

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



**Effekte von Hyper-IL-6 in der Vaccinia-Virus-
vermittelten Krebstherapie**

Dissertation

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

vorgelegt von Julia Sturm
aus Aalen

Würzburg, Dezember 2011

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: _____
Prof. Dr. W. Rössler

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

Zweitgutachter: _____
Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	7
1.1 Krebs – Statistische Hochrechnung	7
1.2 Konventioneller Therapieansatz - Chemotherapie.....	8
1.3 Onkolytische Virustherapie	10
1.3.1 Das Vaccinia-Virus.....	12
1.3.1.1 Pocken - Geschichte der Infektionskrankheit	12
1.3.1.2 Systematik der Poxviridae	12
1.3.1.3 Morphologie des Vaccinia-Virus	12
1.3.1.4 Vaccinia-Virus als onkolytisches Virus in der Krebstherapie	13
1.4 Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6.....	14
1.4.1 Zytokine	14
1.4.2 Interleukin-6	15
1.4.2.1 Rezeptoren und Signalwege für Interleukin-6	16
1.4.2.2 Die JAK/STAT-Signalkaskade	18
1.4.2.3 Pleiotrope Funktionen von Interleukin-6.....	20
1.4.2.4 Das <i>Designer</i> -Zytokin Hyper-IL-6	23
1.5 Kombinationsstrategien mit onkolytischen Viren	24
1.6 Ziel der Arbeit	27
2 Material	28
2.1 Chemikalien und Enzyme	28
2.2 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen	30
2.3 Verwendete Zelllinien und entsprechende Zellkulturmedien.....	33
2.3.1 Zelllinien.....	33
2.3.2 Zellkulturmedien.....	34
2.4 Verwendete Antikörper und rekombinante Proteine	34
2.5 Geräte und sonstige Materialien	35
2.6 Rekombinante Vaccinia-Virus-Konstrukte	37
2.7 Versuchstiere.....	38
2.8 Software	38
3 Methoden	39
3.1 Zellbiologische Methoden	39
3.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Säugetierzellen	39
3.1.1.1 Kultivierung von CV-1 Zellen	39

3.1.1.2	Kultivierung von DU-145-Zellen	40
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	40
3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
3.1.4	MTT-Proliferations-Assay	41
3.2	Virologische Methoden	41
3.2.1	Infektion von Säugerzellen mit Vaccinia-Viren	41
3.2.2	Bestimmung des Virustiters mittels <i>Plaque Assay</i>	42
3.2.3	Analyse der Virusreplikation	43
3.3	Proteinanalytische Methoden	43
3.3.1	Proteinextraktion aus Säugerzellen	43
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	44
3.3.3	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	44
3.3.4	Analyse von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	44
3.3.5	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)	46
3.3.6	Immundetektion mit Hilfe der ECL-Methode	47
3.3.7	Quantifizierung der Hyper-IL-6-Expression mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	48
3.3.8	Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten <i>Designer-Zytokins</i> Hyper-IL-6	49
3.3.8.1	Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten	49
3.3.8.2	Lokalisation von STAT3 und Phospho-STAT3 in Tumorzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung	50
3.4	Tierexperimentelle Methoden	51
3.4.1	Implantation von humanen Tumorzellen	51
3.4.2	Intravenöse Injektionen	51
3.4.2.1	Applikation von rekombinanten Vaccinia-Viren	51
3.4.2.2	Applikation von Chemotherapeutika	51
3.4.3	Narkose	52
3.4.4	Visualisierung der viralen Replikation mittels Fluoreszenz- <i>Imaging</i>	52
3.4.5	Tumor- und Organentnahme	52
3.4.6	Retro-orbitale Blutentnahme	53
3.4.7	Herstellung von Gewebe-Homogenisaten	53
3.5	Immunhistochemische Methoden	54
3.5.1	Herstellung von Agarose-Gewebeschnitten	54
3.5.1.1	Immunfluoreszenzfärbung von Agarose-Gewebeschnitten	54
3.5.1.2	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> Mikroskopie	55
3.5.2	Semi-Dünnschnitte von Knochenmark-Proben	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Charakterisierung des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus-Konstrukts GLV-1h90 in Zellkultur	57

