888-MEL- und 1936-MEL- Tumore und der entsprechenden uninfizierten Zellkulturlysate

In einem ersten Analyseansatz wurden die Ergebnisse der Hybridisierung der humanen Arrays mit Hilfe des Programms Cluster mit nur geringfügigen Einschränkungen visualisiert (80 % Präsenz in allen Proben, 2-facher Ratio-Wechsel in zumindest einem Experiment) (Abbildung 6.1.2.7.2 A). Dieses Programm visualisiert zum einen Regulation der Proben (rot= erhöhte Genexpression verglichen zur Referenz; grün= verringerte Genexpression verglichen zur Referenz) und ordnet diese Proben auch entsprechend ihres Expressionsprofils an.

Den vorgegebenen Filter passierten 3010 Gene und interessanterweise separierte das Programm alle Proben so, dass 888-MEL und 1936-MEL komplett getrennt voneinander aufgetragen wurden.

Auch hier wurde deutlich, dass eine Infektion mit GLV-1h68 keine starke Auswirkung auf das Expressionsprofil hat, welche die Tumorzellen per se *in vivo* besitzen.

Eine vergleichende Analyse von Tumorlysaten uninfizierter solider 888-MEL- und 1936-MEL-Tumore mit den entsprechenden uninfizierten Zellkultur 888-MEL- und 1936-MEL-Zellen, zeigte nach einer hoch-stringenten ($p_2 < 0,005$) Student's T-Test-Analyse vergleichbare Expressionsprofile (Abbildung 6.1.2.7.2 B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Tumorzellen nur geringfügig in ihrer Expression durch die virale Replikation von GLV-1h68 beeinflusst werden, und dass Unterschiede zwischen den Zelllinien über Infektions-bedingte Unterschiede dominieren.

Interessanterweise war bei einer genaueren Analyse der in 888-MEL erhöht exprimierten Gene, weder in den soliden Tumoren noch in den Zellkulturlysaten, Gene zu identifizieren, welche auf eine Erhöhte Rekrutierung von Immunzellen in die Tumormikroumgebung hindeuten. Aufschluss darüber sollte durch eine Hybridisierung des kompletten Probensatzes mit dem 36k-Komplettgenom-Maus-Array gewonnen werden. Diese Analyse repräsentiert den Einfluss des Wirtes auf die Tumormikroumgebung.

Hierbei konnte dann gezeigt werden, dass uninfizierte 888-MEL-Tumorzellen den Wirtsorganismus zur Produktion pro-inflammatorischer Signale anregen, welche eine vermehrte Infiltration von Immunzellen in den Tumor zur Folge hat.

Zu den erhöht exprimierten Immungenen der 888-MEL-Tumore zählten beispielsweise MCP-2 (monocyte attracting protein 2) sowie MIF (macrophage migration inhibitory factor) / CD74 (Cluster of Differentiation 74). MCP-2 ist involviert in Chemotaxis und attrahiert Monocyten. MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie TNF-alpha, IL-6 und INF-gamma, vorantreibt. Des weiteren reguliert MIF die Rekrutierung von Immunzellen und vermittelt Integrin-abhängigen Arrest und Transmigration von Monocyten und T-Zellen.

Die Überexpression von MHC II (major histocompatibility class II)- verwandten Genen, wie etwas H2-Ke2, H2-T10, H2-Aa, H2-K1, H2-T9, H2-T23, H2-D1, legen die Annahme nahe, dass es sich bei den CD45-positiven Zellen, welche in den Gewebeschnitten detektiert wurden, um Makrophagen handelt.

In einer weiteren Analyse wurde untersucht, welche Signaltransduktionswege bevorzugt in soliden uninfizierten 888-MEL Tumoren aktiv waren (Abbildung 6.1.2.7.3). Dabei wurde die vorherigen Ergebnissen bestätigend gezeigt, dass vor allem Signalwege des angeborenen und auch des adaptiven Immunsystems wesentlicher aktiver waren als vergleichsweise in den soliden 1936-MEL-Tumoren.

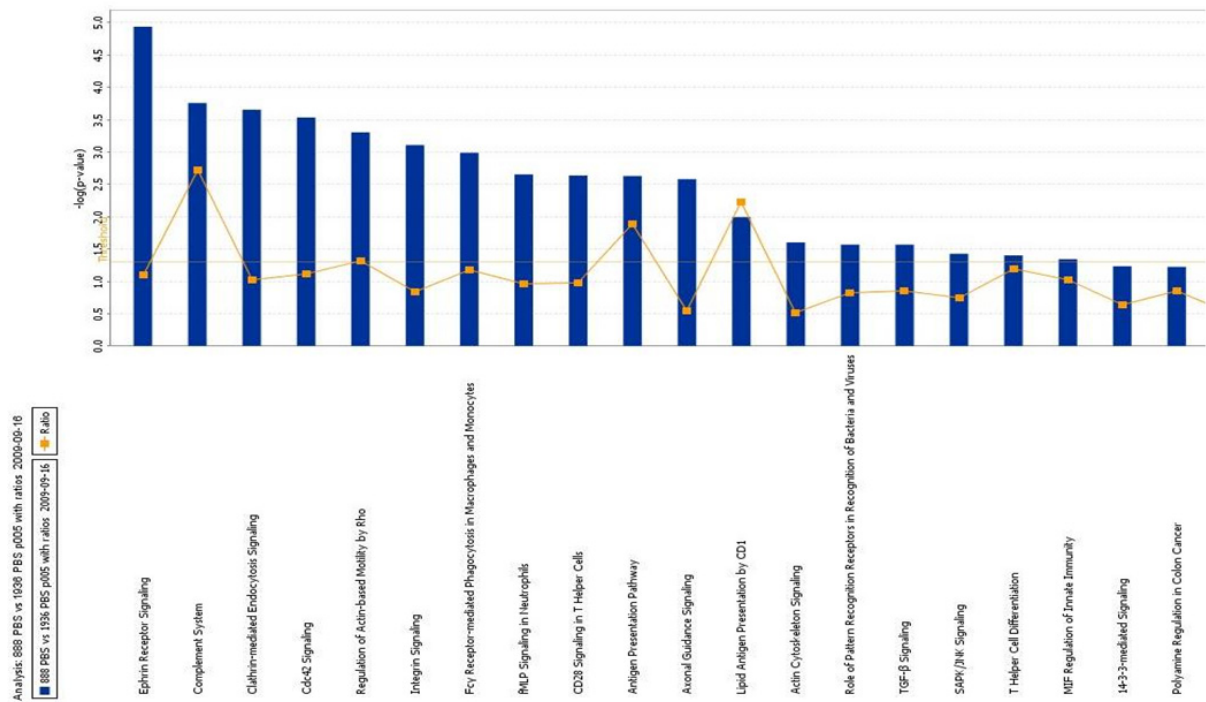


Abb.6.1.2.7.3: Analyse erhöht aktivierter Signaltransduktionswege in 888-MEL

IPA-Ingenuity Pathway Analysis

Zusammenfassend zeigte die transkriptionelle Analyse solider Tumore und der entsprechenden Zellkulturproben auf, dass intrinsische Eigenschaften der Tumoren deutlich überwiegen und eine GLV-1h68 Infektion und Replikation nur einen geringfügigen Einfluss auf das Expressionsprofil der Zellen hat.

6.1.3 Analyse der Virusausbreitung nach Immunzellepletion

Nachdem histologisch und transkriptionell nachgewiesen werden konnte, dass in soliden 888-MEL-Tumoren massiv Immunzellen in das Tumormikromilieu infiltrieren und es sich bei diesen CD45-positiven Zellen vermutlich um Makrophagen handelt, sollte deren Funktion untersucht werden.

Es wurde vermutet, dass die CD45-positiven Zellen auch Ursache für das differentielle Infektions und Replikationsverhalten in 888-MEL und 1936-MEL-Tumoren sein könnte. Dies sollte durch Analyse der Virusausbreitung nach Depletion des Immunsystems erfolgen. Diese Immundepletion wurde durch eine Applikation des Zytostatikums Cyclophosphamid (CPA) unmittelbar anschließend an die Implantation der Tumorzellen erzielt.

Der Versuchsaufbau war folgendermaßen: Es wurden 4×10^6 888-MEL-Zellen bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert und 5 Tage nach Implantation wurde bei der Hälfte der Tiere die Behandlung mit CPA begonnen. Die Behandlung wurde 2-mal wöchentlich weitergeführt, und die Injektion wurde bis 28 Tage nach Implantation fortgeführt.

In einer ersten Analyse sollte der generelle Einfluss von CPA auf die Entwicklung der Tumorumina dokumentiert werden.

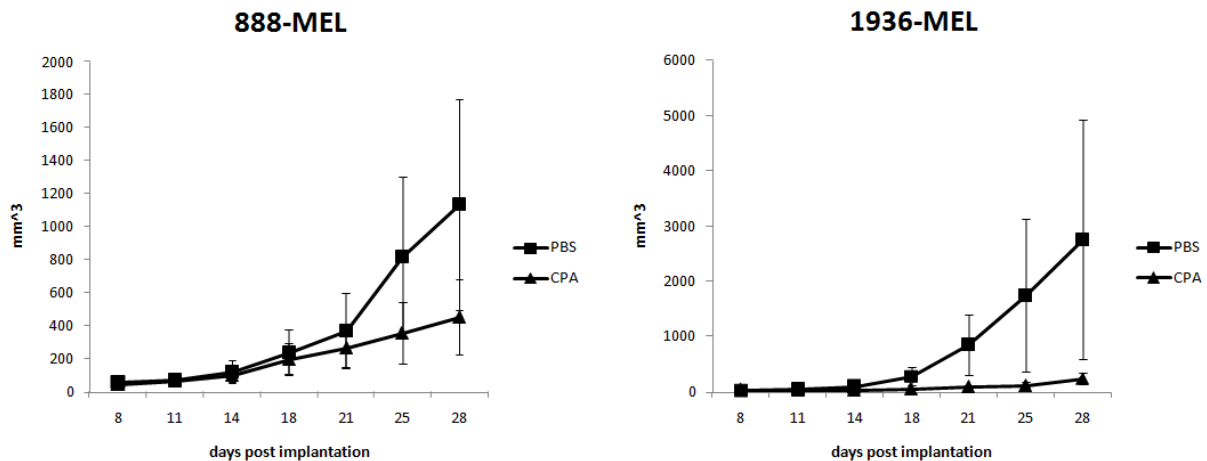


Abb.6.1.3.1: Wachstumskurve der Tumorumina nach Implantation und parallel verlaufender CPA-Behandlung

Es wurden 4×10^6 888-MEL-Zellen bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert, und 5 Tage nach Implantation wurde bei der Hälfte der Tiere die Behandlung mit CPA begonnen. Die Behandlung wurde 2-mal wöchentlich weitergeführt. Die Injektion wurde bis 28 Tage nach Implantation fortgeführt, und die Auswirkung auf die Zunahme der Tumorumina dokumentiert.

In Abbildung 6.1.3.1 ist zu erkennen, dass CPA einen deutlichen Effekt auf die Tumorumina hat.

Erklären lässt sich dies dadurch, dass CPA, neben einer Applikation als immundepletierendes Agens in der Tumorthherapie vorwiegend als Zytostatikum Anwendung findet, welches einen Wachstumsarrest schnell proliferierender Zellen induzieren soll. Genau dies erfolgte hier sowohl bei 888-MEL, als auch bei 1936-MEL-Tumoren. Zudem ist aber auch von einer effektiven Immundepletion auszugehen.

Um die Auswirkungen einer GLV-1h68-Infektion auf die CPA-behandelten bzw. -unbehandelten soliden Tumore analysieren zu können, wurde 21 Tage nach Implantation jeweils die Hälfte CPA-behandelten bzw. -unbehandelten soliden Tumore GLV-1h68- bzw. mock-infiziert. Weitere 7 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Tumore entnommen. Die Auswirkung der CPA-Behandlung und der GLV-1h68- bzw. mock-Infektion auf die Zunahme der Tumorumina wurde dokumentiert.

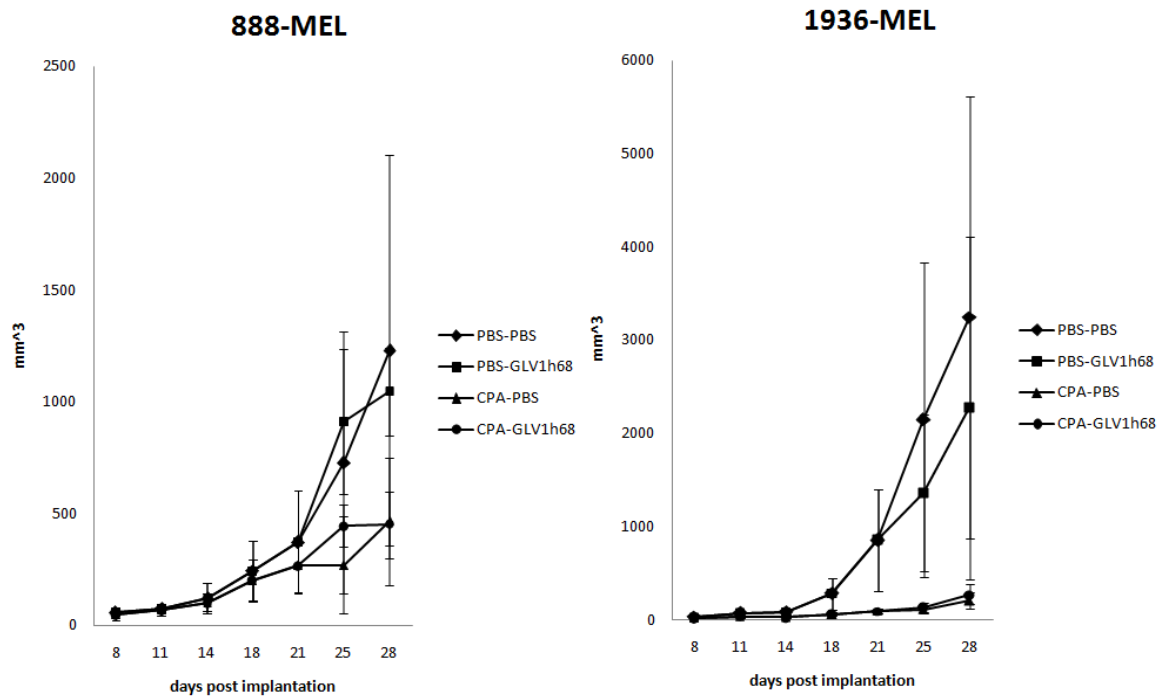


Abb.6.1.3.2: Wachstumskurve der Tumorumina nach Implantation und parallel verlaufender CPA-Behandlung; 21 Tage nach Implantation GLV-1h68- bzw. mock-Infektion der soliden Tumore

Es wurden 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert, und 5 Tage nach Implantation wurde bei der Hälfte der Tiere die intraperitoneale Applikation mit CPA begonnen. Diese wurde 2-mal wöchentlich weitergeführt. Die Injektion wurde bis 28 Tage nach Implantation fortgeführt. 21 Tage nach Implantation erfolgte zudem eine GLV-1h68- bzw. mock-Infektion, sowohl in der CPA-behandelten als auch in der CPA-unbehandelten Gruppe. 7 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Tumore entnommen. Die Auswirkung der CPA-Behandlung und der GLV-1h68- bzw. mock-Infektion auf die Zunahme der Tumorumina wurde dokumentiert.

Dabei ist zu sehen, dass sowohl bei CPA-behandelten als auch bei CPA-unbehandelten soliden 888-MEL-Tumoren, nach einem anfänglichen Anschwellen des Tumors (bis ca. 4 dpi) ein Wachstumsarrest der Tumore eintritt.

Auch für 1936-MEL-Tumore konnte ein ähnliches Wachstumsmuster in CPA-behandelten bzw. -unbehandelten soliden Tumoren beobachtet werden. Hierbei war in beiden Fällen ein geringfügig verlangsamtes Wachstums der Tumore nach GLV-1h68-Infektion zu erkennen, und in beiden Fällen nahmen die Tumore weiterhin konstant an Volumen zu.

Anschließend sollten die CPA-behandelten bzw. -unbehandelten soliden Tumore histologisch charakterisiert werden, und dabei vor allem die Ausbreitung des Virus im Tumorgewebe analysiert werden. Dafür wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern fixiert und mittels des Fluoreszenzstereomikroskops Aufnahmen der GFP-Expression angefertigt. Nach Umwandlung in 8-bit-Graustufenbilder (Abbildung 6.1.3.3. A) konnte

eine Quantifizierung der Pixel mit Hilfe von ImageJ erfolgen. Dargestellt sind Aufnahmen der GLV-1h68-infizierten 888-MEL- bzw. 1936-MEL- Tumore von jeweils CPA-behandelten und CPA-unbehandelten Tumoren. Dabei wird deutlich, dass eine Immundepletion mittels CPA, eine signifikant geringere Virusausbreitung im Tumorgewebe von soliden 888-MEL-Tumoren zur Folge hat ($p = 0,0018$). Dieser visuelle Eindruck wurde durch das Ergebnis der Quantifizierungsstudie unterstützt. Wie das Balkendiagramm in Abbildung 6.1.3.3. B darstellt, sind in 888-MEL-Tumor-tragenden CPA-unbehandelt Mäuse nach CPA-Behandlung 67,93% +/- 19,99 GFP-exprimierende Zellen festzustellen, wobei in 888-MEL-Tumor-tragende CPA-behandelt Mäuse nach GLV-1h68-Infektion nur 32,6 % +/- 6,98 der totalen Tumorfläche GFP exprimiert. Weiter konnte gezeigt werden, dass in 1936-MEL-Tumor-tragenden Mäusen CPA-Behandlung keinen Einfluss auf die Ausbreitung der Infektion nach GLV-1h68-Injektion hat. In beiden Fällen sind nur wenige GFP-exprimierende Zellen sichtbar. Dies zeigt, dass durch Applikation von CPA eine Komponente der Tumormikroumgebung dahingehend modifiziert wurde, dass eine GLV-1h68-Infektion und Replikation erschwert wird.