4.1.1	Vergleich der viralen Replikation von GLV-1h68 und GLV-1h90.....	57
4.1.2	Detektion der Markergen-Expression sowie der Expression des <i>Designer</i> -Zytokins Hyper-IL-6 in Western Blots	59
4.1.3	Detektion und Quantifizierung der Hyper-IL-6-Expression mittels <i>Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay</i> (ELISA).....	61
4.2	Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten <i>Designer</i> -Zytokins Hyper-IL-6 in Zellkultur.....	63
4.2.1	Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten mittels Western Blot	63
4.2.2	Lokalisation von STAT3 und Phospho-STAT3 in Tumorzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung	64
4.3	Charakterisierung des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus-Konstrukts GLV-1h90 in einem DU-145 Xenograft Maus Modell	67
4.3.1	Replikation von GLV-1h68 und GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach i.v. Injektion	67
4.3.1.1	Detektion der viralen Replikation in Tumoren mittels Fluoreszenz- <i>Imaging</i>	67
4.3.1.2	Bestimmung der Virustiter in Tumoren von GLV-1h68- und GLV-1h90-injizierten Mäusen mit Hilfe von <i>Plaque Assays</i>	69
4.3.1.3	Bestimmung der Virustiter in Organen von GLV-1h68- oder GLV-1h90-injizierten Mäusen mit Hilfe von <i>Plaque Assays</i>	70
4.3.2	Expression von Hyper-IL-6 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach i.v. Injektion von GLV-1h90	72
4.3.2.1	Immunhistologische Detektion der Hyper-IL-6-Expression in GLV-1h90-infizierten Tumoren.....	72
4.3.2.2	Quantifizierung des <i>Designer</i> -Zytokins Hyper-IL-6 in Tumoren und Blutseren von GLV-1h90-injizierten Mäusen mittels ELISA.....	73
4.3.3	Effekte des GLV-1h90-exprimierten Hyper-IL-6 auf die Tumorregression des humanen Prostatakarzinoms DU-145	75
4.3.4	Systemisch-vermittelte Hyper-IL-6 Effekte.....	77
4.3.4.1	Phänotypische Unterschiede von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90.....	77
4.3.4.2	Hyper-IL-6-vermittelte Aktivierung der Akute-Phase-Antwort in der Leber von GLV-1h90-injizierten Mäusen.....	81
4.3.4.3	Verbesserter Gesundheitszustand von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90.....	82
4.3.4.4	Hyper-IL-6-vermittelte Beeinflussung der Hämostase in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90	88
4.4	Mögliche klinische Anwendung von GLV-1h90 – Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika am Beispiel von Mitomycin C	95
4.4.1	Untersuchung von onkolytischen Vaccinia-Viren in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C	95
4.4.1.1	Einfluss von Mitomycin C auf die virale Replikation in Zellkultur	95
4.4.1.2	Einfluss von Mitomycin C auf Vaccinia-Virus-vermittelte anti-Tumor-Effekte in Zellkultur.....	96

4.4.2	Kombinatorische Effekte von GLV-1h90 und Mitomycin C im Tierversuch	98
4.4.2.1	Kombinatorische Wirkung von onkolytischen Vaccinia-Viren und Mitomycin C auf die Tumorregression beim humanen Prostatakarzinoms DU-145.....	98
4.4.2.2	Einfluss von Mitomycin C auf systemisch-vermittelte Hyper-IL-6 Effekte	100
5	Diskussion	107
6	Referenzen	120
7	Anhang.....	132
7.1	Abkürzungsverzeichnis	132
7.2	Danksagung.....	136
7.3	Eidesstattliche Erklärung.....	138
8	Lebenslauf	139
9	Publikationen	140

Zusammenfassung

Die heute vorherrschenden konventionellen Therapiemethoden zur Behandlung von Krebserkrankungen unterliegen trotz kontinuierlicher Optimierung immer noch deutlichen Defiziten bezüglich Effektivität und Verträglichkeit. Aus diesem Grund beschäftigt sich die Forschung intensiv mit der Entwicklung neuartiger Therapieansätze. Dabei werden Medikamente gesucht, die nicht nur eine deutlich verbesserte Wirksamkeit und Selektivität gegenüber malignem Gewebe aufweisen, sondern auch mit bestehenden Therapien kompatibel sind. Onkolytische Viren besitzen ein erhebliches Potenzial, diese Kriterien zu erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein onkolytisches Vaccinia-Virus unter Ausnutzung seiner Eigenschaft als Vektorsystem mit dem *Designer-Zytokin* Hyper-IL-6 ausgestattet (GLV-1h90). Bei Hyper-IL-6 handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus humanem Interleukin-6 und der Liganden-Bindungsdomäne des löslichen Interleukin-6-Rezeptors, welche kovalent über einen flexiblen *Linker* miteinander verbunden sind. Dieses chimäre *Designer-Zytokin* erlaubt die Untersuchung von IL-6-Effekten, welche über das IL-6-*Trans-Signaling* vermittelt werden. Daraus ergibt sich einerseits eine beträchtliche Erweiterung des Wirkspektrums und darüber hinaus weist Hyper-IL-6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine 100-1000fach verstärkte biologische Aktivität auf. Aufgrund der Tatsache, dass Hyper-IL-6, neben seiner Tumor-inhibierenden Wirkung, eine Vielzahl weiterer Effekte zugeschrieben wird, wurde in dieser Arbeit durch die Kombination des *Designer-Zytokins* mit einem onkolytischen Vaccinia-Virus nicht nur additive Effekte auf die Tumorregression, sondern darüber hinaus auch mögliche systemisch-vermittelte Hyper-IL-6-Effekte untersucht.

Aus ersten Zellkultur-Studien ging hervor, dass sich durch die Integration des Fremd-Gens *hyper-IL-6* in GLV-1h90, bei vergleichender Untersuchung des Parental-Virus GLV-1h68, keine negativen Effekte auf das Replikationsverhalten in DU-145 Zellen zeigten. Des Weiteren konnte unter Einsatz verschiedener Methoden die Expression von Hyper-IL-6 in GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben ist dabei die Beobachtung, dass Hyper-IL-6 in Folge der intrazellulären Produktion aktiv von der infizierten Zelle in das umgebende Medium sezerniert wird. Erst dann ist das *Designer-Zytokin* in der Lage, an seinen Rezeptor gp130 zu binden und auf diesem Weg weitere Signalwege in Gang zu setzen. In einem weiteren Schritt konnte die funktionelle Aktivität des exprimierten Hyper-IL-6 in Zellkultur bestätigt werden. Sowohl in Western Blot-Analysen als auch in Immunfluoreszenz-Studien wurde gezeigt, dass es in Hyper-IL-6-behandelten DU-145-Zellen zu einer Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade und dadurch bedingt zur Phosphorylierung von STAT3 und dessen Translokation in den Zellkern kommt. Aufgrund

dieser nachgewiesenen funktionellen Aktivität erfüllt das durch GLV-1h90-exprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 sämtliche Voraussetzungen, auch *in vivo* Effekte hervorzurufen. Nach intravenöser Injektion von GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse konnte neben der intratumoralen Replikation des Virus und der Expression des Markerproteins Ruc-GFP zusätzlich die Expression des integrierten *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 im Tumor nachgewiesen werden. Von entscheidender Bedeutung war der zusätzliche Nachweis des *Designer*-Zytokins in Serum-Proben von GLV-1h90-injizierten Mäusen. Nach einer aktiven Hyper-IL-6-Sekretion von infizierten Tumorzellen, bildet der Transport in die Blutbahn die Voraussetzung für systemisch-vermittelte Hyper-IL-6-Effekte.

Bei IL-6 handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin, welchem von vielen Gruppen sowohl Tumor-fördernde als auch Tumor-inhibierende Wirkungen zugeschrieben werden. Tumor-inhibierende Effekte werden dabei insbesondere in Zusammenhang mit dem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) und einer Signaltransduktion über das IL-6-*Trans-Signaling* gebracht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich durch die Überexpression von Hyper-IL-6 im Tumor, zusätzlich zu den onkolytischen Eigenschaften des Vaccinia-Virus, additive anti-Tumor-Effekte ergeben. Eine systemische Injektion von GLV-1h90 bzw. GLV-1h68 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen. Bei der vergleichenden Untersuchung beider Virus-Konstrukte konnte bei GLV-1h90-behandelten Mäusen eine tendenziell verbesserte Tumorregression beobachtet werden, wobei in weiterführenden Studien geklärt werden muss, ob diese Verbesserung auf die intratumorale Überexpression von Hyper-IL-6 zurückzuführen ist.

Basierend auf der Beobachtung, dass Hyper-IL-6, nach GLV-1h90-vermittelter Überexpression im Tumor, in der Blutzirkulation nachgewiesen werden konnte, wurde im weiteren Verlauf die funktionelle Aktivität des *Designer*-Zytokins bezüglich systemisch-vermittelter Wirkungen untersucht. Neben Effekten, welche mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, wie eine Rotfärbung der Haut, eine signifikante Vergrößerung der Leber sowie eine massive Stimulation der Akute-Phase-Antwort in der Leber, konnte in GLV-1h90-injizierten Mäusen ein verbesserter Gesundheitszustand auf der Basis einer signifikanten Gewichtszunahme, verbunden mit einer beschleunigten Wundheilung Virus-induzierter Schwanzläsionen, beobachtet werden. Darüber hinaus konnte für Hyper-IL-6 eine Stimulierung der Megakaryopoese im Knochenmark nachgewiesen werden, welche zu einer signifikanten Erhöhung der Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf von GLV-1h90-injizierten Mäusen führte. Es ist von entscheidender Bedeutung anzumerken, dass alle beobachteten systemischen Hyper-IL-6-Effekte eine zeitliche Limitierung aufwiesen, welche sich höchstwahrscheinlich auf die Virus-bedingte Zerstörung Hyper-IL-6-produzierender Tumorzellen zurückführen lässt. Dies impliziert zudem, dass eventuelle Komplikationen,

welche durch die Überexpression des *Designer*-Zytokins hervorgerufen werden können, ebenfalls selbstlimitierend sind.