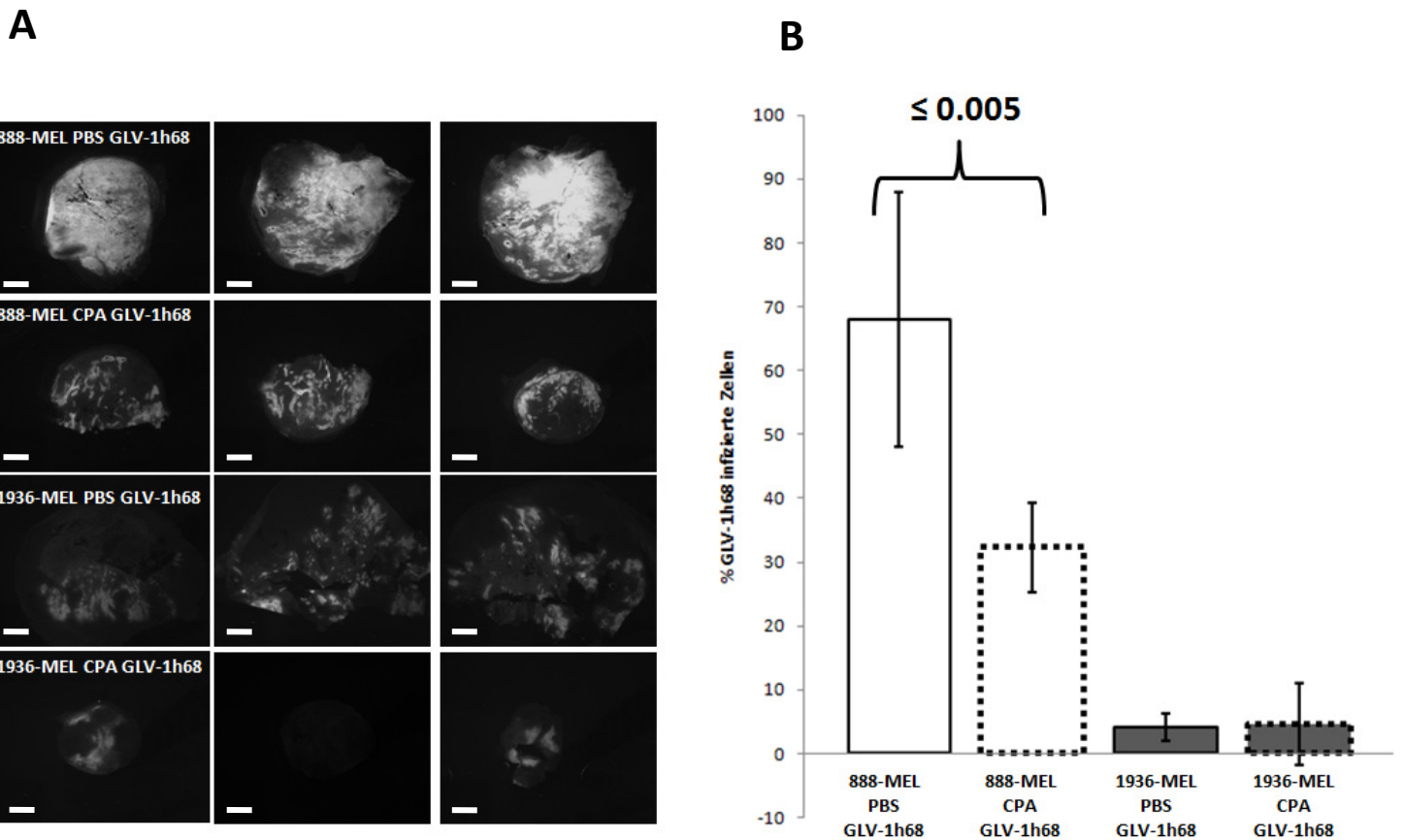


Abb.6.1.3.3: Quantifizierung der Virusausbreitung im Tumorgewebe, durch Analyse der GFP-positiven Zellen in Gewebeschnitten

Es wurden 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert, und 5 Tage nach Implantation wurde bei der Hälfte der Tiere intraperitoneale Applikation mit CPA begonnen. Die Behandlung wurde 2-mal wöchentlich weitergeführt. Die Injektion wurde bis 28 Tage nach Implantation fortgeführt. 21 Tage nach Implantation erfolgte zudem eine GLV-1h68- bzw. mock-Infektion, sowohl in der CPA-behandelten als auch in der CPA-unbehandelten Gruppe. 7 dpi wurden die Tiere getötet und die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μ m angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern fixiert und mittels des Fluoreszenzstereomikroskops Aufnahmen der GFP-Expression angefertigt. (A) Nach Umwandlung in Graustufenbilder konnte eine Quantifizierung der Pixel mit Hilfe von ImageJ erfolgen. Hier dargestellt sind Aufnahmen der GLV-1h68-infizierten 888-MEL- bzw. 1936-MEL- Tumore von jeweils CPA-behandelten und CPA-unbehandelten Tumoren. Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele. (B) Balkendiagrammdarstellung nach Auswertung der viral bedingten GFP-

Als potentielle Komponente, welche CPA-vermittelt depletiert wurde, wurden die CD45-positiven Zellen eingeschätzt.

Um dies zu untersuchen wurde eine immunohistochemische Detektion von CD45 durchgeführt. Durch Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde CD45 rot angefärbt.

Die Quantität der Infiltration konnte nach Aufnahmen der CD45-positiven Zellen am Fluoreszenzstereomikroskop und anschließender Umwandlung in 8-bit-Graustufenbilder mit Hilfe von ImageJ ermittelt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierungsstudie CD45-positiver Zellen wurde in Abbildung 6.1.3.4.A als Balkendiagramm dargestellt. Dabei wurde die Menge der CD45-positiven Zellen in CPA-unbehandelten 888-MEL-Tumor-tragende Mäuse, CPA-behandelt 888-MEL-Tumor-tragende Mäusen und CPA-unbehandelten 1936-MEL-Tumor-tragende Mäuse verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in soliden 888-MEL-Tumoren CPA-Behandlung zu einer höchst signifikanten ($p=0,0006$) Verringerung des Infiltrates an CD45-positiven Zellen führt. Im Vergleich mit 1936-MEL CPA-unbehandelten Tumoren schien es durch CPA-Behandlung von 888-MEL-Tumoren zu einer Nachahmung der Tumormikroumgebung von 1936-MEL-Tumoren zu kommen.

Dargestellt ist zudem Abbildung 6.1.3.4.B eine Verteilung der CD45-positiven Zellen in 888-MEL-CPA-behandelten bzw. CPA-unbehandelten Tumoren.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass eine erfolgreiche GLV-1h68-Infektion und -Replikation als fundamentale Komponente der Tumormikroumgebung CD45-positive Zellen benötigt. Je höher dabei die Menge dieses Infiltrates ist, desto effizienter kann ein solider Tumor infiziert werden.

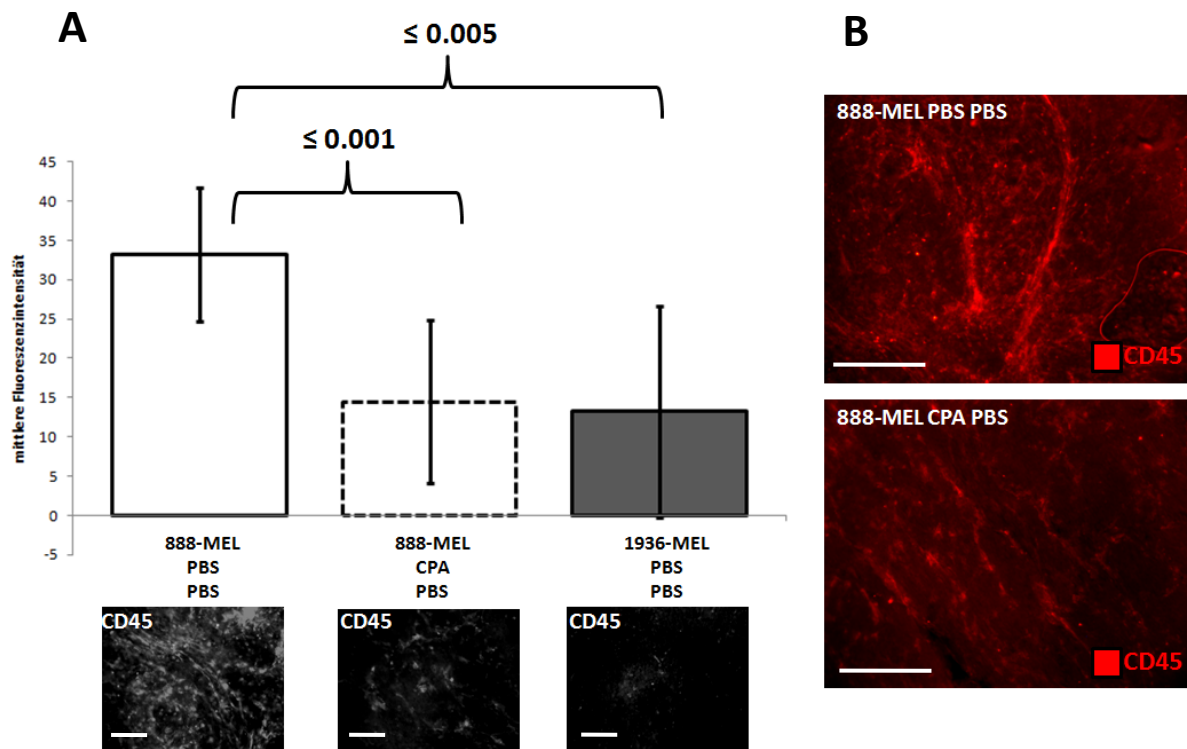


Abb.6.1.3.4: Quantifizierung der Infiltration von CD45-positiven Zellen in 888-MEL- bzw. 1936-MEL-Tumore

Es wurden 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert, und 5 Tage nach Implantation wurde bei der Hälfte der Tiere eine intraperitoneale Applikation mit CPA (100 mg/kg Körpergewicht) begonnen. Diese wurde 2-mal wöchentlich weitergeführt. Die Injektion wurde bis 28 Tage nach Implantation fortgeführt. Nach 28 Tagen wurden die Heterotransplantate entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μm angefertigt und eine immunohistochemische Detektion von CD45 durchgeführt. Durch Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde CD45 (rot) angefärbt. Die Quantität der Infiltration konnte nach Aufnahmen der CD45-positiven Zellen am Fluoreszenzstereomikroskop und anschließender Umwandlung in Graustufenbilder mit Hilfe von ImageJ ermittelt werden. (A) Balkendiagrammdarstellung nach Quantifizierungsstudie CD45-positiver Zellen in den verschiedenen Gruppen: 888-MEL-Tumor-tragende Mäuse; CPA-unbehandelt, 888-MEL-Tumor-tragende Mäuse; CPA-behandelt, 1936-MEL-Tumor-tragende Mäuse; CPA-unbehandelt. Dargestellt ist zudem eine repräsentative Darstellung der CD45-Infiltration. (B) Dargestellt sind repräsentative Bilder der Verteilung der CD45-positiven Zellen in mock-infizierten soliden 888-MEL-Tumoren CPA-behandelt bzw. CPA-unbehandelt. Die Größenbalken repräsentieren 100 μm . Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

6.1.4 Auswirkungen der Virusausbreitung auf die Immunzellpopulationen in der Tumormikroumgebung

In einer weiterführenden Studie, sollte untersucht werden, wie sich der Einfluss der Virusinfektion auf die CD45-positiven Zellen auswirkt. Dafür wurden 888-MEL- bzw. 1936-MEL Tumore implantiert, nach GLV-1h68-Infektion (5×10^6 pfu) 7 dpi entnommen, und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μ m angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD45 durchgeführt. Durch Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde CD45 rot angefärbt.

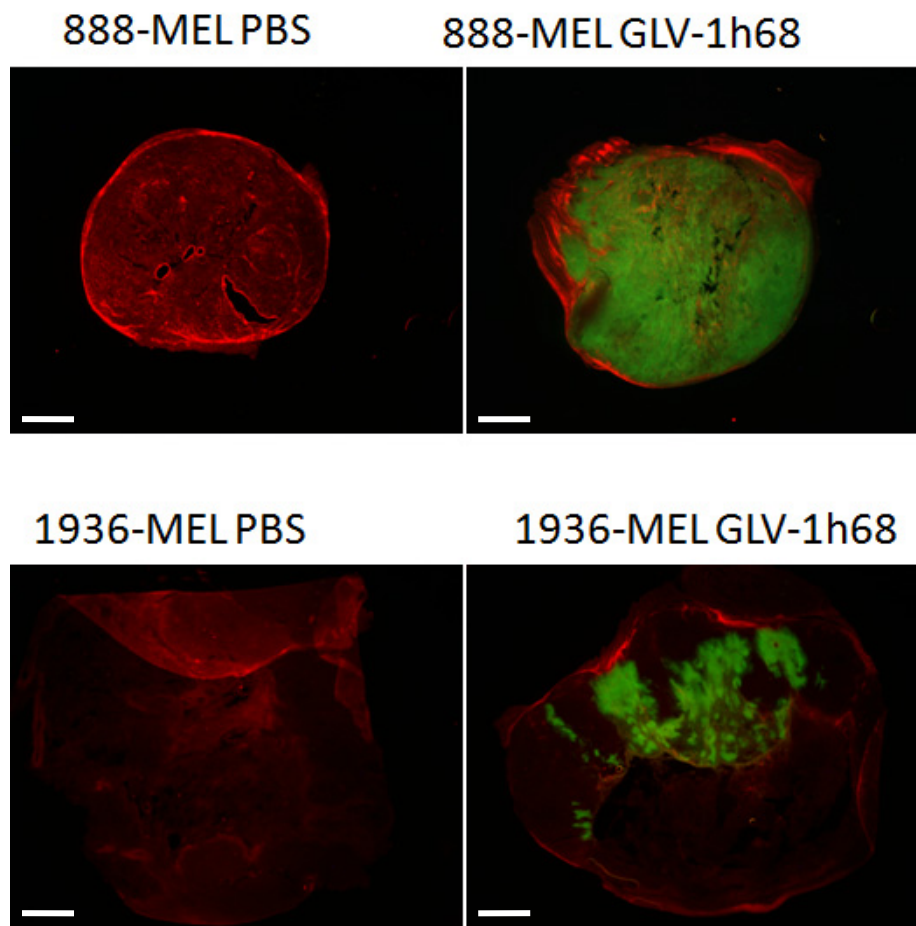


Abb.6.1.4: Immunhistochemische Detektion von CD45 in Gewebeschnitten nach Infektion mit GLV-1h68 7dpi.

888-MEL- bzw. 1936-MEL Tumore wurden implantiert, nach GLV-1h68-Infektion (5×10^6 pfu) 7 dpi entnommen, und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μ m angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD45 durchgeführt. Durch Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde CD45 (rot) angefärbt. Dargestellt sind die CD45-Expression (links) sowie eine Überlagerung GFP-Expression des Virus / CD45 (rechts). Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Dargestellt sind in Abbildung 6.1.4 die CD45-Expression (links) sowie eine Überlagerung der GFP-Expression des Virus mit der CD45-Expression (rechts). In soliden 888-MEL-Tumoren schien die Population CD45-positiver Zellen auch nach massiver Virusausbreitung erhalten zu bleiben, wohingegen bei 1936-MEL-Tumoren, bedingt durch die GLV-1h68-Injektion im peritumoralen Bereich eine aktive Rekrutierung CD45-positiver Zellen stattzufinden scheint.

6.1.5 Analyse der differentiellen Viperinexpression in soliden 888-MEL- und 1936-MEL-Tumoren

Literaturrecherche auf der Suche nach potentiellen Inhibitoren viraler Infektion und Ausbreitung führte zu dem vielversprechenden Virus-inhibierenden Kandidaten Viperin (cig5)[79].

Viperin wird induziert durch Interferon (IFN) und wurde zuerst im Zusammenhang mit dem Humanen Cytomegalovirus (HCMV) beschrieben. Durch eine Infektion mit HCMV wird IFN sekretiert und es kommt zur Expression des antiviralen Proteins Viperin, was im nächsten Schritt die HCMV-Replikation inhibiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Viperinexpression, welche einer HCMV-Infektion vorausgeht, eine anschließende HCMV-Infektion und Replikation ermöglicht. Als zugrunde liegender Mechanismus wird vermutet, dass durch eine frühzeitige Expression von Viperin, die durch HCMV-Infektion induzierte verstärkte Viperin-Umverteilung vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat verringert wird. Diese Translokation von Viperin erfolgt mittels Vakuolen. Durch eine frühzeitige Viperin-Expression wird die Anzahl der für eine Translokation benötigten Vakuolen stark reduziert, und könnte somit den Mechanismus widerspiegeln, wie HCMV der antiviralen Zellfunktion entgeht, indem HCMV selbst Gebrauch der Vakuolen macht.

Um eine mögliche Beteiligung dieses Mechanismus auch bei dem hier charakterisierten Vaccinia Virus GLV-1h68 zu überprüfen, wurde eine quantitative *real-time* PCR mit spezifischen Viperin-Primern durchgeführt.