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie aus onkolytischen Viren und Chemotherapie über synergistische Effekte zu einer signifikant verbesserten Tumorregression führt. Allerdings kommt es in Folge einer Chemotherapie oft zu einer Vielzahl von gefährlichen Nebenwirkungen, da alle schnell proliferierenden Zellen des Körpers betroffen sind. Thrombozytopenie ist eine der am häufigsten vorkommenden Nebenwirkung und beschreibt eine massive Reduktion der Thrombozyten-Zahl im Blut. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von GLV-1h90 wurde deshalb untersucht, ob in einer Kombinationstherapie mit Mitomycin C, neben einer Verstärkung der therapeutischen Effekte des Virus, basierend auf den beobachteten Hyper-IL-6-Effekten, zusätzlich der Gesundheitszustand der behandelten Mäuse verbessert werden kann. Die Experimente belegen, dass eine Kombination onkolytischer Vaccinia-Virus-Konstrukte mit Mitomycin C zu einer signifikant verbesserten Tumorregression im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien führt. Von bedeutender Relevanz war die Beobachtung, dass in einer Kombinationstherapie von Mitomycin C und GLV-1h90, im Gegensatz zu GLV-1h68, eine signifikante zeitliche Verkürzung der auftretenden Thrombozytopenie erreicht wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine systemische Injektion von GLV-1h90 zu einer funktionellen Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 führte, welches in der Lage ist eine erfolgreiche Kombinationstherapie aus einem onkolytischen Vaccinia-Virus und dem Chemotherapeutikum Mitomycin C durch eine Reduktion der Nebenwirkungen zusätzlich zu optimieren. Im Hinblick auf eine Übertragung in die Klinik stellt die Verwendung zusätzlicher Zytokine für den Einsatz in Kombinationstherapien einen neuen Ansatz dar, um Chemotherapie-induzierte Nebenwirkungen weiter einzudämmen.

Summary

Despite continuous improvements in the treatment of cancer, the currently applied standard therapies still reveal deficits regarding efficiency and tumor selectivity. Therefore, current research is focused on the development of novel strategies for cancer treatment. In addition to improved therapeutic effects and tumor tissue selectivity, those strategies should be compatible for combination with existing cancer therapies. The use of oncolytic viruses appears to be one of the most promising therapy approaches to meet all these requirements. In this thesis, an oncolytic vaccinia virus was armed with the designer cytokine Hyper-IL-6 by recombinant integration (GLV-1h90), exploiting its features as a vector system. Hyper-IL-6 is composed of human interleukin-6 (IL-6) and the cytokine-binding domain of its soluble receptor sIL-6R which are bond covalently by a flexible peptide linker. This designer cytokine provide the opportunity to analyze the effects of IL-6 that are exclusively transduced via the IL-6 trans-signaling pathway. As a consequence the effect range and, more importantly the biological activity of Hyper-IL-6 compared to IL-6 alone is highly enhanced (100-1000 fold) both in vitro and in vivo.

Hyper-IL-6 is a multifunctional cytokine which exhibits not only anti-tumor activity, but also a variety of other effects. For this reason, the combination of the designer cytokine and an oncolytic vaccinia virus was used to study possible improvements regarding tumor regression and more importantly additional systemically mediated Hyper-IL-6 effects.

Initial cell culture experiments revealed that expression of the inserted hyper-IL-6 gene in GLV-1h90 had no impact on viral replication in DU-145 cells, when compared to the parental virus GLV-1h68. Furthermore, the expression of Hyper-IL-6 in GLV-1h90-infected cells could be detected by different methods. Of special interest was the finding, that after intracellular production, Hyper-IL-6 was actively secreted into the supernatant by the infected tumor cell. Hyper-IL-6 must be secreted in order to bind the extracellular domain of its cognate gp130 receptor and thus activate further signaling cascades. In addition to that, the functional activity of GLV-1h90-expressed Hyper-IL-6 could be confirmed. Activation of the JAK/STAT signaling pathway in hyper-IL-6-treated DU-145 cells could be demonstrated by both, Western blot and immunofluorescence analysis, implicating phosphorylation of the STAT3 protein and its translocation into the nucleus. Based on the verified functional activity, GLV-1h90-encoded Hyper-IL-6 meets all requirements to be also effective in vivo.

In addition to intratumoral replication and visualization of the marker gene *ruc-gfp*, intratumoral expression of the inserted designer cytokine Hyper-IL-6 could be detected after systemic administration of GLV-1h90 into DU-145-tumor-bearing mice. Of special interest

was the presence of hyper-IL-6 in blood serum samples of GLV-1h90-injected mice. Following active hyper-IL-6 secretion of infected tumor cells, the transport into the blood circulation is essential for its ability to induce signal transduction pathways outside the tumor. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine which is postulated to exhibit both, tumor promoting as well as tumor inhibiting effects. However, growth or proliferation inhibition of tumors could only be observed after addition of soluble IL-6 receptor and is consequently associated with the IL-6-trans-signaling pathway. Therefore, the thesis deals with the question of whether overexpression of hyper-IL-6 can further enhance the pre-existing oncolytic effects of vaccinia virus. Systemic administration of either GLV-1h90 or GLV-1h68 led to significant tumor regression compared to PBS-treated mice. Comparison of the two viral constructs demonstrated a slightly increased oncolytic activity of GLV-1h90. However, further studies have to clarify to which extent this improvement is resulting from an intratumoral overexpression of hyper-IL-6.