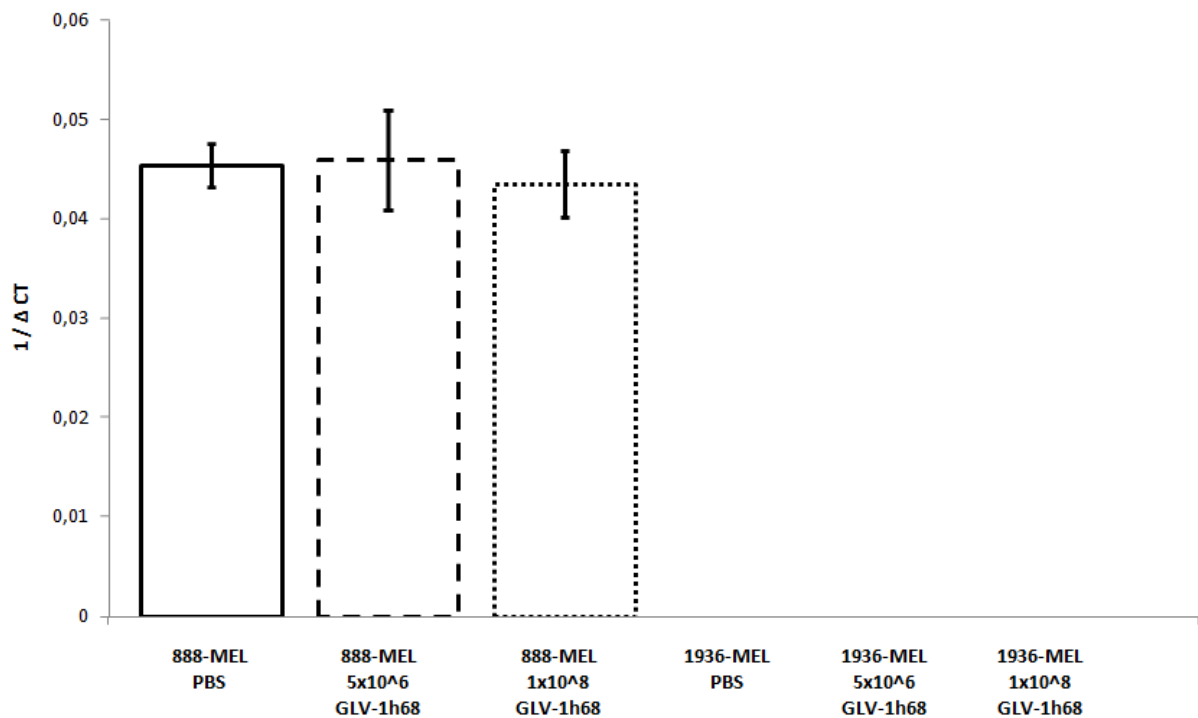


Abb.6.1.5: Quantifizierung der differentiellen Viperin-Expression in mock- bzw GLV-1h68 infizierten 888-MEL- und 1936-MEL- Tumoren

Balkendiagramm zur Verdeutlichung der *real-time*-RT-PCR-Ergebnisse. Es wurden 4×10^6 888-MEL- bzw. $7,5 \times 10^5$ 1936-MEL-Zellen den Tieren implantiert und mit 5×10^6 pfu bzw. 1×10^8 pfu GLV-1h68 infiziert. 1 dpi wurden die Tumore entnommen, Tumorlysate hergestellt anschließend die total-RNA isoliert. Mittels Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit wurde die RNA in cDNA transkribiert. Für die Amplifikation in der anschließenden *real-time*-PCR wurden Viperin-spezifische Primer verwendet.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei respondierenden 888-MEL-Tumoren zu einer Expression von Viperin bereits im uninfizierten Tumor kommt, welche nicht in 1936-MEL-Tumoren zu finden war (Abbildung 6.1.5).

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass durch eine frühzeitige Expression von Viperin in soliden 888-MEL-Tumoren die vakuoläre Lokalisation von Viperin verringert ist, und dadurch die GLV-1h68-Replikation beschleunigt wird, was bei 1936-MEL nicht der Fall ist.

6.2 Histologische Charakterisierung der späten Phase einer GLV-1h68 Infektion

Im Verlauf der Infektion kommt es bei respondierenden Tumoren nach einem ersten Wachstumsarrest zu einer Tumorregression. Um Aufschluss über beteiligte Mechanismen bei der Tumorregression zu erlangen, wurden späte Stadien einer GLV-1h68-Infektion untersucht. Drei mögliche Wirkungsmechanismen viral bedingter Onkolyse wurden beschrieben: Tumorzell-spezifische Onkolyse, Zerstörung der Tumervaskulatur oder eine anti-tumorale Immunantwort. In dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden diese potentiellen Wirkungsmechanismen für eine GLV-1h68-Infektion überprüft.

Als Tumormodell wurde dabei die humanen Brustkarzinomzelllinie GI-101A verwandt. GI-101A-Tumore zeigen ein regredierendes Verhalten nach Infektion mit GLV-1h68 [72].

Durch eine gemäßigte Tumorzellproliferation und einer langsamen viralen Replikation, welche in einem therapeutischen Index von 27,9 resultiert, eignet sich dieses Tumorzellmodellsystem für Studien der späten Phase einer GLV-1h68 Infektion (42 dpi).

6.2.1 Wachstumsverhalten solider GI-101-Tumore nach Infektion mit GLV-1h68

In einer ersten Studie sollte das Wachstumsverhalten solider GI-101A-Tumore nach Virusinfektion mit GLV-1h68 charakterisiert werden. Dazu wurden 5×10^6 GI-101A-Zellen den Tieren implantiert, und die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. Anschließend wurde das Tumorwachstum bis 39 dpi dokumentiert.

In Abbildung 6.2.1 ist deutlich zu erkennen, dass mock-infizierte Tumore konstant weiter wachsen, wohingegen nach einer Injektion mit GLV-1h68 eine Tumorregression zu beobachten war.

Eine genaue Analyse der Wachstumskurve GLV-1h68-infizierter Tumore zeigte aber, dass innerhalb der ersten 21 Tage es zu einem starken Anschwellen des Tumors kam, und erst nach Erreichen eines Plateaus 21 dpi setzte ein regredierendes Verhalten der Tumore ein.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Virusinfektion ein extremer Stimulus für das Immunsystem ist was zu einer massiven Infiltration von Immunzellen führt und somit den Tumor aufbläht.

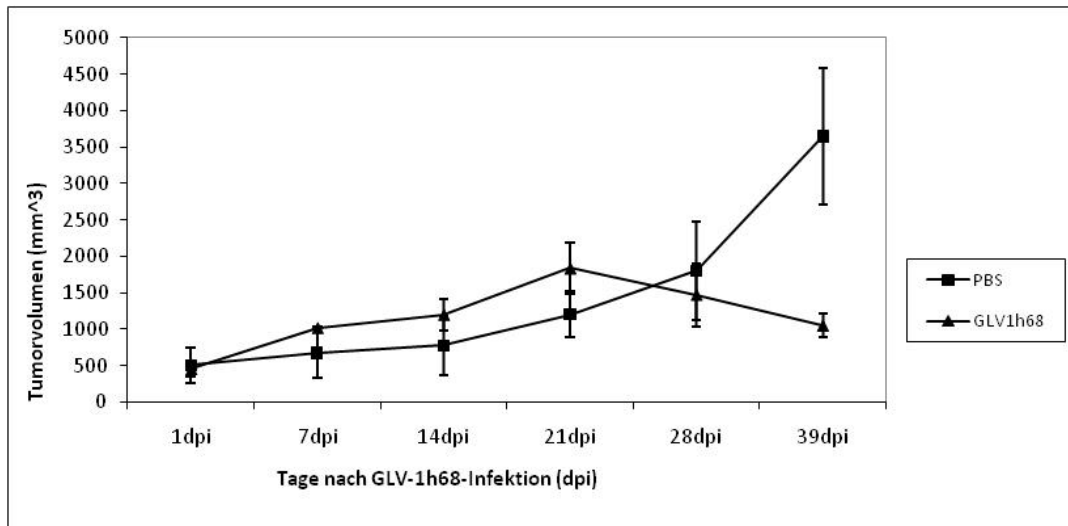


Abb.6.2.1: Tumorstadien von GLV-1h68 infizierten bzw. mock-infizierten soliden GI-101A-Tumoren bis 39 dpi

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert und das Tumorstadium bis 39 dpi dokumentiert.

6.2.2 Untersuchung der Vaskularisierung mit Ausbreitung der GLV-1h68-Infektion in soliden Tumoren

Um einen ersten Eindruck der Tumorchitektur solider GI-101A-Tumore per se und nach GLV-1h68-Infektion zu erhalten, wurden immunhistologische Färbungen mock- bzw. GLV-1h68-infizierter GI-101A-Tumore durchgeführt. Um die allgemeine Struktur des Tumorgewebes wiederzugeben, wurde ein Marker für Zytoskelett (Phalloidin-TRITC) angewandt.

Dafür wurden 5×10^6 GI-101A-Zellen implantiert und bei einem Tumorstadium von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 21 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt, und ein immunhistochemischer Nachweis von Phalloidin-TRITC durchgeführt.

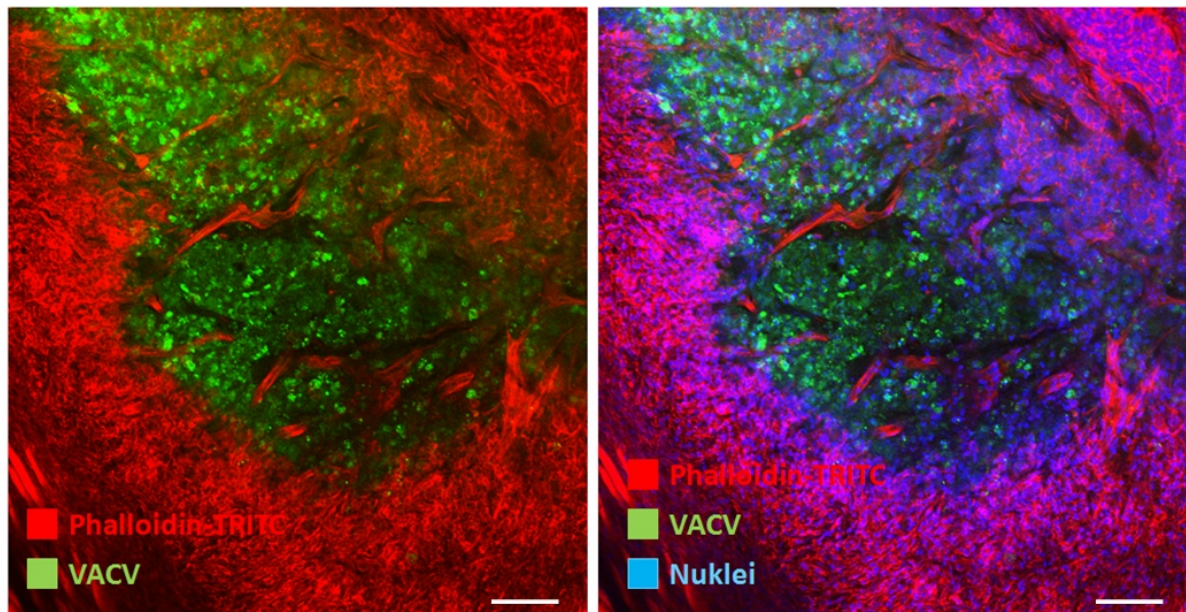


Abb.6.2.2.1: Immunhistochemische Detektion von Phalloidin-TRITC in soliden GI-101A-Tumoren 21 dpi nach Infektion mit GLV-1h68.

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 21 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von Phalloidin-TRITC als Marker des Zytoskeletts durchgeführt. Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen. Zum einen eine Überlagerung von Phalloidin-TRITC mit Virus-bedingter GFP-Expression (links), zum anderen eine Überlagerung von Phalloidin-TRITC, Virus-bedingter GFP-Expression und Nuklei-

Dabei war zu erkennen, dass es bereits 21 dpi zu ausgedehnten Gewebenekrosen in den infizierten Bereichen des Tumors kam, wie es beispielsweise in Abbildung 6.2.2.1 dargestellt ist. Gezeigt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen: zum einen eine Überlagerung von Phalloidin-TRITC mit Virus-bedingter GFP-Expression (links), zum anderen eine Überlagerung von Phalloidin-TRITC, Virus-bedingter GFP-Expression und Nuklei-Anfärben mittels Hoechst 33342 (rechts).

Bei genauerer Analyse der Morphologie der angefärbten Strukturen, konnten Gefäß-artige Formen im Tumorgewebe identifiziert werden. Dabei wurde vermutet, dass es sich höchst wahrscheinlich um Blutgefäße handelt.

Blutgefäße sind essentielle Komponenten des Tumorstromas, die eine ausreichende Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff, Nährstoffen und Immunzellen gewährleisten.

In ihrer Gesamtheit sind Blutgefäße höchst komplexe Strukturen, und weisen neben einer Schicht aus Endothelzellen, eine unterstützende Basallamina sowie eine Schicht stabilisierender Pericyten auf. Um zu überprüfen, ob es sich bei den durch Phalloidin-angefärbten Strukturen tatsächlich um die prognostizierten Blutgefäße handelte, wurden parallel histologische Färbungen dieser drei Komponenten eines nativen Blutgefäßes durchgeführt.

Dabei wurden Endothelzellen durch CD31 detektiert, Pericyten durch einen Antikörper gegen SMA (smooth muscle actin) und die Basallamina durch Anfärbung mit Hilfe eines Antikörpers gegen Col-IV. Die Expression dieser Markermoleküle wurde mit Fortschreiten der Infektion (7, 21 und 42 dpi) analysiert.

Dafür wurden erneut 5×10^6 GI-101A-Zellen implantiert und bei ausreichendem Tumorumfang GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 7, 21 und 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von Col-IV und durchgeführt.

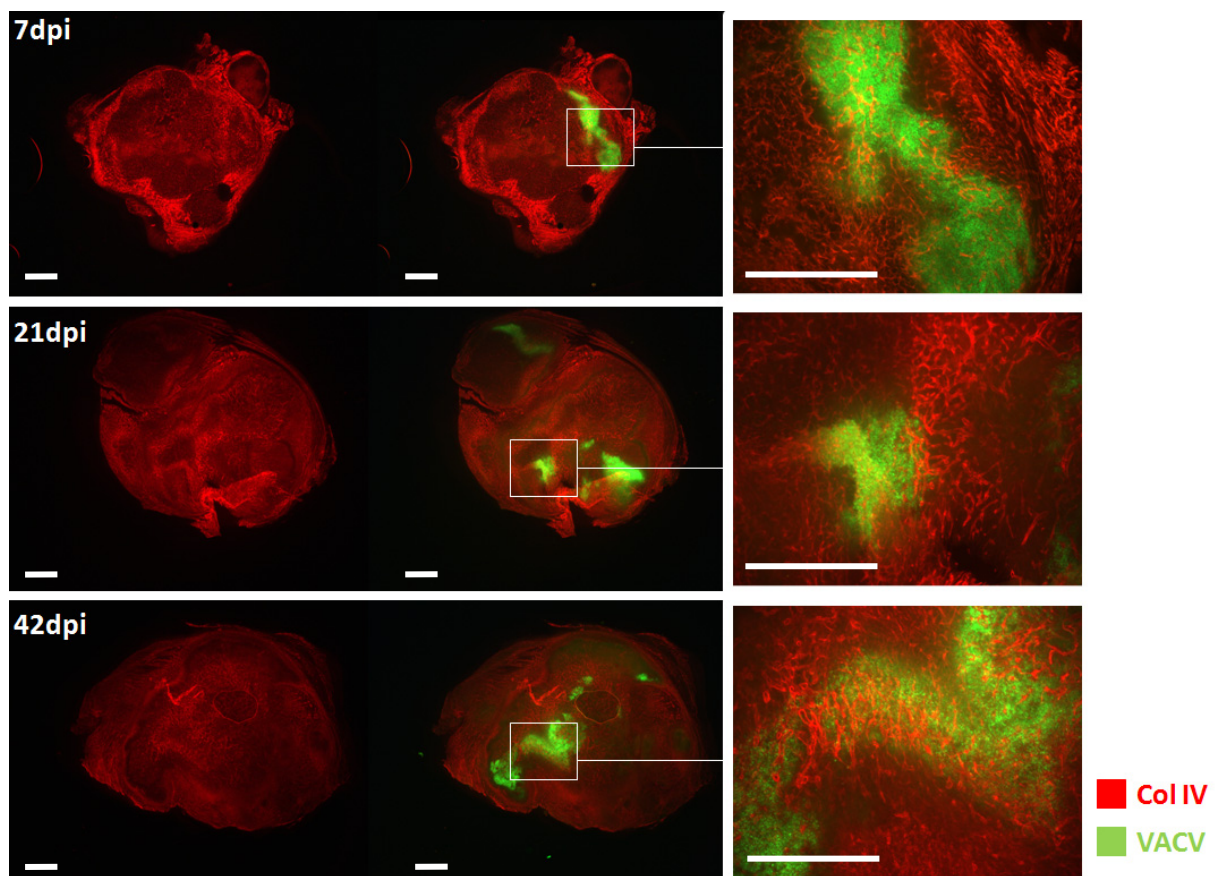


Abb.6.2.2.2: Immunhistochemische Detektion von Col-IV in soliden GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68.

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 7, 21 und 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von Col-IV als Marker der extrazellulären Matrix durchgeführt. Dargestellt ist zum einen die Col-IV-Expression (links) und zum anderen eine Überlagerung der Col-IV-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression (Mitte) mit Fortschreiten der Virusinfektion. Die Größenbalken repräsentieren 1 mm . Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Weiterhin werden Detailaufnahmen der Überlagerung der Col-IV-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression ganz links dargestellt. Die Größenbalken repräsentieren $100 \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

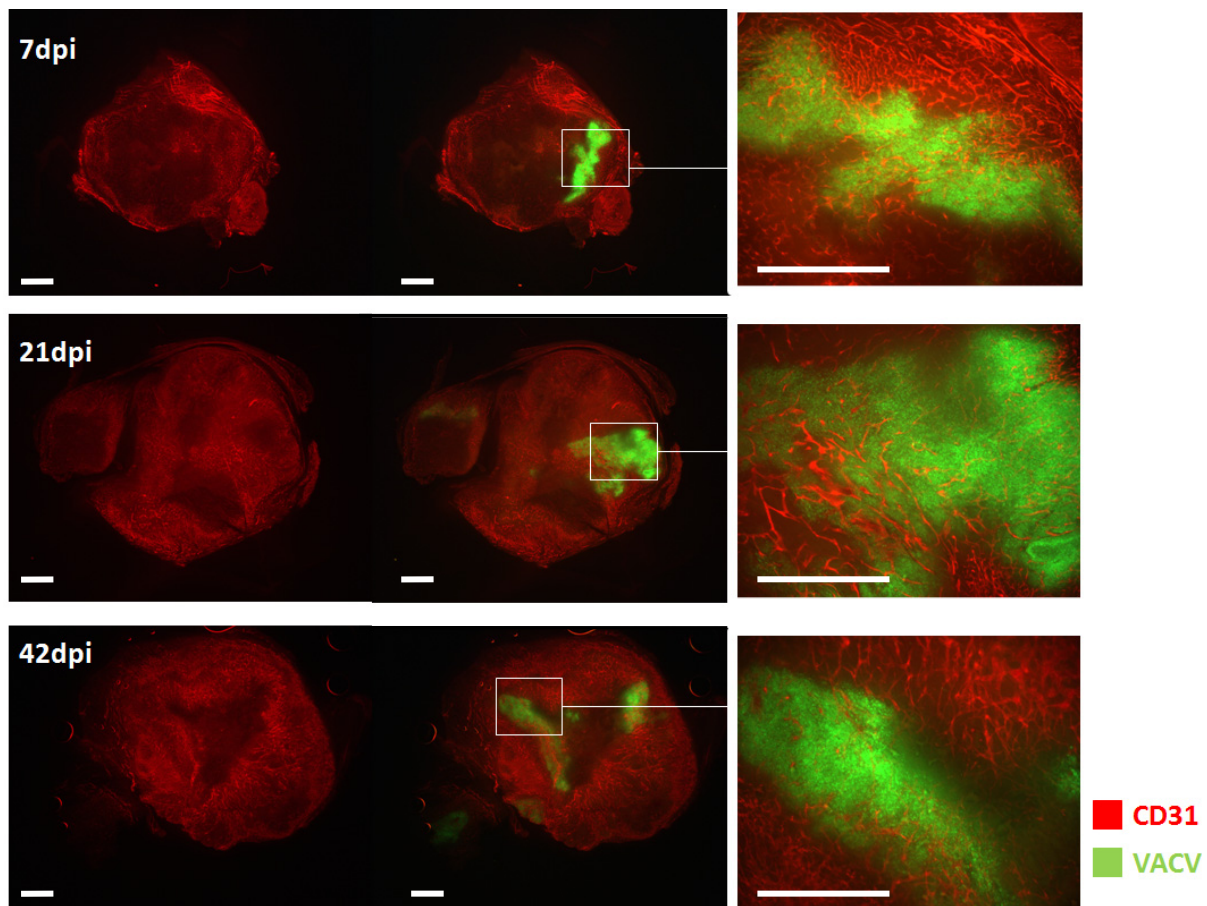


Abb.6.2.2.3: Immunhistochemische Detektion von CD31 in soliden GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68.

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 7, 21 und 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD31 als Marker der Blutgefäße durchgeführt. Dargestellt ist zum einen die CD31-Expression (links) und zum anderen eine Überlagerung der CD31-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression (Mitte) mit Fortschreiten der Virusinfektion. Die Größenbalken repräsentieren 1 mm . Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele. Weiterhin werden Detailaufnahmen der Überlagerung der CD31-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression ganz links dargestellt. Die Größenbalken repräsentieren $100 \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Dargestellt ist zum einen die CD31 bzw. Col-IV-Expression (links) und zum anderen eine Überlagerung der CD31 bzw. Col-IV-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression (Mitte) mit Fortschreiten der Virusinfektion. Weiterhin werden Detailaufnahmen der Überlagerung der CD31 bzw. Col-IV-Expression zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression ganz links dargestellt.

Beide immunhistochemischen Färbungen deuteten an, dass eine Vaskularisierung des kompletten Tumors vorliegt, und diese auch GLV-1h68-infizierte Bereiche nicht ausspart.

Konfokalmikroskopische Detailaufnahmen, wie etwa in Abbildung 6.2.2.4 gezeigt, unterstützen diese Beobachtung. Hier ist eine Kolo-kalsation von CD31 und Col-IV in GLV-1h68-infizierten Bereichen zu erkennen, wie es auch für Blutgefäße im nicht-malignen Gewebe üblich ist.

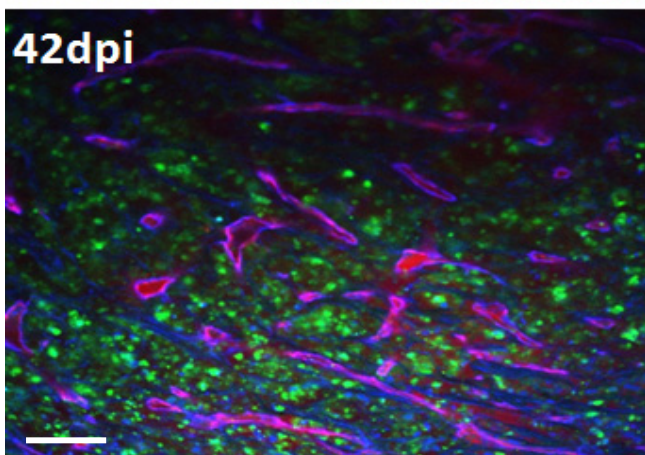
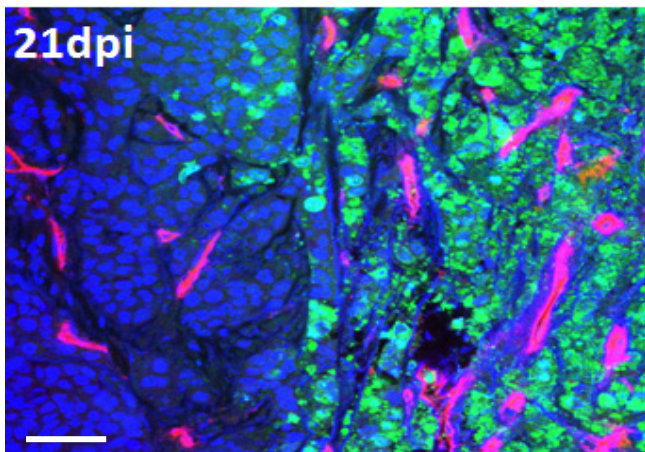
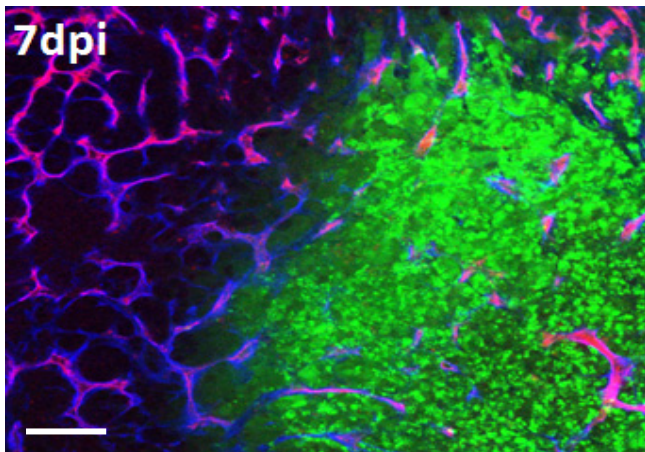
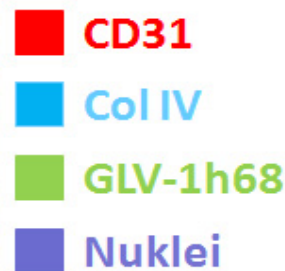


Abb.6.2.2.4: Immunhistochemische Detektion von CD31 in soliden GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68.

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 7, 21 und 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD31 (Cy3), Col IV (Cy5), Nuclei mittels Hoechst 33342 und VACV durch GFP-Expression. Dargestellt sind konfokalmikroskopische Detailaufnahmen dieser Färbungen im zeitlichen Verlauf der Virusinfektion. Die Größenbalken repräsentieren $200 \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.



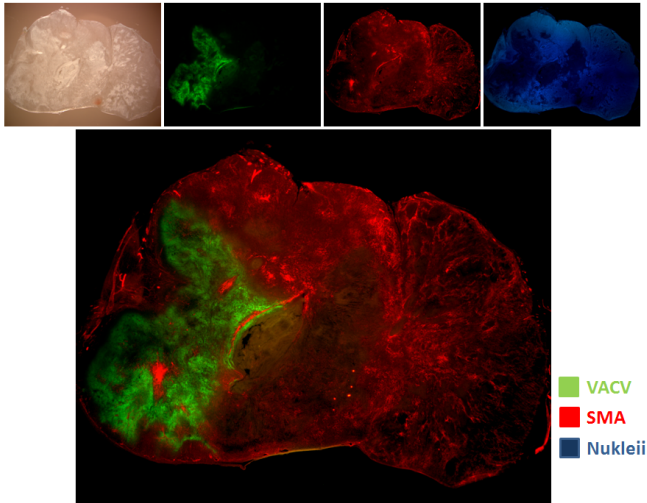
Bei der immunhistochemischen Analyse der Pericyten wurde eine erste Komponente eines intakten Blutgefäßes identifiziert, welche durch GLV-1h68 infiziert und zerstört wird.

Färbung Pericyten-spezifischer Strukturen (Antikörper gegen SMA-smooth muscle actin) ließ 42 dpi in mock infizierten Tumoren ein homogenes Signal im kompletten Tumor erkennen, wohingegen bei GLV-1h68-infizierten Tumoren kein Signal in Virus-infizierten Bereichen zu erkennen war, was auf eine Infektion mit anschließender Zelllyse hindeutet. Im uninfizierten Bereich des Tumors waren die Pericyten intakt (Abbildung 6.2.2.5).

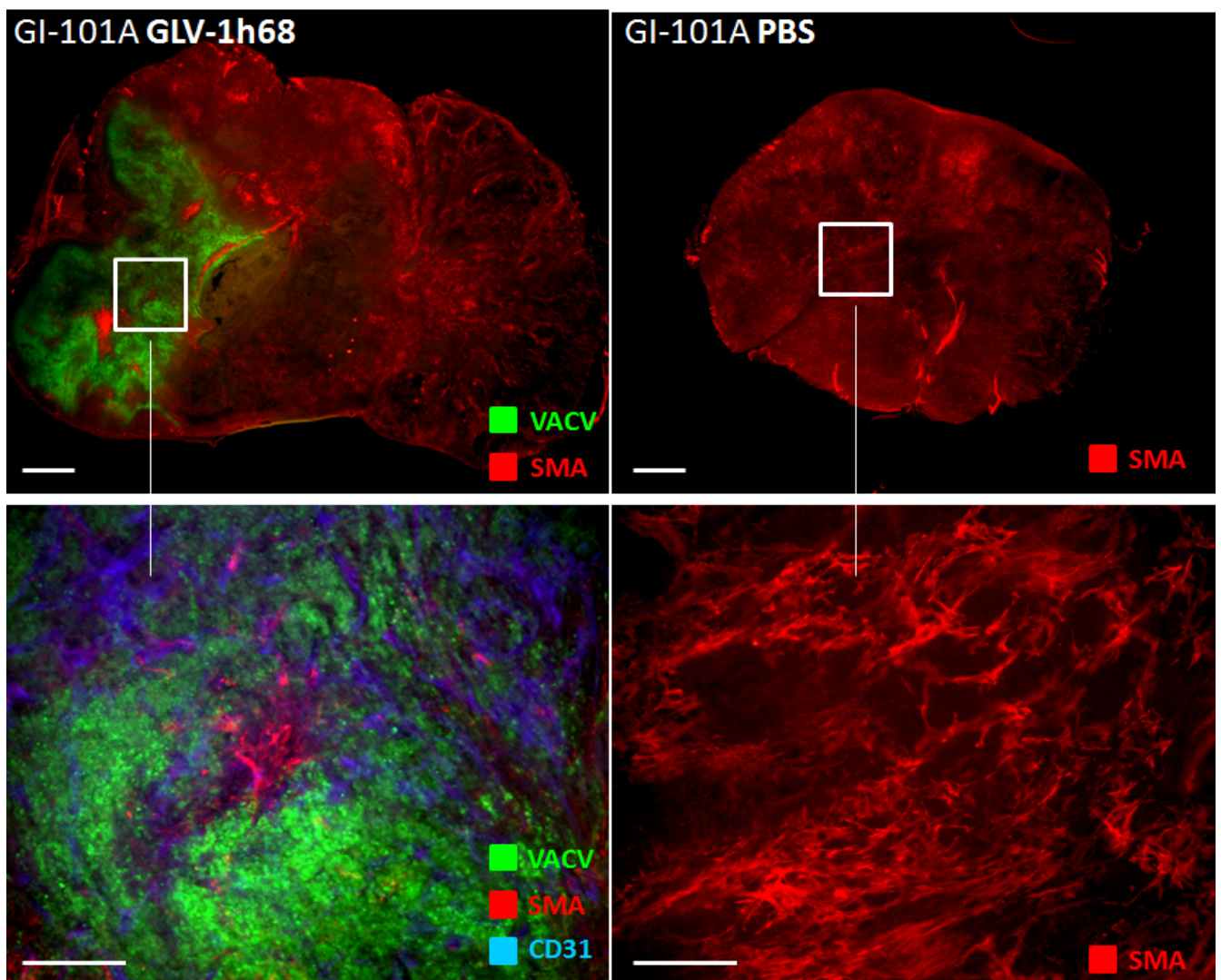
Abb.6.2.2.5: Immunhistochemische Detektion von SMA in soliden GI101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68 42 dpi.

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von SMA (smooth muscle actin) als Pericytenmarker durchgeführt. (A) Dargestellt ist eine Überlagerung der SMA-Expression im kompletten Tumor zusammen mit Virus-bedingter GFP-Expression 42 dpi. Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele. (B) Weiterhin Darstellung der differentiellen SMA-Expression im kompletten Tumor in GLV-1h68-(links) und mock-(rechts) infizierten Tumoren. SMA (rot); GLV-1h68-GFP-Expression (grün). Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele. Zur genaueren Analyse der Pericyten: Detailaufnahmen der GLV-1h68- (links) und mock- (rechts) infizierten Tumoren. Die Größenbalken repräsentieren $100 \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

A



B



Pericyten sind von enorm wichtiger Bedeutung bezüglich der Stabilität von Blutgefäßen. Ein Fehlen dieser stabilisierenden Zellen kann in einer Hyperpermeabilität und Vasodilatation resultieren.

Nach struktureller Analyse der Blutgefäße, sollte in einer weiterführenden Studie ihre Funktionalität nachgewiesen werden.

Dazu erfolgte 42 dpi eine systemische Perfusion der Vaskulatur mit *Lycopersicon esculentum* Lektin. Anschließend wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD31 (Cy5-blau), Lektin-biolinyliert (Streptavidin-Cy3-rot) und Nuklei mittels Hoechst 33342 (orange). Virusausbreitung war durch GFP-Expression (grün) impliziert.

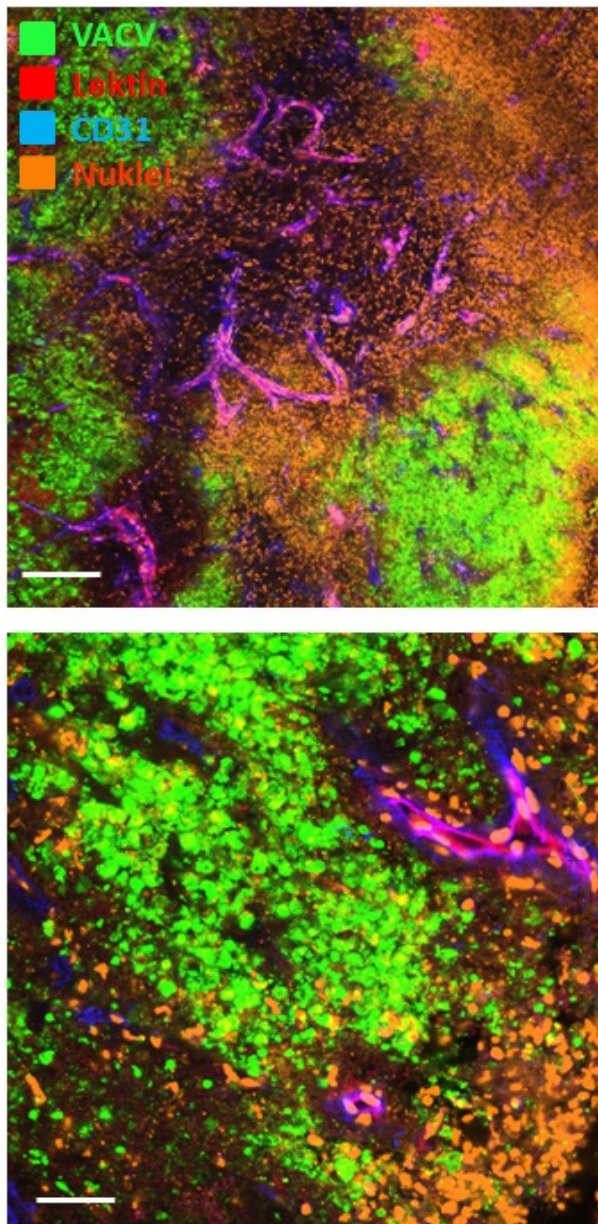


Abb.6.2.2.6: Funktionalitätsanalyse der Blutgefäße in GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68 mit Hilfe von Lektin-Injektion.

5×10^6 GI-101A-Zellen wurden implantiert und mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert. 42 dpi erfolgte eine systemische Perfusion der Vaskulatur mit *Lycopersicon esculentum* Lektin. Anschließend wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD31 (Cy5-blau), Lektin-biolinyliert (Streptavidin-Cy3-rot), Nuclei mittels Hoechst 33342 (orange) und VACV durch GFP-Expression (grün).

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Detailaufnahmen dieser Färbungen. Systemische Perfusion der Vaskulatur mit Lektin zeigte eine Kolokalisation von CD31-

Dargestellt sind in Abbildung 6.2.2.6 konfokalmikroskopische Detailaufnahmen dieser Färbungen. Systemische Perfusion der Vaskulatur mit Lektin zeigte eine Kollokalisierung von CD31-positiven Tumorblutgefäßen (blau) und biotinyliertem Lektin (rot), und deutet somit darauf hin, dass die Tumervaskulatur intakt, funktional und an das periphere Blutgefäßsystem angeschlossen ist.