Following the detection of hyper-IL-6 in the blood circulation as a consequence of GLV-1h90-mediated overexpression in the tumor, functionality of the designer cytokine was analyzed regarding systemically mediated effects. Besides effects which can be associated with inflammatory processes, such as red skin, significant enlargement of the liver as well as enormous stimulation of the acute-phase-response, GLV-1h90-injected mice showed improved healthiness. Health status was assessed by significant gain in body weight associated with accelerated epithelial barrier repair of virus-induced tail lesions. Moreover, it could be demonstrated that Hyper-IL-6 stimulates megakaryopoiesis in the bone marrow, which in turn leads to significantly elevated levels of blood platelets in GLV-1h90-injected mice. It is particularly important to note that all observed systemic Hyper-IL-6 effects occurred only temporarily, which could be explained by virus-mediated oncolysis, reducing the amount of viable Hyper-IL-6 producing tumor cells. The results also implicate that potential complications associated with the overexpression of the designer cytokine can be self-limiting due to the destruction of the virus replication site.

Recently, we and others demonstrated that the combination of oncolytic virotherapy and chemotherapy could lead to synergistic interactions that ultimately result in enhanced tumor regression. On the other hand, chemotherapy is often associated with serious side effects, since all fast proliferating cells are affected. Among the most frequently observed adverse effects is thrombocytopenia, which is characterized by a massive reduction of blood platelets. With regard to a possible clinical application of GLV-1h90, combination therapy of the hyper-IL-6-encoding vaccinia-virus strain and the chemotherapeutic agent mitomycin C was investigated. Besides therapeutic effects of the virus, the issue was addressed, whether the

health status of mice can be improved based on the observed hyper-IL-6 effects. Experimental results clearly demonstrated that combination therapy of mitomycin C and oncolytic vaccinia viruses led to a significantly improved DU-145 tumor regression compared to the respective monotherapies. Of particular importance was the finding that as compared to GLV-1h68, a combination of GLV-1h90 and mitomycin C reduced the time interval during which treated mice suffered from thrombocytopenia significantly.

Taken together, this thesis revealed that systemic injection of GLV-1h90 leads to functional expression of the designer cytokine hyper-IL-6, which is able to further optimize the already effective combination therapy of the oncolytic virus GLV-1h90 and the chemotherapeutic agent mitomycin C by reducing of serious adverse effects. Therefore, for future clinical applications, cytokine treatment in combination therapies reflects a promising approach to further reduce chemotherapy-induced side effects and thereby increasing the well-being of cancer patients.

1 Einleitung

1.1 Krebs – Statistische Hochrechnung

Der allgemeine Begriff Krebs beschreibt eine Vielzahl von Erkrankungen, welche in Zusammenhang mit einem unkontrollierten Zellwachstum und einer daraus resultierenden Erhöhung der Migrationsfähigkeit dieser Zellen stehen. Hochrechnungen der *World Health Organisation* (WHO) in Zusammenarbeit mit der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ergaben für das Jahr 2008 eine Anzahl von weltweiten Krebs-Neuerkrankungen im Bereich von 12,7 Mio, wobei hierbei 6,6 Mio Männer und 6,1 Mio Frauen betroffen waren. Darüber hinaus stellt Krebs mit 7,6 Mio Todesfällen weltweit 2008 die häufigste Todesursache dar. Krebs kann in annähernd jedem Teil des Körpers entstehen, wobei Organe mit unterschiedlicher Häufigkeit betroffen sind (Abbildung 1). Bei Frauen ist Brustkrebs mit 1,4 Mio Neuerkrankungen im Jahr 2008 immer noch die häufigste Krebserkrankung und bei Männern ist mit 1,1 Mio am zahlreichsten die Lunge betroffen.