6.2.3 Suszeptibilitätsstudien von Endothelzellen *in vitro*

Nach umfangreichen Studien der Blutgefäße im soliden Tumor, sollten unterstützend zu diesen Beobachtungen Infektionsstudien von Tumor- und Endothelzellen in Zellkultur durchgeführt werden. Es wurde dabei der Einfluss einer Infektion mit GLV-1h68, zum einen auf GI-101A-Zellen und zum anderen auf die beiden Endothelzelllinien HUVEC- und 2H11-Zellen charakterisiert. HUVEC-Zelle sind humane Endothelzellen, und 2H11-Zellen murine Endothelzellen. Die Auswirkung einer GLV-1h68-Infektion wurde zwei unterschiedlichen Endothelzellen untersucht, um von Spezies-spezifische Eigenschaften auszuschließen.

GI-101A-, 2H11- und HUVEC-Zellen wurden in 6 well-Schalen ausgesät und bei ausreichender Konfluenz mit GLV-1h68 (MOI 1) infiziert. 1 dpi wurden Aufnahmen am Fluoreszenzstereomikroskop angefertigt, um optisch die Suszeptibilität der verschiedenen Zelllinien gegenüber GLV-1h68 zu untersuchen.

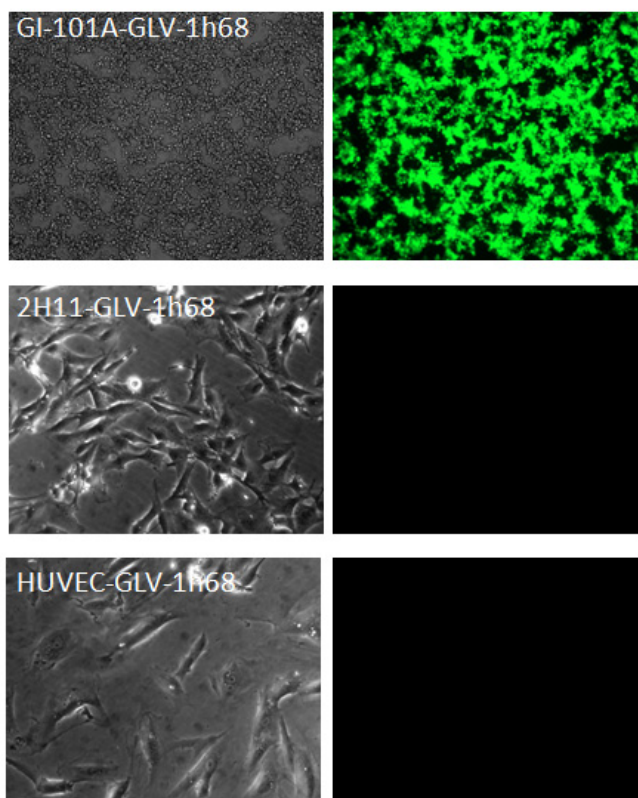


Abb.6.2.3.1: Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Zelllinien

GI-101A, 2H11- und HUVEC-Zellen wurden in 6 well-Schalen ausgesät und bei ausreichender Konfluenz mit GLV-1h68 (MOI 1) infiziert. 1 dpi wurden Aufnahmen am Fluoreszenzstereomikroskop angefertigt, um optisch die Suszeptibilität

In Abbildung 6.2.3.1 ist deutlich zu sehen, dass nur die Tumorzellen durch das Virus infiziert wurden, aber weder bei humanen noch bei murinen Endothelzellen eine Virusinfektion in Form von GFP-Expression zu erkennen war.

Um diese Zellkulturstudien unter Tumormikromilieu-ähnlichen Konditionen durchführen zu können, wurde dieser Versuchsablauf wiederholt, nachdem Tumorzellen und Endothelzellen auf Matrigel ausgesät worden waren. Bei Matrigel handelt es sich um ein Extrakt muriner extrazellulärer Matrix, was ermöglichen soll, Tumor-ähnliche Bedingungen auf Zellkulturniveau zu schaffen.

In einem Vorversuch musste zunächst der Einfluss des Matrigels per se auf die drei Zelllinien getestet werden. Dazu wurden GI-101A-, 2H11- und HUVEC-Zellen separat jeweils in 6 well-Schalen mit bzw. ohne Matrigel ausgesät, und ihr Wachstumsverhalten auf Matrigel charakterisiert. Wie in Abbildung 6.2.3.2 A ersichtlich, zeigen alle drei Zelllinien bedingt durch Kultivierung auf Matrigel ein geändertes Wachstumsverhalten. GI-101A-Zellen akkumulieren, wohingegen die beiden Endothelzelllinien zu netzartigen Strukturen tendieren.

In einer nächsten Stufe wurde das Zellwachstum einer Kokultur von GI-101A-Zellen mit jeweils einer der beiden Endothelzelllinien beschrieben. Dargestellt wird dies in Abbildung 6.2.3.2 B: GI-101A-kombiniert mit 2H11-Zellen, sowie GI-101A- kombiniert mit HUVEC-Zellen wurden auf Matrigel ausgesät. Dabei war zu erkennen, dass Endothelzellen zunächst netzartige Strukturen ausgebildet hatten, welche von GI-101A-Zellen ummantelt wurden. In diesem Versuch wurden lentiviral modifizierte GI-101A-Zellen verwendet, welche in der Lage waren RFP zu exprimieren. Daher konnte die äußere Zellschicht auch eindeutig als GI-101A Zellen identifiziert werden.

Nachdem das Wachstumsverhalten einzeln sowie kokultivierter GI-101A und Endothelzellen untersucht wurde, konnte in einem letzten Schritt nun die Infektion mit GLV-1h68 erfolgen, und der Einfluss auf die verschiedenen Zellpopulationen beschrieben werden. In diesem Versuch wurden GI-101A-Zellen kombiniert mit 2H11-Zellen, sowie GI-101A- kombiniert mit HUVEC-Zellen auf Matrigel kokultiviert und mit GLV-1h68 (MOI 1) infiziert. 1 dpi wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt, um optisch die Suszeptibilität von 2H11- und HUVEC-Zellen in Kokultur mit GI-101A auf verschiedenen Ebenen dieser Zellakkumulate zu charakterisieren (Abbildung 6.2.3.2 C).

Mittels Stack-Analyse wurde die GLV-1h68-Infektion in einer Akkumulation von GI-101A- und HUVEC-Zellen sowie GI-101A- und 2H11-Zellen mit mikroskopischen Aufnahmen illustriert.

In beiden Analysen war deutlich zu erkennen, dass ausschließlich die Tumorzellen, und nicht die Endothelzellen durch das Virus infiziert wurden.

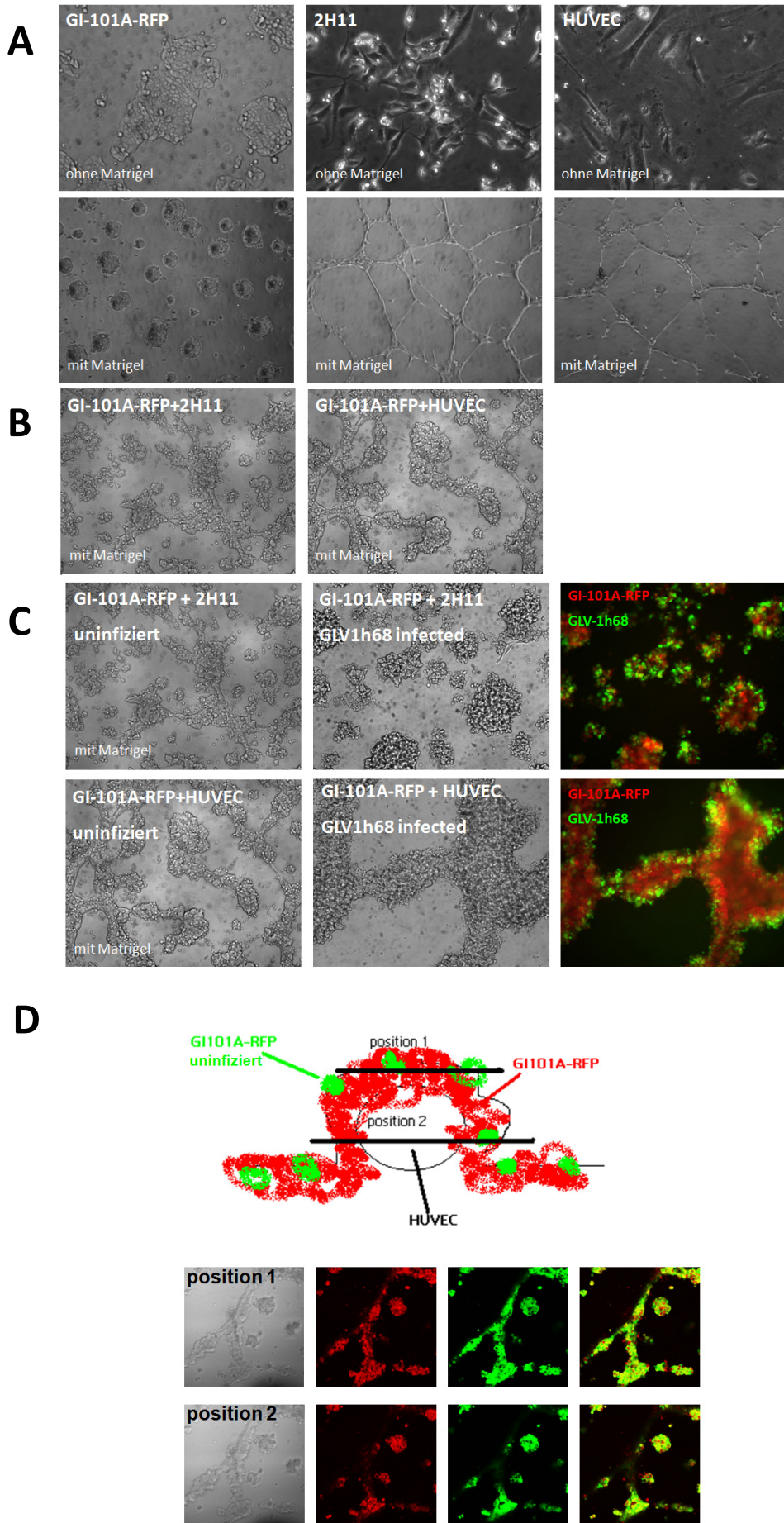


Abb.6.2.3.2: Vergleich der Suszeptibilität verschiedener Zelllinien

(A) GI-101A, 2H11- und HUVEC-Zellen wurden separat jeweils in 6 well-Schalen mit bzw. ohne Matrigel ausgesät, um ihr Wachstumsverhalten auf Matrigel zu charakterisieren. (B) GI-101A- kombiniert mit 2H11-Zellen sowie GI-101A- kombiniert mit HUVEC-Zellen wurden auf Matrigel kokultiviert, um ihr Wachstumsverhalten auf Matrigel zu charakterisieren. (C) GI-101A- kombiniert mit 2H11-Zellen, sowie GI-101A- kombiniert mit HUVEC-Zellen wurden auf Matrigel kokultiviert, und mit GLV-1h68 (MOI 1) infiziert. 1 dpi wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt, um optisch die Suszeptibilität von 2H11- und HUVEC-Zellen in Kokultur mit GI-101A zu analysieren. (D) Mittels Stack-Analyse

6.2.4 Charakterisierung des Immunzellinfiltrates 42 Tage nach Infektion

Eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 erleichtert eine Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe. Dieser Mechanismus wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht, und wird als „leukocyte rolling“ bezeichnet.

Nachdem eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 bedingt durch GLV-1h68-Infektion in GI-101A-Tumoren beobachtet wurde, sollte überprüft werden, ob es auch zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das infizierte Tumorgewebe kommt. Dies sollte mit Hilfe immunhistologischer Analyse der beiden Immunzellmarker MHC II und CD45 erfolgen. MHC II wurde dabei als Marker für Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen verwendet, wohingegen CD45 als Marker aller Leukozytenpopulationen eingesetzt wurde.

Durch diese beiden Antikörperfärbungen konnte somit keine genauere Klassifizierung der Leukozytensubpopulationen erfolgen. Ziel war es vielmehr allgemein gefasst, generelle Präsenz oder Ausbleiben einer Immunantwort zu visualisieren.

Dafür wurden zunächst 5×10^6 GI-101A-Zellen implantiert und mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert. 21 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Vibratom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und Aufnahmen am Fluoreszenzstereomikroskop von MHC II und CD45 durchgeführt.

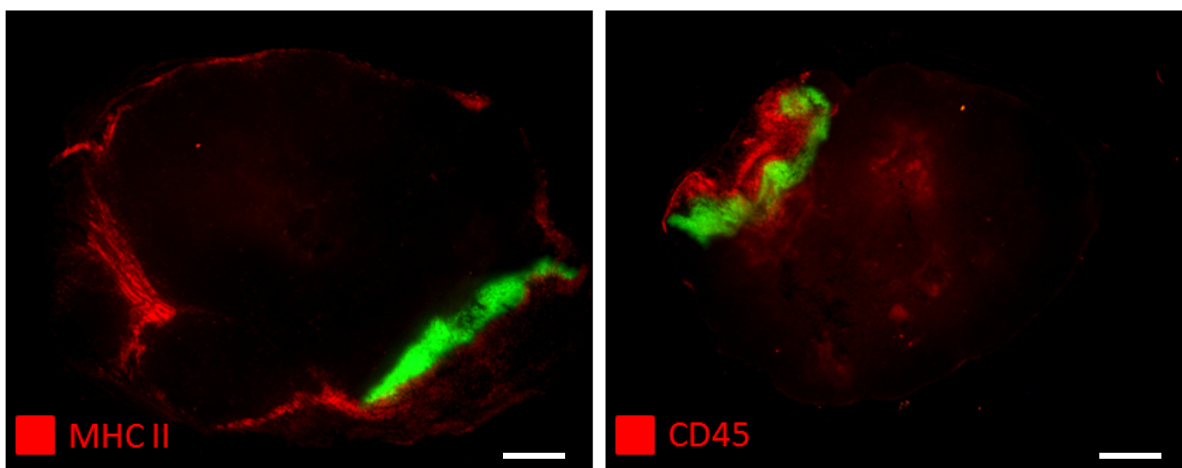


Abb.6.2.4.1: Immunhistochemische Detektion von MHC II und CD45 in soliden GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68 21 dpi.

5×10^6 GI-101A-Zellen wurden implantiert und mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert. 21 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von MHC II und CD45 durchgeführt.

Dargestellt sind (links) Colokalisationsstudien von MHC II (Cy3-rot) mit VACV GLV-1h68 (grün) sowie (rechts) Colokalisationsstudien von CD45 (Cy3-rot) mit VACV GLV-1h68 (grün). Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

In Abbildung 6.2.4.1 sind (links) Kolokalisationsstudien von MHC II (Cy3-rot) mit VACV GLV-1h68 (grün) sowie (rechts) Kolokalisationsstudien von CD45 (Cy3-rot) mit VACV GLV-1h68 (grün) dargestellt.

Bei beiden Färbungen ist eine Akkumulation der angefärbten Zellen am Rand des Viruspatches zu erkennen.

Um die genaue Lokalisation der MHCII-positiven, bzw. CD45-positiven Zellen auch im Viruspatch zu ermöglichen, wurden konfokalmikroskopisch Detailaufnahmen innerhalb des Viruspatch angefertigt. (Abbildung 6.2.4.2).

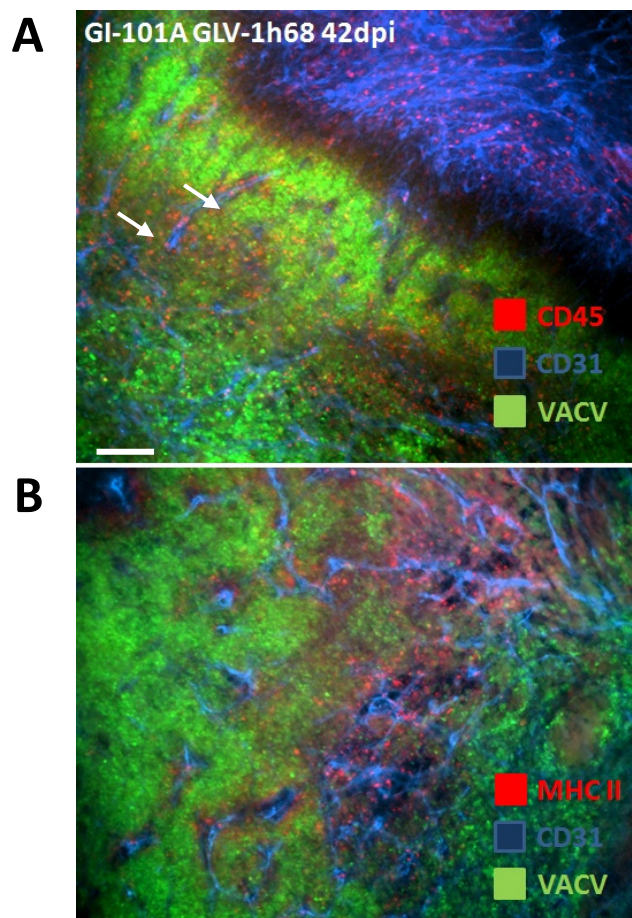


Abb.6.2.4.2: Immunhistochemische Detektion von MHC II und CD45 in soliden GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h68 42 dpi.

5×10^6 GI-101A-Zellen wurden implantiert und mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert. 42 dpi wurden die Tumore entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke $100 \mu\text{m}$ angefertigt und eine immunhistochemische Detektion von CD45 (Cy 3-rot) und MHC II (Cy3-rot) durchgeführt. Blutgefäße wurden durch CD31 (Cy 5-blau) angefärbt. Virale Ausbreitung ist durch GFP-Expression (grün) sichtbar.

Dargestellt sind (A) Kolokalisationsstudien von CD45 (Cy3-rot) mit CD31 (Cy 5-blau) und VACV GLV-1h68 (grün) sowie (B) Kolokalisationsstudien von MHC II (Cy3-rot) mit CD31 (Cy 5-blau) und VACV GLV-1h68 (grün). Die Größenbalken repräsentieren $100 \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

In Abbildung 6.2.4.2 werden Kolokalisationsstudien von Blutgefäßen und Immunzellen in GLV-1h68-infizierten Viruspatches gezeigt. In Teilabbildung A wird die Verteilung CD45-positiver Zellen demonstriert. Es ist zu erkennen, dass sowohl am Randbereich, als auch im Inneren eines Viruspatches Immunzellen präsent sind. An vereinzelt Stellen ist das aktive Übertreten CD45-positiver Zelle aus dem Blutgefäß in das Tumorgewebe zu erkennen (Abbildung 6.2.4.2 A; weißer Pfeil). Nahezu identische Beobachtungen konnten bei Anfärben MHC II positiver-Zellen gemacht werden. Mit Hilfe der bisherigen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass von den drei potentiell möglichen Mechanismen einer viral vermittelter Onkolyse die Zerstörung der Tumervaskulatur, und eine dadurch gefolgte Aushungern des Tumors, ausgeschlossen werden konnte. Die Blutgefäße blieben auch bei einer ausgebreiteten GLV-1h68-Infektion intakt und waren funktional. Die beiden verbleibenden Mechanismen -Tumorzell-spezifische Onkolyse und anti-tumorale Immunantwort- konnten beide in GLV-1h68-infizierten GI-101A-Tumoren nachgewiesen werden. Aktive Onkolyse wurde durch ausgedehnte Nekrose impliziert, und eine Virus-induzierte Immunzellrekrutierung konnte durch immunohistochemische Färbung MHC II und CD45-positiver Zellen verdeutlicht werden. In einer abschließenden Studie sollte die Beteiligung dieser beiden Wirkungsmechanismen für eine Tumorregression untersucht werden

Hierfür wurde eine intraperitoneale Applikation des immunsuppressiven Agens Cyclophosphamid unmittelbar nach der Infektion begonnen. Dadurch sollte eine Depletion der Monozyten erzielt werden, und der ausschließliche Einfluss der Onkolyse untersucht werden.

Dafür wurden zunächst 5×10^6 GI-101A-Zellen implantation und bei einem Tumolvolumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw mock-infiziert. 7 dpi wurde mit einer intraperitonealen Applikation von CPA begonnen, welche 2-mal wöchentlich fortgeführt wurde. In diesem Zeitraum wurde das Tumorwachstum dokumentiert.

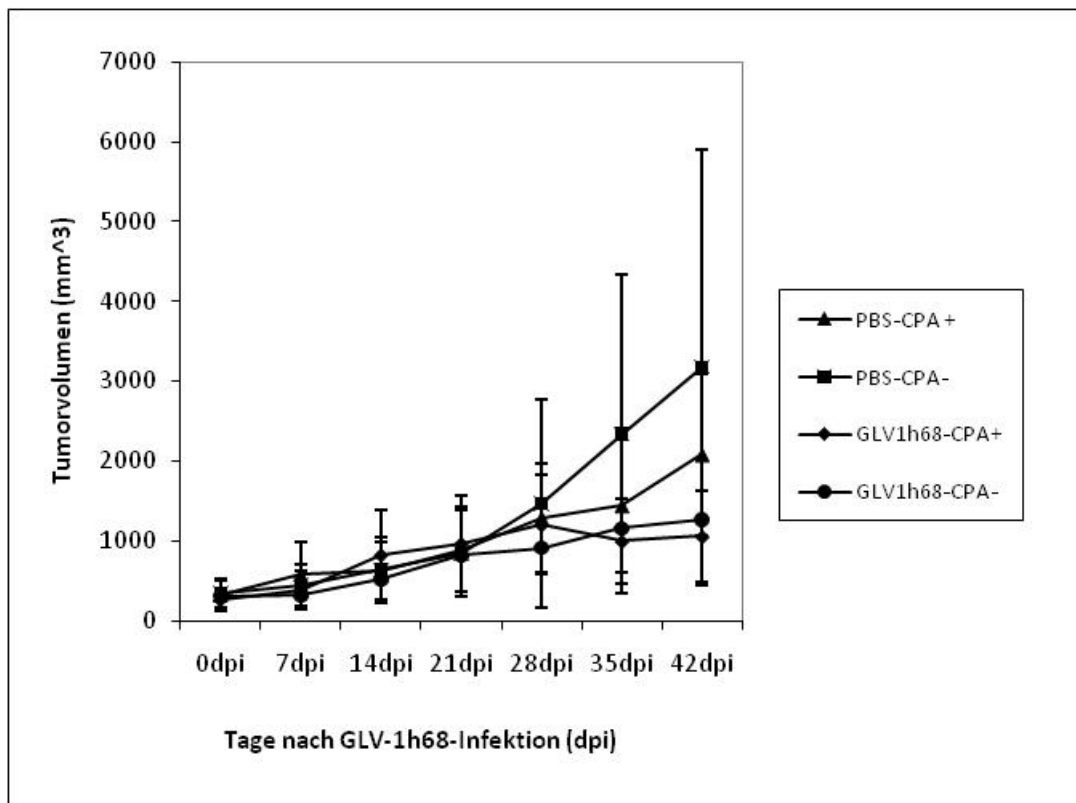


Abb.6.2.4.3: Tumorvolumina von GLV-1h68 infizierten bzw. mock-infizierten soliden GI-101A-Tumoren bis 42 dpi mit bzw. ohne CPA-Behandlung

Nach Implantation von 5×10^6 GI-101A-Zellen wurden die Tumore bei einem Volumen von ca. 300 mm^3 mit GLV-1h68 (5×10^6 pfu) infiziert bzw. mock-infiziert. 7 dpi wurde mit einer intraperitonealen Applikation von CPA begonnen, welche 2-mal wöchentlich fortgeführt wurde. In diesem Zeitraum wurde das Tumorstadium dokumentiert.

Auswertung der Wachstumskurven der Tumorvolumina in Abbildung 6.2.4.3 ergab, dass im Fall von GLV-1h68-infizierten CPA-behandelten Tumoren 28 dpi eine Tumorregression einsetzte. Dagegen wurde 42 dpi bei CPA-unbehandelten GLV-1h68-infizierten Tumoren ein deutlich höheres Tumorvolumen festgestellt.

Um die Ursache für dieses differentielle Verhaltensmuster nach Virusinjektion erklären zu können wurden Agaroseschnitte angefertigt, um Veränderungen im Tumor histologisch charakterisieren zu können.

Zunächst sollte die flächige Ausbreitung des Virus im Tumorgewebe charakterisiert und quantifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.2.4.4 dargestellt

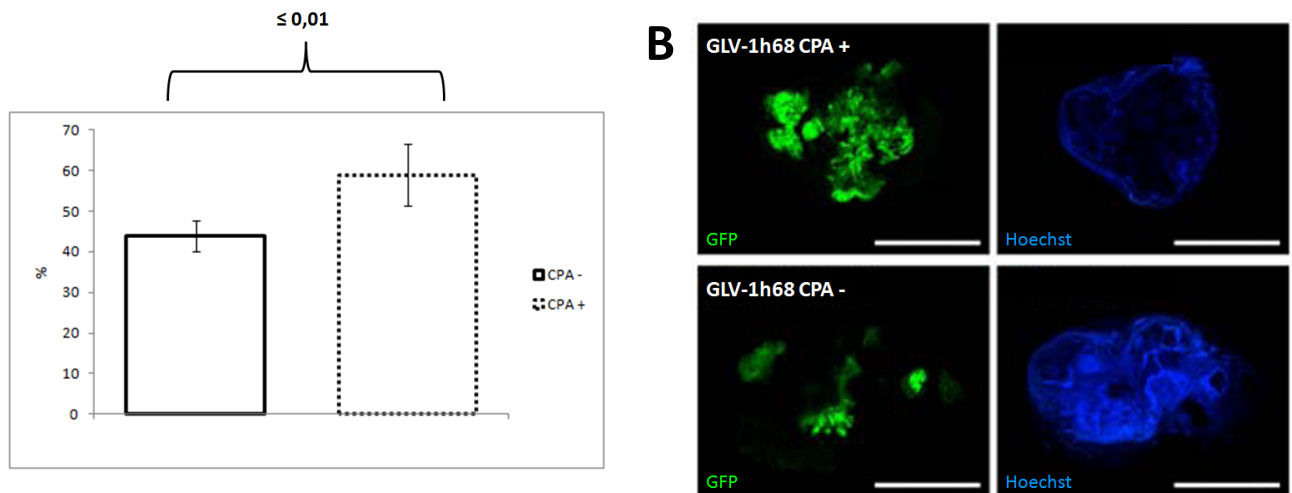


Abb.6.2.4.4: Quantifizierung der viralen Ausbreitung nach bzw. ohne CPA-Behandlung

(A) Dargestellt ist die Quantifizierung zur Verteilung von GLV-1h68 im Tumorgewebe 42 dpi. Diese wurde mittels der GFP-Expression in kompletten Tumorschnitten (5 unterschiedliche Tumore pro Gruppe) visualisiert. Zur Darstellung der kompletten Tumorfläche wurden parallel Aufnahmen der Nukleii gemacht und anschließend wurden alle Aufnahmen in 8-bit Graustufenbilder umgewandelt, und durch Analyse mittels ImageJ zur Quantifizierung der Ausmaße der Virusinfektion in Tumorgewebeschnitten genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung. (B) Repräsentative Bilder von CPA-behandelten GLV-1h68-infizierten Tumoren verglichen mit CPA-unbehandelten GLV-1h68-infizierten Tumoren demonstrierte im Falle der Immundepletion eine ausgedehntere Onkolyse. Die Größenbalken repräsentieren 5 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Bilder.

Für die Quantifizierung wurden Gewebeschnitte angefertigt und als einzige Färbung wurden Nukleii mittels Hoechst 33342 angefärbt. Mittels der Hoechst-Färbung sollte die komplette Tumorfläche visualisiert werden. Nach Fixierung der Gewebeschnitte auf Objektträgern wurden Aufnahmen der GFP-Expression und des Hoechst-Signals in kompletten Tumorschnitten (5 unterschiedliche Tumore pro Gruppe) erstellt und anschließend wurden alle Aufnahmen in 8-bit Graustufenbilder umgewandelt, und durch Analyse mittels ImageJ zur Quantifizierung der Ausmaße der Virusinfektion in Tumorgewebeschnitten genutzt. In Abbildung 6.2.4.4 A dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung und in Abbildung 6.2.4.4 B repräsentative Bilder von CPA-behandelten GLV-1h68-infizierten Tumoren verglichen mit CPA-unbehandelten GLV-1h68-infizierten Tumoren.

Dabei ist im Fall der Immundepletion eine ausgedehntes GFP-Signal und eine ausgedehnte Onkolyse zu erkennen. Bei CPA-unbehandelten Tumoren ist die Anzahl GFP-positiver Zellen deutlich geringer. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass Onkolyse der dominierende Effekt des Virus ist, welcher zur Tumorregression führt. Je großflächiger das Virus sich in kurzer Zeit im Tumorgewebe ausbreiten kann, um zu schneller und effizienter ist die Tumorregression

In einer zweiten Studie sollte durch Fluoreszenzintensitätsmessungen von rekrutierten MHC II-positiven Zellen in GLV-1h68 CPA- behandelten- bzw. unbehandelten GI-101A-Tumoren die Präsenz

von Immunzellen in den Tumoren untersucht werden. Das Fluoreszenzsignal wurde in 5 verschiedenen Tumoren (4 Aufnahmen pro Tumor) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

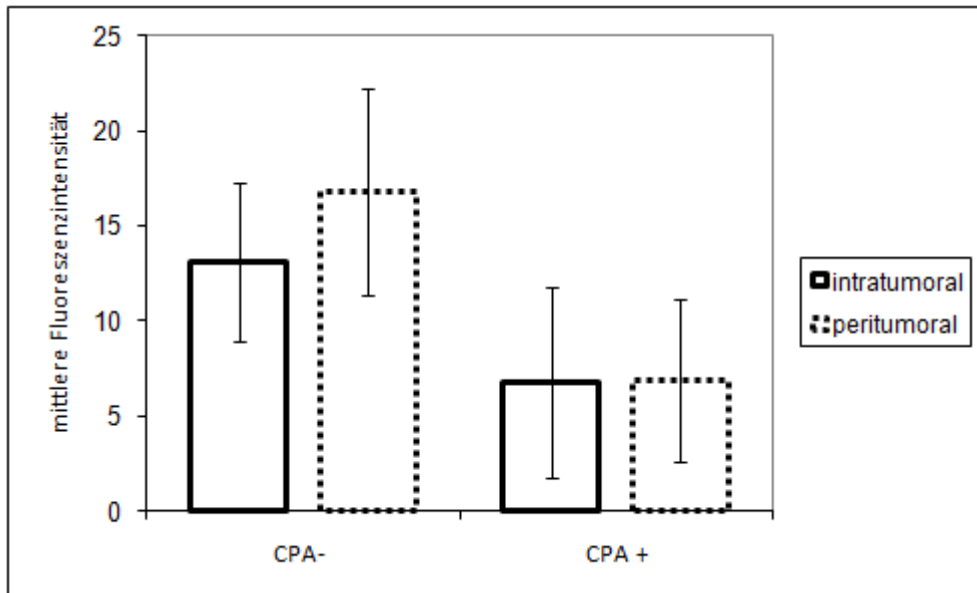


Abb.6.2.4.5: Quantifizierung der Infiltration MHC II-positiver Zellen in intra- bzw. peritonealen Bereichen nach bzw. ohne CPA-Behandlung

Fluoreszenzintensitätsmessungen von rekrutierten MHC II-positiven Zellen in GLV-1h68 CPA- behandelten- bzw. unbehandelten GI-101A-Tumoren. Das Fluoreszenzsignal wurde in 5 verschiedenen Tumoren (4 Aufnahmen pro Tumor) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung.

In Abbildung 6.2.4.5 ist das Ergebnis der Quantifizierung der rekrutierten Immunzellen dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in den CPA-behandelten Tumoren, sowohl im peritonealen wie auch im intraperitonealen Bereich des Tumors, deutlich weniger Immunzellen detektiert werden konnten, als vergleichsweise in den CPA-unbehandelten Tumoren.

Trotz der geringeren Präsenz der Immunzellen in CPA-behandelten Tumoren, konnte eine stärkere Tumorregression festgestellt werden.

Zusammenfassend deutet dies an, dass eine Depletion der Monozyten die Virusausbreitung begünstigt, und zu einer ausgedehnteren Onkolyse führt, was wiederum zur Tumorregression führt.

7 Diskussion

Im Rahmen der Krebsforschung wurden zahlreiche Therapiekonzepte entwickelt, um ein Heilmittel gegen Krebs zu entwickeln. Es wurde aber deutlich, dass Krebs ein höchst vielgestaltiges Krankheitsbild ist und sehr unterschiedliche pathologische Charakteristika aufweisen kann. Einen weiteren, sehr entscheidenden Beitrag bei der Entwicklung von Krebstherapeutika leistete zudem die histologische Charakterisierung malignen Gewebes. Dabei wurde nachgewiesen, dass es sich bei einem Tumor um einen Zusammenschluss verschiedenster Zelltypen handelt, die neben neoplastischen Zellen, auch zu einem großen Teil aus nicht-neoplastischen Zellen bestehen. Zu den nicht-neoplastischen Zellen zählen beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen. Diese werden in ihrer Gesamtheit als Tumorstroma bezeichnet. Die quantitative Zusammensetzung der nicht-neoplastischen Zellen des Tumorstromas unterscheidet sich in jedem Tumortyp.

Geleitet durch diese Erkenntnisse, wurde eine deutlich zielgerichtetere Forschung möglich, welche sich nicht eine globale Heilung von Krebs als Ziel setzte, sondern eine spezielle Form einer Krebserkrankung therapieren sollte und dabei auch verschiedene Zellpopulationen des Tumorstromas für anti-tumorale Effekte nutzte. Beispielhaft dafür sind unter anderem die Forschungsarbeiten von Folkman *et al.*, welche durch eine Inhibition der Tumorangio-genese ein Aushungern des Tumors durch mangelnde Blutversorgung induzierte [67].

Als äußerst vielversprechendes Tumorthapeutikum haben sich in den letzten Jahren onkolytische Viren erwiesen, welche nach Applikation zu einer ausschließlichen Kolonisierung des malignen Gewebes führen und, gefolgt von einer effektiven Replikation, schließlich eine Tumorregression verursachen können.

Auch wenn einige Vertreter dieser onkolytischen Viren bereits in klinischen Studien Anwendung finden, sind die zugrundeliegenden Prinzipien von Infektion und Regression noch nicht alle verstanden.

Dies trifft auch für das in dieser Arbeit verwendete Vaccinia Virus GLV-1h68 zu. In zahlreichen prä-klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nach einmaliger systemischer Applikation von GLV-1h68 Tumorregression, bis hin zur totalen Tumorlyse erzielt wird [72, 80-81]. Auswirkungen der Infektion auf die Tumormikroumgebung und Komponenten des Tumorstromas wurden bisher aber noch nicht hinreichend charakterisiert. Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob möglicherweise eine Vaccinia Virus-Therapie mit GLV-1h68 noch weiter optimiert werden kann.

In einem ersten Teilaspekt wurde die frühe Phase einer GLV-1h68-Infektion eines soliden Tumors charakterisiert. Dabei wurde ein autologes Melanomzellpaar als Tumormodell verwendet. Die beiden Zelllinien 888-MEL und 1936-MEL wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Pathogenese aus widerkehrenden Metastasen des Patienten 888 isoliert. Interessanterweise zeigten diese beiden Zelllinien im Xenograftmodell unterschiedliches Regressionsverhalten nach GLV-1h68-Infektion. Während solide 888-MEL-Tumore nach Injektion regredierte (*responder*), wuchsen solide 1936-MEL-Tumore konstant weiter (*poor-responder*).

Unerwartet war diese Beobachtung, da in Zellkulturexperimenten die beiden Zelllinien eine nahezu gleiche Antwort auf GLV-1h68-Infektion zeigten. In beiden Zelllinien führte eine Infektion zu einer homogenen Ausbreitung des Virus mit identischen viralen Titern.