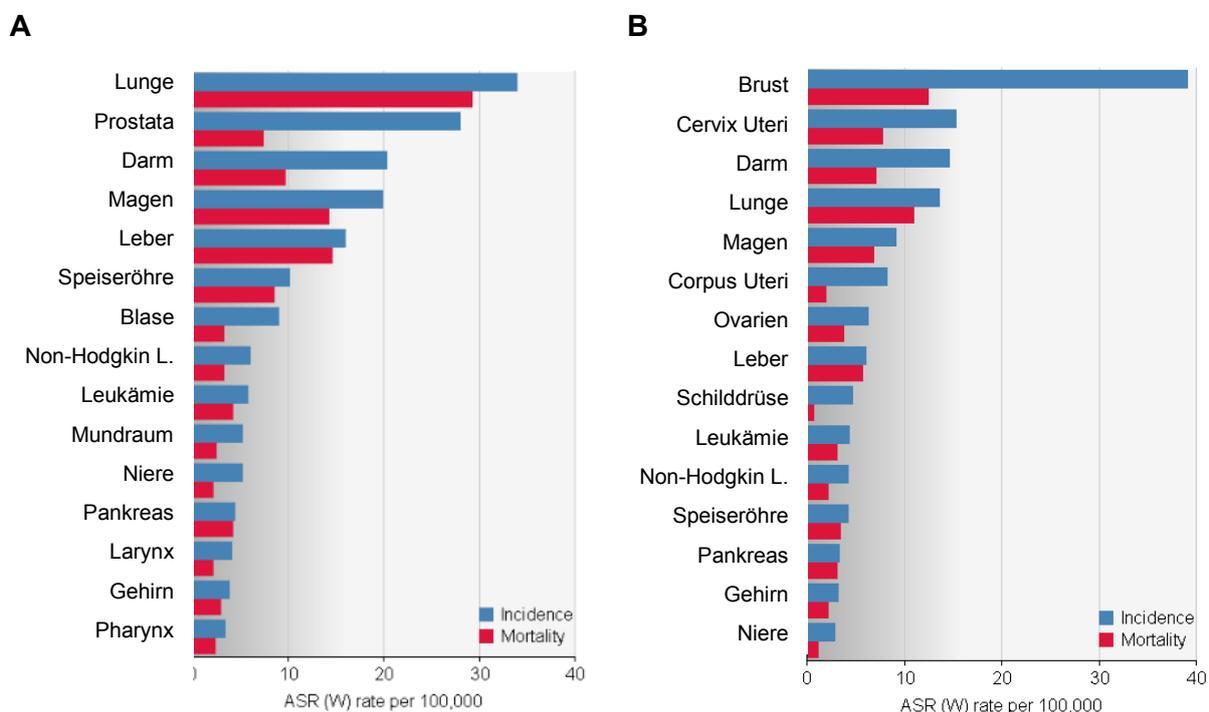


Abbildung 1: Hochrechnung der weltweiten Krebs-Neuerkrankungen und -Sterberaten 2008 durchgeführt von der *World Health Organisation* (WHO) ¹. Dargestellt sind die separaten Hochrechnungen für Männer (A) und Frauen (B).

Die Ursachen für die Krebsentstehung sind vielfältig und lassen sich oft nicht aufklären. Neben genetischen Faktoren spielen auch häufig externe Einflüsse eine große Rolle. Hierzu

gehören physikalische Reize, wie z.B. ionisierende Strahlung, chemische Reize, wie z.B. Aflatoxin- oder Asbest-Verunreinigungen sowie Rauchen oder auch biologische Reize, wie z.B. Infektionen mit Viren, Bakterien oder Parasiten ².

1.2 Konventioneller Therapieansatz - Chemotherapie

Obwohl Operation und Bestrahlung die häufigsten Therapieformen gegen Krebs sind, spielen seit rund 60 Jahren auch Zytostatika eine bedeutende Rolle in der Krebsbehandlung ein. Während bei Operation und Bestrahlung lokal ausschließlich der Tumor oder das Tumor-tragende Organ behandelt wird, eröffnet die Chemotherapie, aufgrund ihrer überwiegend systemischen Applikation, die Möglichkeit, alle Tumorzellen im Körper zu erreichen, selbst wenn sich diese schon vom soliden Tumor abgelöst und sich Metastasen formiert haben. Der Begriff Zytostatika beschreibt Substanzen, die auf unterschiedlichen Wegen die Teilung von Zellen inhibieren und letztlich Zelltod hervorrufen können. Über 100 unterschiedliche Zytostatika werden gegenwärtig für die Chemotherapie eingesetzt, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Medikamenten bzw. Behandlungsformen. Diese Chemotherapeutika unterscheiden sich sowohl in ihrer chemischen Zusammensetzung, der jeweiligen Darreichungsform, ihren Wirkmechanismen und der daraus resultierenden Spezifität für bestimmte Tumorarten und können folglich in unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden. Eine Vielzahl der Zytostatika lassen sich den alkylierenden Agenzien zuordnen. Diese haben die Eigenschaft durch Übertragung von Alkylgruppen die Vernetzung von DNA-Strängen hervorzurufen, wodurch das Ablesen dieser Stränge, als Voraussetzung für Replikations- oder Transkriptions-Vorgänge, inhibiert wird ³. Alkylierende Agenzien können Zellen in allen Phasen des Zellzyklus angreifen und werden zur Therapie vieler unterschiedlicher Tumorarten eingesetzt, wie beispielsweise bei akuter und chronischer Leukämie sowie bei Brust- und Lungenkrebs. Beispiele alkylierender Agenzien sind unter anderem Stickstoff-Lost-Derivate, Alkylsulfonate oder Nitrosoharnstoffe. Darüber hinaus werden Platinkomplexe wie Cisplatin, Carboplatin oder Oxaloplatin aufgrund ähnlicher Wirkmechanismen ebenfalls zu der Gruppe der alkylierenden Agenzien gezählt ⁴. Eine weitere Kategorie der Zytostatika bilden die Antimetabolite. Diese ähneln natürlichen Metaboliten in ihrer chemischen Struktur, können allerdings nicht von den jeweiligen Enzymen umgesetzt werden und hemmen auf diesem Weg bestimmte Stoffwechselwege. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem die Pyrimidinanaloga 5-Fluoruracil und Doxifluridin oder der Folsäureantagonist Methotrexat ⁵. Auch bestimmte Antibiotika bilden eine Gruppe der Zytostatika, wobei hier die Klassifizierung nicht anhand des Wirkmechanismus, sondern ausschließlich aufgrund der Stoffgruppe durchgeführt wird. Es handelt sich hierbei

überwiegend um aus Pilzen gewonnene Peptide, die entweder durch Interaktion mit Replikationsenzymen oder durch direkte Vernetzung der DNA, die Zellteilung inhibieren können. Vertreter dieser zytostatischen Antibiotika sind beispielsweise Doxorubizin, Actinomycin D oder Mitomycin C ⁵.