Dieses uneinheitliche Replikationsverhalten von GLV-1h68 in den beiden Zelllinien *in vitro* und *in vivo* kann nur durch Zelllinien-spezifische Eigenschaften erklärt werden.

Während die beiden Zelllinien *per se* eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer GLV-1h68 Infektion in Zellkulturexperimenten aufweisen, müssen intrinsische Faktoren der 1936-MEL-Zellen eine fundamentale Auswirkung auf das Tumormikromilieu haben, welche eine Ausbreitung des Virus im Tumor erschwert.

Eine erste Hypothese war, dass bedingt durch eine differentielle Vaskularisierung in 888-MEL und 1936-MEL-Tumoren unterschiedliche virale Titer in den ersten 24 h nach Virusinfektion das Tumorgewebe erreichen. Dies wurde durch zwei voneinander unabhängige Studien überprüft. In beiden Fällen konnte aber gezeigt werden, dass ungefähr gleiche Virusmengen das Tumorgewebe erreichen und somit andere stromale Faktoren als die Vaskulatur für das divergente Replikationsverhalten des Virus in 888-MEL-Tumoren, verglichen mit 1936-MEL-Tumoren, verantwortlich sind.

Um die genetisch bedingte Modulation der Tumormikroumgebung der 1936-MEL-Tumore, verglichen mit 888-MEL-Tumoren, genauer erschließen zu können, wurde mit Hilfe weiterer Studien versucht, den Aufbau von soliden 888-MEL und 1936-MEL-Tumoren histologisch zu charakterisieren und die Komponenten der Tumormikroumgebung zu identifizieren, welche bei 888-MEL eine effiziente GLV-1h68-Infektion und -Replikation ermöglichen.

Dabei konnte durch immunhistochemische Färbungen gezeigt werden, dass bei soliden 888-MEL-Tumoren eine stark erhöhte Infiltration CD45-positiver Zellen erfolgt, wohingegen bei 1936-MEL-Tumoren nur eine geringe Anzahl CD45-positiver Zellen nachgewiesen werden konnte.

CD45 wird von allen Leukozyten exprimiert und ist somit ein repräsentativer Marker eines Immuzellinfiltrates in den Tumoren, die keine weiteren Schlüsse über die genaue Immuzellsubpopulation zulässt.

Gestützt werden konnten diese Ergebnisse durch transkriptionelle Untersuchungen von GLV-1h68- und mock-infizierten Tumoren mittels Microarray-Analysen. Dadurch konnte eine erhöhte Expression immunstimulatorischer Chemokine, wie beispielsweise CCL8 (MCP-2) nachgewiesen werden. MCP-2 ist ein wichtiger Vermittler der Monocyten- und Lymphozyten-Migration und ist unter anderem auch bei der Migration von Monocyten zu inflammatorischem Gewebe beteiligt.

Durch eine erhöhte Expression MHC II- verwandter Gene, wie beispielsweise H2-Ke2, H2-T10, H2-Aa, H2-K1, H2-T9, H2-T23, H2-D1, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Infiltrat CD45-positiver Zellen um Monocyten bzw. Makrophagen handelt.

Somit konnte in soliden 888-MEL-Tumoren eine eindeutige Signatur chemotaktischer Cytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Dies resultiert in der Folge in einer massiven Infiltration CD45-positiver Zellen. Durch Ausbleiben dieser chemotaktischen Reize, war demzufolge auch das geringe Signal CD45-positiver Zellen in Gewebeschnitten der 1936-MEL-Tumoren zu erklären.

Nachdem das Vorkommen der Immuzellen transkriptionell und visuell nachgewiesen werden konnte, sollte in weiteren Experimenten deren Funktion analysiert werden, um eine mögliche Korrelation mit der Empfänglichkeit eines soliden Tumors für eine GLV-1h68-Infektion zu prüfen.

Durch Applikation des immunsupprimierenden Agens Cyclophosphamid (CPA) bei 888-MEL-tragenden Mäusen sollte die Funktion der CD45-positiven Zellen näher analysiert werden.

Durch regelmäßige Injektion des Immunsuppressivums unmittelbar nach Implantation der 888-MEL-Tumore sollte eine Integration der Leukozyten in das Tumormikromilieu verhindert werden. 21 Tage nach Implantation der Tumore und Immuzelldepletion mittels CPA wurden die Tiere mit GLV-1h68 infiziert, und die Virusausbreitung CPA-behandelter und CPA-unbehandelter Tumore miteinander verglichen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass durch CPA-Behandlung erfolgreich die Anzahl CD45-positiver Zellen in 888-MEL-Tumoren reduziert wurde und dies zur Folge hatte, dass sich das Virus signifikant schwächer im Tumorgewebe ausbreitet. Durch CPA-Behandlung solider 888-MEL-Tumore erfolgte also eine Imitation einer 1936-MEL-Tumormikrumgebung.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das Tumorstroma die entscheidende Rolle bei Suszeptibilität einer GLV-1h68-Infektion und nachfolgender Virusreplikation spielt. Durch die

Gegenwart CD45-positiver Zellen wird die Infektion und Replikation von GLV-1h68 verstärkt, wohingegen diese bei einem Fehlen CD45-positiver Zellen verlangsamt wird.

Durch welchen Mechanismus genau Leukozyten die Virusinfektion begünstigen, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Klärung dieser Frage bedarf weiterer Studien. Möglicherweise sind CD45-positive Zellen selbst das primäre Ziel des Vaccinia-Virus, von wo ausgehend nach Infektion und Lyse umgebende Tumorzellen infiziert werden. Alternativ könnte auch ein indirekter Effekt der Leukozyten vermutet werden. So könnte beispielsweise die GLV-1h68-Infektion inaktive Leukozyten aktivieren [82] und den Tumor, als einen Ort chronischen Infektion, in eine akute Infektion umwandeln [83].

In einem zweiten Teilaspekt dieser Arbeit sollte auch die späte Phase einer GLV-1h68-Infektion histologisch charakterisiert werden und der Mechanismus, der schließlich zur Tumorregression führt, erschlossen werden.

Als potentiell mögliche Wirkungsmechanismen onkolytischer Viren wurden folgende drei Prinzipien beschrieben: Tumorzell-spezifische Onkolyse, Zerstörung der Tumervaskulatur oder eine anti-tumorale Immunantwort.

Als Tumormodell wurden für die Experimente, die zwischen diesen drei Möglichkeiten unterscheiden sollten, die humanen Brustkarzinomzelllinie GI-101A verwandt. GI-101A-Tumore zeigen ein regredierendes Verhalten nach Infektion mit GLV-1h68 [72].

Durch eine gemäßigte Tumorzellproliferation und eine langsame virale Replikation, welche in einem therapeutischen Index von 27,9 resultiert, eignet sich dieses Tumorzellmodellsystem für Studien der späten Phase einer GLV-1h68-Infektion (42 dpi).

Erste histologische Studien an Gewebeschnitten ließen bereits 21 dpi ausgedehnte Gewebenekrosen erkennen, was zu diesem Zeitpunkt bereits andeutete, dass viral bedingte Onkolyse eine sehr entscheidende Komponente der Tumorregression sein könnte.

Genauere Analysen Phalloidin-gefärbter Gewebeschnitte, ließ in Virus-infizierten Bereichen des Tumorgewebes gefäßartige Strukturen erkennen. Ob es sich dabei um Blutgefäße handelte, wurde mit spezifischen Antikörperfärbungen in weiteren immunhistochemischen Gewebeschnitten analysiert.

In ihrer Gesamtheit sind Blutgefäße höchst komplexe Strukturen und weisen neben einer Schicht aus Endothelzellen, eine unterstützende Basallamina sowie eine Schicht stabilisierender Pericyten auf. Col IV wurde als Marker der Basallamina verwendet, CD31 als Marker für Endothelzellen und SMA (smooth muscle actin) zur Markierung von Perizyten.

Durch diese Färbung wurde die Hypothese bestätigt, dass es sich bei den gefäßartigen Strukturen tatsächlich um Blutgefäße handelte.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Blutgefäße bis zu späten Infektionsstadien morphologisch intakt blieben und als einzige Komponente Perizyten empfänglich für eine Virusinfektion sind.

Bei einer genaueren Untersuchung der Morphologie der Gefäße wurde festgestellt, dass die Struktur der Blutgefäße sich erheblich von ihrer nativen Struktur in nicht-malignem Gewebe unterschied. So konnte beispielsweise Vasodilatation an zahlreichen Stellen in GLV-1h68-infizierten Bereichen festgestellt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür wäre die Infektion der Perizyten.

Perizyten haben die Aufgabe Blutgefäße zu stärken. Durch Infektion und Lyse dieser Zellen, fällt die stabilisierende Funktion der Perizyten weg, und es kann zu Aussackungen der Gefäße kommen.

Nachdem die Existenz der Blutgefäße bis zu späten Stadien der Infektion nachgewiesen werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt ihre funktionelle Aktivität überprüft werden. Dazu erfolgte 42 dpi eine systemische Perfusion der Vaskulatur mit *Lycopersicon esculentum*-Lektin. Durch immunhistochemische Koloalisationsstudien von Lektin und CD31 konnte eindeutig die Funktionalität und der Anschluss der Tumovaskulatur an das periphere Blutgefäßsystem nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine GLV-1h68-Infektion nicht zu einer Zerstörung der Tumovaskulatur führt.

In einer letzten Studie sollte durch immunhistochemisches Anfärben von Immunzellen, die Beteiligung des Immunsystems an einer Tumorregression untersucht werden.

Durch eine Virus-induzierte erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 lag die Vermutung nahe, dass es zu einer Rekrutierung von Immunzellen in das Tumorgewebe kommt.

Um zu klären, wie umfangreich diese Immunzellrekrutierung nach Virusinfektion ausfällt, wurde die immunhistologische Analyse mit Hilfe der beiden Immunzellmarker MHC II und CD45 durchgeführt. MHC II wurde dabei als Marker für Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen verwendet, wohingegen CD45 als Marker aller Leukozytenpopulationen diente.

Durch diese beiden Antikörperfärbungen konnte somit keine genauere Klassifizierung der Leukozytensubpopulationen erfolgen, sondern nur ein generelles Vorhandensein oder Ausbleiben einer Immunantwort visualisiert werden. Tatsächlich konnte eine umfangreiche Rekrutierung von MHC II- und CD45-positiver Zellen gezeigt werden.

Um die Funktion dieser Immunzellen zu untersuchen, wurde auch hier eine Immunsuppression mittels Cyclophosphamid durchgeführt und die anschließende Ausbreitung des Virus untersucht.

Überraschenderweise konnte dabei gezeigt werden, dass im Fall einer Immundepletion sich das Virus wesentlich besser im Tumor ausbreitet und auch zu einer stärkeren Regression des Tumors führt. Somit scheinen die Immunzellen zu späten Stadien der Infektion keinen anti-tumoralen Effekt auszuüben. Der wesentliche Mechanismus, der schließlich zur Tumorregression führt, scheint somit die Onkolyse zu sein.

Vergleicht man die Rolle der Immunzellen im Verlauf einer GLV-1h68-Infektion, so kommt ihnen eine sehr unterschiedliche Funktion zu frühen Zeitpunkten einer Infektion zu, verglichen mit späten Infektionsstadien.

Ist das Tumormikromilieu vor einer Virusinfektion geprägt von einem umfangreichen Leukozyteninfiltrat, so wird eine Virusinfektion begünstigt und das Virus kann sich gut replizieren, wie am Beispiel von soliden 888-MEL-Tumoren gezeigt wurde. Kommt es nicht zu dieser massiven Infiltration CD45-positiver Zellen, kann sich das Virus auch nur schlecht im Tumorgewebe ausbreiten. Zu späten Zeitpunkten der Infektion scheinen Immunzellen aber eine Ausbreitung des Virus zu inhibieren.

Erklären lässt sich diese divergente Funktion von Immunzellen durch unterschiedliche Aktivierungsstadien von Immunzellen. So wurde durch Mantovani *et al.* in mehreren Studien das Phänomen der Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) beschrieben, welche eingelagert ins Tumorgewebe nicht ihrer klassischen Funktion als Makrophage nachkommen, sondern vielmehr Tumorwachstum und Metastasierung vorantreiben [84-86].

Auch TAMs exprimieren CD45 und es daher durchaus möglich, dass es sich bei dem umfangreichen Infiltrat an CD45-positiven Zellen um TAMs handelt. Weiterhin ist es möglich, dass solch ein alternativ-aktivierter Makrophage anders auf eine Virusinfektion reagiert, als beispielsweise ein klassisch-aktivierter Makrophage, und somit GLV-1h68-Infektion und -Replikation begünstigt.

Zu späten Zeitpunkten der Infektion, wie im Modell der GI-101A-Tumore gezeigt, handelt es sich vermutlich um die klassisch aktivierten M1-Makrophagen, welche bedingt durch die Infektion mit GLV-1h68 aus dem peripheren Blut aktiv in das Tumorgewebe rekrutiert werden. Durch das Bestreben der neu infiltrierten, klassisch-aktivierten Makrophagen eine Infektion einzudämmen, versuchen sie vermutlich ein Fortschreiten der Virusbreitung zu verhindern und dämmen somit auch die Onkolyse ein.

Was in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte war, dass eine ausgedehnte Infektion des Gewebes zu einer effektiven Tumorregression führt.

Gezeigt wurde dies zum einen durch die Beobachtung, dass solide 888-MEL-Tumore bereits 7 dpi mit 67,93% +/- 19,99 GFP-positiver Zellen eine großflächige Ausbreitung des Virus zeigten und mit einem therapeutischen Index von 88,0 auch ein stark regredierendes Verhalten nach Virusinfektion zeigen.

Ein weiterer Beweis dafür, dass ausgedehnte Virusinfektion des Gewebes zu Tumorrogression führt, wurde durch die Vergleichsstudie immundepletierter mit nicht-immundepletierten GLV-1h68-infizierten GI-101A-Tumoren erzielt. Im Falle der Immundepletion konnte das Virus sich stärker ausbreiten, und durch diesen hohen viralen Titer, konnte ein besseres Regressionsverhalten verglichen mit den CPA-unbehandelten Tumoren beobachtet werden, in denen die Anzahl der GFP-positiven Zellen deutlich geringer war.

Der hohen therapeutischen Index von 888-MEL-Tumoren könnte also folgendermaßen erklärt werden: Bedingt durch eine Tumormikroumgebung, die geprägt ist durch eine hohe Anzahl alternativ-aktivierter Makrophagen (M2-Makrophagen) kann das Vaccinia-Virus sich in sehr kurzer Zeit, sehr effizient im kompletten Tumorgewebe ausbreiten. Eine durch die Infektion induzierte klassische Immunantwort setzt jedoch zeitlich verzögert ein, kann aber bei Eintreffen der aktiv rekrutierten Immunzellen das Ausmaß der Onkolyse nicht mehr eindämmen.

Bezogen auf die Anwendung des Vaccinia-Virus GLV-1h68 in klinischen Studien, bedeutet dies, dass somit eine zielgerichtete Applikation des Virus möglich ist und bevorzugt Krebserkrankungen, welche einen hohen Anteil an M2-Makrophagen in der Tumormikroumgebung aufweisen, für eine Therapie eingeschlossen werden können.

8 Literaturverzeichnis

1. Coffey, M.C., et al., *Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1332-4.
2. Mastrangelo, M.J., et al., *Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1031-4.
3. Gromeier, M., et al., *Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6803-8.
4. Miyatake, S., et al., *Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5124-32.
5. Wickham, T.J., et al., *Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8221-9.
6. Kirn, D., R.L. Martuza, and J. Zwiebel, *Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 781-7.
7. Heise, C.C., et al., *Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects*. Cancer Gene Ther, 1999. **6**(6): p. 499-504.
8. Rowe, W.P., et al., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **84**(3): p. 570-3.
9. Harrison, S.C., B. Alberts, E. Ehrenfeld, L. Enquist, H. Fineberg, S. L. McKnight, B. Moss, M. O'Donnell, H. Ploegh, S. L. Schmid, K. P. Walter, and J. Theriot, *Discovery of antivirals against smallpox*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**: p. 11178-92.
10. Shen, Y., and J. Nemunaitis, *Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog*. Mol Ther, 2005. **11**: p. 180-95.
11. Krauss, H., Weber, A., Appel, M. Enders, B. Isenberg, H., Schiefer, H., Slenczka, von Graevenitz, A. and H. Zahner, *Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from animals to Humans*. ASM Press, Washington DC, 2003(3rd Ed).
12. Moss, B., *Vaccinia virus transcription. Transcription mechanisms and regulation*. New York:Raven press, 1994: p. 185-205.
13. Appleyard, G., A. J. Hapel, and E. A. Boulter, *An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus*. J Gen Virol 1971. **13**: p. 9-17.
14. Payne, L., *Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus*. J Virol 1979. **31**: p. 147-55.
15. Payne, L.a.N., E., *Presence of haemagglutinin in the envelope of extracellular Vaccinia virus particles*. J Gen Virol 1976. **32**: p. 63-72.