So vielfältig wie die Wirkmechanismen der Zytostatika, so unterschiedlich sind auch die auftretenden Nebenwirkungen. Aufgrund der Tatsache, dass Zytostatika nicht zwischen gesunden und bösartig veränderten Zellen unterscheiden können, sind neben den sich schnell teilenden Tumorzellen auch gesunde Zellen des Körpers betroffen. Auch hierbei sind im besonderen Maße schnell proliferierende Zellen, wie Knochenmark- und Blutzellen, Zellen der Haarfollikel oder auch Zellen des Fortpflanzungs- sowie Verdauungstraktes betroffen. Daraus ergeben sich Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen, Appetitlosigkeit, Abnahme des Körpergewichts, Ermüdungserscheinungen oder auch Unfruchtbarkeit ⁵. Die risikoreichste Nebenwirkung ist die Myelosuppression. Dabei handelt es sich in Folge einer Knochenmark-Schädigung um eine drastisch verringerte Produktion von weißen (Leukozyopenie) und roten Blutkörperchen (Anämie) sowie von Thrombozyten (Thrombozytopenie), wobei die Stärke der Knochenmark-Schädigung von der Dosis des jeweiligen Zytostatikums abhängt. Chemotherapie-induzierte Thrombozytopenie ist eine der am häufigsten vorkommende Nebenwirkung und stellt ein schwerwiegendes Problem dar ⁶. In Folge einer verringerten Produktion von Thrombozyten kann es zu schweren inneren Blutungen kommen, wodurch der Therapieplan oft nicht eingehalten werden kann. Um dieser verringerten Produktion entgegenzuwirken, beinhalten Therapiemöglichkeiten zum einen eine Thrombozyten-Transfusion, wobei diese extrem kostenintensiv ist und aufgrund der geringen Stabilität der Thrombozyten oft wiederholt werden muss ⁷. Darüber hinaus können Patienten bei wiederholter Thrombozyten-Transfusion diese infolge von Immunreaktionen abstoßen. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist der Einsatz von rekombinantem Interleukin-11, einem Zytokin, welches die Produktion von Thrombozyten anregt. Der gängige Handelsname für dieses Medikament ist Oprelvekin (Neumega[®]), wobei auch bei diesem Medikament aufgrund erheblicher Nebenwirkungen der Therapie-Erfolg nicht immer zufriedenstellend ist und die Kosten sehr hoch sind ⁸. Folglich ist es von großer Bedeutung, neue Therapiemöglichkeiten für Chemotherapie-induzierte Thrombozytopenie zu finden.

In dieser Arbeit wurde mit dem zytostatischen Antibiotikum Mitomycin C gearbeitet, welches als Nebenwirkung eine schwere Thrombozytopenie zur Folge hat.

1.3 Onkolytische Virustherapie

Die Entwicklung neuer Therapien zur Krebsheilung ist eine der wichtigsten Aufgaben der medizinischen Forschung. Dabei werden neuartige Medikamente gesucht, die nicht nur eine deutlich verbesserte Wirksamkeit und Selektivität gegenüber malignem Gewebe aufweisen, sondern auch mit bestehenden Therapien kompatibel sind. Onkolytische Viren besitzen ein großes Potenzial, diese Kriterien zu erfüllen.

Die Geschichte der onkolytischen Viren durchlebte mehrere Phasen der medizinischen Forschung. Aus Publikationen geht hervor, dass bereits Mitte des 19. Jahrhunderts spontane Tumorregression auf natürliche Virusinfektion zurückgeführt wurde. Dabei handelte es sich überwiegend um Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, wie beispielsweise Leukämien oder Lymphome, welche mit einer massiven Immunsuppression einhergehen⁹⁻¹¹. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Viren auf ihre anti-Tumor-Aktivität hin getestet. Aufgrund von geringem Behandlungserfolg und starker Nebenwirkungen wurde die Forschung an onkolytischen Viren zwischenzeitlich eingestellt¹². Erst in jüngster Zeit führten Fortschritte in der Virologie, Molekularbiologie und auch Genmanipulation zur Aufklärung der Wirkmechanismen von onkolytischen Viren sowie zu einem besseren Verständnis, wie onkolytische Viren verändert werden können, um ihre Wirksamkeit zu verbessern und Nebenwirkungen zu verringern.