16. Hiller, G.a.K.W., *Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment*. J Virol, 1985. **55**: p. 651-9.
17. Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern, *Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes*. Eur J Cell Biol, 1993. **60**: p. 163-78.
18. Moss, B., and B. M. Ward, *High-speed mass transit for poxviruses on microtubules*. Nat Cell Biol, 2001. **3**: p. E245-6.
19. Smith, G.L., A. Vanderplasschen, and M. Law, *The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus*. J Gen Virol, 2002. **83**: p. 2915-31.
20. Blasco, R., and B. Moss, *Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread*. J Virol, 1992. **66**: p. 4170-9.
21. Broyles, S.S., *Vaccinia virus transcription*. J Gen Virol, 2003. **84**: p. 2293-303.
22. Senkevich, T.G., and Moss, B., *Vaccinia virus H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion*. J Virol, 2005. **79**: p. 4744-4754.
23. Townsley, A.C.e.a., *Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion*. J Virol, 2005. **79**: p. 9458-9469.
24. Earp, L.J., S. E. Delos, H. E. Park, and J. M. White, *The many mechanisms of viral membrane fusion proteins*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **285**: p. 25-66.
25. Siczekarski, S.B., and G. R. Whittaker, *Viral entry*. Curr Top Microbiol Immunol 2005. **285**: p. 1-23.
26. Carter, G.C., M. Law, M. Hollinshead, and G. L. Smith, *Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans*. J Gen Virol, 2005. **86**: p. 1279-90.
27. Sanderson, C.M., and G. L. Smith, *Vaccinia virus induces Ca²⁺-independent cell-matrix adhesion during the motile phase of infection*. J Virol 1998. **72**: p. 9924-33.
28. Sanderson, C.M., M. Way, and G. L. Smith, *Virus-induced cell motility*. J Virol 1998. **72**: p. 1235-43.
29. Bablanian, R., G. Coppola, S. Scribani, and M. Esteban, *Inhibition of protein synthesis by vaccinia virus. IV. The role of low-molecular-weight viral RNA in the inhibition of protein synthesis*. Virology, 1981. **112**: p. 13-24.
30. Bablanian, R., B. Baxt, J. A. Sonnabend, and M. Esteban, *Studies on the mechanisms of vaccinia virus cytopathic effects. II. Early cell rounding is associated with virus polypeptide synthesis*. J Gen Virol, 1978. **39**: p. 403-13.
31. Hiller, G., K. Weber, L. Schneider, C. Parajsz, and C. Jungwirth, *Interaction of assembled progeny pox viruses with the cellular cytoskeleton*. Virology, 1979. **98**: p. 142-53.

32. Carter, G.C., G. Rodger, B. J. Murphy, M. Law, O. Krauss, M. Hollinshead, and G. L. Smith, *Vaccinia virus cores are transported on microtubules*. J Gen Virol 2003. **84**: p. 2443-58.
33. Mallardo, M., E. Leithe, S. Schleich, N. Roos, L. Doglio, and J. Krijnse Locker, *Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites*. J Virol 2002. **76**: p. 5167-83.
34. Domi, A., and G. Beaud, *The punctate sites of accumulation of vaccinia virus early proteins are precursors of sites of viral DNA synthesis*. J Gen Virol 2000. **81**: p. 1231-5.
35. Tolonen, N., L. Doglio, S. Schleich, and J. Krijnse Locker, *Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei*. Mol Biol Cell 2001. **12**: p. 2031-46.
36. Doglio, L., A. De Marco, S. Schleich, N. Roos, and J. Krijnse Locker, *The Vaccinia virus E8R gene product: a viral membrane protein that is made early in infection and packaged into the virions' core*. J Virol, 2002. **76**: p. 9773-86.
37. Jones, E.V., and B. Moss, *Mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene by marker rescue and cell-free translation of selected RNA*. J Virol, 1984. **49**: p. 72-7.
38. Smith, G.L., Y. S. Chan, and S. M. Kerr, *Transcriptional mapping and nucleotide sequence of a vaccinia virus gene encoding a polypeptide with extensive homology to DNA ligases*. Nucleic Acids Res 1989. **17**: p. 9051-62.
39. Hruby, D.E., and L. A. Ball, *Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene*. J Virol 1982. **43**: p. 403-9.
40. Kates, J.R., and B. R. McAuslan, *Messenger Rna Synthesis by a "Coated" Viral Genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **57**: p. 314-320.
41. Sarov, I., and W. K. Joklik, *Isolation and characterization of intermediates in vaccinia virus morphogenesis*. Virology, 1973. **52**: p. 223-33.
42. Jones, E., Puckett, C. and Moss, B., *DNA-dependent RNA polymerase subunits encoded within the vaccinia virus genome*. J Virol, 1987. **61**: p. 1765-71.
43. Kotwal, G.J., and B. Moss, *Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily*. J Virol, 1989. **63**: p. 600-6.
44. Moore, J.B., and G. L. Smith, *Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor*. Embo J, 1992. **11**: p. 3490.
45. Ng, A., Tscharke, DC., Reading, PC. and Smith, GL., *The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence*. J Gen Virol 2001. **82**: p. 2095-10.
46. Rosel, J., and B. Moss, *Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b*. J Virol, 1985. **56**: p. 830-8.

47. Oda, K.I., and W. K. Joklik, *Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA*. J Mol Biol, 1967. **27**: p. 395-419.
48. Cyrklaff, M.e.a., *Cryo-electron tomography of vaccinia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 2772-2777.
49. Schramm, B., and Locker, J.K., *Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication*. Traffic, 2005. **6**: p. 839-846.
50. National Center for Health Statistics, *US Mortality Data 2006*. C.f.D.C.a.P., 2009.
51. Willis, R.A., *Pathology of tumors*. edn (London: Butterworth), 1967. **4th ed.**
52. Carrillo-Infante, C., et al., *Viral infections as a cause of cancer*. Int J Oncol, 2007. **30**(6): p. 1521-8.
53. zur Hausen, H., *Viruses in human cancers*. Eur J Cancer, 1999. **35**(14): p. 1878-85
54. Mueller, M.M., and Fusenig, N. E., *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**: p. 839-849.
55. Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J. W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R. A., *Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004. **101**: p. 4966-4971.
56. Carmeliet, P., et al., *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature 2000. **407**: p. 249-257.
57. Coussens, L.M.e.a., *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**: p. 860-867.
58. Murdoch, C.e.a., *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues*. Blood, 2004. **104**: p. 2224-2234.
59. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**: p. 1650-1659.
60. de Visser, e.a., *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**: p. 24-37.
61. van Kempen, e.a., *Inflammation, proteases and cancer*. Eur J Cancer, 2006. **42**: p. 728-734.
62. Cover, T.L., et al., *Serologic detection of infection with cagA+ Helicobacter pylori strains*. J Clin Microbiol 33, 1995: p. 1496-1500.
63. Karube, A., et al., *Human papilloma virus type 16 infection and the early onset of cervical cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**: p. 621-624.
64. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**: p. 71-78.
65. Hagemann, T.e.a., *Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases*. Carcinogenesis, 2004. **25**: p. 1543-1549.
66. GBE, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs*. 2007.

67. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med Microbiol Immunol, 2003. **3**(7): p. 643-51.
68. Alexa Frentzen, Y.A.Y., Nanhai Chen, Qian Zhang, Stephanie Weibel, Viktoria Raab, and Aladar A. Szalay, *Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12915–12920.
69. Morrissey, J.a.R., S. , *A metastatic breast tumor cell line, GI-101A, is estrogen receptor positive and responsive to estrogen but resistant to tamoxifen*. Cell Biol Int, 1998. **22**: p. 413-9.
70. Edwards, D.P., G. C. Chamness, and W. L. McGuire, *Estrogen and progesterone receptor proteins in breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 1979. **560**: p. 457-86.
71. Sabatino, M., et al., *Stem cells in melanoma development*. Cancer Lett, 2009. **279**(2): p. 119-25.
72. Zhang, Q., et al., *Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 10038-46.
73. Hurst, J., N. Maniar, J. Tombarkiewicz, F. Lucas, C. Roberson, Z. Steplewski, W. James, and J. Perras, *A novel model of a metastatic human breast tumour xenograft line*. Br J Cancer, 1993. **68**: p. 274-6.
74. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
75. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
76. Stritzker, J., et al. , *Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in live mice*. Int J Med Microbiol,, 2007. **297**(3): p. 151-62.
77. Sabatino, M.e.a., *Conservation of Genetic Alterations in Recurrent Melanoma Supports the Melanoma Stem Cell Hypothesis*. Cancer Res 2008. **68**(1): p. 122-131.
78. Gentshev, I., et al., *Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent*. Cancer Gene Ther, 2009. **16**(4): p. 320-8.
79. Cresswell, K.-C.C.a.P., *Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus*

80. Frentzen, A., Yu, Y.A., Chen N., Zhang, Q., Weibel, V., Raab, V., and Szalay, A.A., *Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy*. 2009. **106**(31): p. 12915–12920.
81. Worschech, A., et al., *Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 301.
82. Mantovani, A., *Cancer: inflammation by remote control*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 752-3.
83. Wang, E., A. Worschech, and F.M. Marincola, *The immunologic constant of rejection*. Trends Immunol, 2008. **29**(6): p. 256-62.
84. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 231-7.
85. Mantovani, A., et al., *The origin and function of tumor-associated macrophages*. Immunol Today, 1992. **13**(7): p. 265-70.
86. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol 2002. **23**: p. 549-555.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	alpha; anti (bei Antikörper)
β	beta
μ	mikro
A	Ampere
Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CBG99	click-beetle-Luziferase
cDNA	copy-DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

ECL	enhanced chemiluminescence system
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	extracellular enveloped virus
ER	endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und Andere
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
fwd.	forward
g	Gramm
GAGs	Glykosaminoglykane
GFP	green fluorescence protein
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
hi	hitzeinaktiviert
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
hpi	hours post infection
HRP	horse raddish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IEV	intracellular enveloped virus
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IMV	intracellular mature virus
IRES	internal ribosom entry sites
Jhd.	Jahrhundert
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
i.v.	intravenös
lacZ	β-Galaktosedase
Ile	Isoleucin
M	Molar
m	milli

MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mRFP1	monomer red fluorescence protein 1
mRNA	Boten-RNA
MV	mature virus
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NP 40	Nonidet P 40
P	Phosphat
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction
P(e/l)	early/late-Promotor
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p. i.	post infection
PI	Proteininhibitor
Pro	Prolin
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
rev.	revers
RFP	red fluorescence protein
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RUC	Renilla-Luciferase
sec	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat
sP(e/l)	synthetischer early/late Promotor
Strep	Streptomycin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBT	Tris-Borat-Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Thymin-Kinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Val	Valin
VETF	vaccinia virus early transcription factor
VV	Vaccinia-Virus
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

9.2 Curriculum Vitae

Name: Viktoria Maria Raab

Anschrift: Petrinistr. 3a
97080 Würzburg

Geburtsdatum: 08.03.1982

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1988 – 1992 Grundschule Mittelkalbach
1992 – 2001 Freiherr-vom-Stein Gymnasium Fulda
08.06.2001 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

2001 - 2003 Grundstudium der Biologie, Universität Würzburg
2003 - 2007 Hauptstudium der Biologie, Universität Würzburg
01.03. -26.05.2005 Auslandssemester an der Universitat de Barcelona (Socrates-Erasmus Programm)
Arbeitsgruppe für Molekulare Tumorbologie; Prof. Dr. Argilés
Mai 2006 Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie(Hauptfach),Genetik (1.Nebenfach) und Zell- und Entwicklungsbiologie (2.Nebenfach)
Juni 2006 – März 2007 Diplomarbeit: „Visualisierung der Virusreplikation in humanen Brustkrebszelllinien“ an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg unter der Betreuung von Prof. Dr. A.A. Szalay
06.05. 2007 Abschluss als Diplom-Biologin Univ.
Juni 2007–Juni 2010 Promotionsstudium an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg unter der Betreuung von Prof. Dr. A.A. Szalay

Dissertation: „Histologische Charakterisierung Vaccinia Virus-infizierter humaner Tumore im Mausmodell“

Industriepraktika:

März 2003 Biochrome AG seromed ; Berlin

März 2007 – Mai 2007 Genelux Corporation; San Diego, USA

9.3 Publikationen

9.3.1 Arbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem

Sílvia Busquets, Elisabet Ametller, Gemma Fuster, Mireia Olivan, **Viktoría Raab**, Josep M. Argilés and Francisco J. López-Soriano

Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model

Cancer Letters, Volume 245, Issues 1-2, 8 January 2007, Pages 144-148

Raab V, Horbaschek C, Chen N, Zhang Q, Yu YA, Seubert C, Geissinger U, Worschech A, Tietze CJ, Zellner E, Le TH, Grummt F, Stritzker J, Szalay AA.

Four-color labeling of cell culture and tumors of live mice upon infection with: GFP-Ruc and RFP-CBG99 expressing Vaccinia virus strains.

Proceedings of the 14th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence: Chemistry, Biology and Applications: World Scientific; Singapore: 197-200

Andrea Worschech, Nanhai Chen, Yong A Yu, Qian Zhang, Zoltan Pos, Stephanie Weibel, **Viktoría Raab**, Marianna Sabatino, Alessandro Monaco, Hui Liu, R. Mark Buller, David F Stroncek, Ena Wang, Aladar A Szalay, and Francesco M Marincola

Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy

BMC Genomics; 2009

Alexa Frentzen, Yong A. Yu, Nanhai Chen, Qian Zhang, Stephanie Weibel, **Viktoría Raab**, and Aladar A. Szalay

Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy

PNAS; 2009

Ivaylo Gentshev, Ulrike Donat, Elisabeth Hofmann, Stephanie Weibel, Marion Adelfinger, **Viktoría Raab**, Martin Heisig, Nanhai Chen, Yong A. Yu, Jochen Stritzker and Aladar A. Szalay

Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68

Journal of Biomedicine and Biotechnology; 2010

Viktoría Raab, Andrea Worschech, Marion Adelfinger, Stephanie Weibel, Ena Wang, Francesco M Marincola and Aladar A Szalay

A pro-inflammatory signature in melanoma xenografts enhances the replication of Vaccinia Virus during the early stage of tumor colonization

Journal of Translational Medicine; submitted

9.3.2 Veröffentlichte Abstracts

2006

V. Raab, C. Horbaschek, N. Chen, Q. Zhang, Y. A. Yu, C. Seubert, U. Geissinger, A. Worschech *et al.*

Four-color labeling of cell culture and tumors of live mice upon infection with GFP-Ruc and RFP-CBG99 expressing Vaccinia virus strains

14th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. San Diego CA, October 15-19, 2006

2008

Andrea Worschech, Nanhai Chen, Yong A Yu, Qian Zhang, Zoltan Pos, Stephanie Weibel, **Viktoría Raab**, Marianna Sabatino, Alessandro Monaco, Hui Liu, R. Mark Buller, David F Stroncek, Ena Wang, Aladar A Szalay, and Francesco M Marincola

Predicting the Immunologic Constant of Rejection

iSBTc Annual Meeting - San Diego CA, Oct 29th - November 2nd 2008

Andrea Worschech, Nanhai Chen, Yong A Yu, Qian Zhang, Zoltan Pos, Stephanie Weibel, **Viktoría Raab**, Marianna Sabatino, Alessandro Monaco, Hui Liu, R. Mark Buller, David F Stroncek, Ena Wang, Aladar A Szalay, and Francesco M Marincola

Predicting the Immunologic Constant of Rejection

International Meeting Needs and Challenges in Translational Medicine: filling the gap between basic research and clinical applications. Istituto Superiore di Sanità Rome, Italy, October 1-3, 2008

9.3.3 Buchkapitel

Raab V, Horbaschek C, Chen N, Zhang Q, Yu YA, Seubert C, Geissinger U, Worschech A, Tietze CJ, Zellner E, Le TH, Grummt F, Stritzker J, Szalay AA.

Four-color labeling of cell culture and tumors of live mice upon infection with: GFP-Ruc and RFP-CBG99 expressing Vaccinia virus strains. 2007

Proceedings of the 14th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence: Chemistry, Biology and Applications: World Scientific; Singapore: 197-200

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, welche die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Aladar A. Szalay, der es mir ermöglichte diese interessante Aufgabenstellung in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten, und mich darüber hinaus durch Bereitstellung eines Stipendiums während der gesamten Arbeit unterstützte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt für die Korrektur beim Schreiben dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn PD. Dr. Robert Hock für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Utz Fischer, seiner Frau Dr. Farah Badbanchi-Fischer und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie, für ein nettes und entgegenkommendes Arbeitsklima. Frau Anneli Kießling danke ich für die Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Szalay Würzburg bedanken, für eine sehr freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Dr. Jochen Stritzker für seine langwährende Loyalität, Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Marion Adelfinger danke ich für die vielfältige Unterstützung und die unzähligen Male in denen sie meine dritte und manchmal auch vierte Hand war; Dr. Barbara Härtl für die vielen lieben motivierenden Worte; Jennifer Reinboth, die so viele sonnige Momente in meinen Laboralltag gebracht hat; Simon Schäfer, der mir half alle Computerprobleme zu überstehen und auch sonst ein verständnisvoller und stets hilfsbereiter Arbeitskollege war.

Ebenso möchte ich Dr. Tony Yu, Dr. Qian Zhang, Dr. Nanhai Chen, Dr. Alexa Frentzen, Terry Trevino, Jason Aquilar, Camha Hoang, Kim Duffy und allen weiteren Mitarbeitern der Firma Genelux, San Diego danken.

Ich danke Dr. Alexa Frentzen, Dr. Ivaylo Gentshev, Dr. Stephanie Weibel und Dr. Andrea Worschech für die Zusammenarbeit.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit den National Institutes of Health, Bethesda, USA hatte ich die Ehre mit Dr. Francesco M. Marincola zusammenzuarbeiten. In dieser sehr produktiven Zusammenarbeit habe ich sehr viel über wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben gelernt. Für sein wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit und für seine außerordentliche Unterstützung möchte ich hiermit danken.

Ich danke meinen Freunden für all ihre lieben und aufmunternden Worte. Dabei gilt ein besonderer Dank meiner lieben Freundin Dr. Andrea Worschech. Für alle Probleme hatte sie immer ein offenes Ohr, und hat mir in einem Moment geholfen, indem ich kein Weiterkommen wusste. Für diese Loyalität und aufrichtige Freundschaft unendlichen Dank.

Die Entstehung dieser Arbeit wurde zu großen Teilen getragen durch meine liebe Familie. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Veronika und Horst Raab. Ihr seid es nie müde geworden für mich da zu sein, und habt mich auf jede erdenkliche Art unterstützt. Ihr seid die besten Eltern, die man sich wünschen kann.

Der größte Dank gilt meinem Freund Henning von Krosigk, der in den letzten zwei Jahren Freude und Leid mit mir geteilt hat. In den schlimmsten Stunden des letzten Jahres hast Du zu mir gestanden. Du hast immer an mich geglaubt und mir dadurch so unendlich viel Kraft gegeben weiter zu kämpfen. Daher möchte ich Dir diese Arbeit widmen, da sie ohne Deine Unterstützung und Liebe nicht entstanden wäre.

9.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologin Univ.“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Viktorija Maria Raab