Die Therapie mit onkolytischen Viren basiert auf dem Prinzip der direkten Zellyse, welche durch den lytischen Replikationszyklus der Viren hervorgerufen wird. Die Tumorselektivität der Viren spielt dabei eine große Rolle, da dadurch ausschließlich Tumorzellen und keine gesunde Zellen zerstört werden. Es gibt replikationskompetente onkolytische Viren, die eine natürliche Tumorselektivität besitzen und gleichzeitig nicht pathogen sind oder nur schwache Symptome in Folge einer Infektion beim Menschen hervorrufen, da der Mensch nicht den eigentlichen Wirtsorganismus darstellt¹³. Hierzu gehören Reo-¹⁴, Newcastle-Disease-¹⁵ und Vesicular-Stomatitis-Viren¹⁶. Darüber hinaus konnten pathogene humane Viren, wie beispielsweise das Masernvirus, welches eine natürliche Tumorselektivität besitzt, nach Attenuierung ebenfalls in der Tumorthherapie eingesetzt werden¹⁷. Die natürliche Tumorselektivität lässt sich dadurch erklären, dass die Viren in der Lage sind, zwischen gesunden und transformierten Tumorzellen zu unterscheiden. Während der Transformation werden eine Reihe zellulärer Signalwege umprogrammiert, die unter anderem das Zellwachstum oder die Überwachung durch das Immunsystem betreffen. Tumorzellen zeichnen sich demnach beispielsweise durch ein aberrantes Glykosylierungsmuster sowie eine Überexpression von bestimmten Proteinen auf der Zelloberfläche aus, die sie vor der Erkennung durch das Immunsystem schützen. Derartige Proteine dienen dem attenuierten Edmonston-Stamm des Masernvirus als Rezeptoren für den Eintritt in die Zelle. Ein weiteres

Beispiel für eine natürliche Tumorselektivität stellen Tumor-spezifische Defekte in der Interferon-Antwort dar, welche vor allem von Newcastle-Disease- und Vesicular-Stomatitis-Viren ausgenutzt werden ¹⁸.

Im Gegensatz zu diesen Wildtyp-Viren gewinnen genetisch modifizierte onkolytische Viren immer mehr an Bedeutung. So lassen sich nicht nur die Tumorselektivität, sondern auch die Effizienz und Sicherheit dieser Viren modifizieren. Strategien, um die Effizienz zu erhöhen, zielen zum einen auf eine Tumor-spezifische Infektion und zum anderen auf eine Tumor-spezifische Replikation der modifizierten Viren ab. Um eine Tumor-spezifische Infektion zu erreichen, können Oberflächenproteine von Viren verändert werden, welche danach ausschließlich Tumor-spezifische Rezeptoren erkennen. Diese Strategie fand bereits bei Adenoviren und auch bei Herpes simplex-Viren Einsatz ¹⁹. Um eine Tumor-spezifische Replikation zu erreichen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sich in drei Gruppen kategorisieren lassen. Dabei handelt es sich zum einen um Deletionen oder Mutationen von viralen Genen, die für eine gerichtete Replikation in normalen Zellen zuständig sind ²⁰⁻²¹, des Weiteren um den Einsatz von Tumor-spezifischen Promotoren ²² oder um die Modifikation von viralen Oberflächenproteinen, als Voraussetzung für die proteolytische Aktivierung der Virus-Partikel durch das Tumormikromilieu ²³⁻²⁴.

Weiterhin können replikationskompetente onkolytische Viren auch als Vektoren für die Überexpression therapeutischer Gene eingesetzt werden. Dies ermöglicht, neben der spezifischen Zerstörung der Tumorzellen, eine zusätzliche therapeutische Wirkung des entsprechenden inserierten Gens ²⁵. Die Möglichkeiten, die sich daraus ergeben, sind unerschöpflich und reichen von Strategien zur Blockierung der Angiogenese ²⁶, über die Stimulierung des Immunsystems ²⁷⁻³⁰, zur Aktivierung von sogenannten *Prodrugs* ³¹⁻³⁴. Darüber hinaus können onkolytische Viren durch die Integration von Reporter genen, wie fluoreszierende Proteine und Luziferasen ³⁵⁻³⁶, oder solche, die eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglichen ³⁷⁻³⁹, zur Tumordiagnose eingesetzt werden.

Trotz bedeutender Fortschritte in der Entwicklung und Optimierung von onkolytischen Viren gibt es jedoch noch eine Reihe von Hürden zu überwinden und weitere intensive Forschung ist notwendig, um das gesamte Potential onkolytischer Viren auszuschöpfen.

1.3.1 Das Vaccinia-Virus

1.3.1.1 Pocken - Geschichte der Infektionskrankheit

Bei den Pocken handelt es sich um eine gefährliche Infektionskrankheit, deren Auslöser das Variola-Virus ist. Aufgrund des hohen Ansteckungspotenzials über Tröpfcheninfektion waren Pocken in der Geschichte der Menschheit häufig Auslöser von Epidemien. Allein im 20. Jahrhundert forderte diese Infektionskrankheit Millionen von Todesopfern⁴⁰.

Die Krankheit beginnt nach einer Inkubationszeit von 12-14 Tagen mit grippeähnlichen Symptomen, wie Fieber und Schüttelfrost. Erst 3-4 Tage später tritt ein charakteristischer Hautausschlag auf⁴¹.

Vor mehr als 200 Jahren machte Edward Jenner die Beobachtung, dass es bei Personen, die sich mit Kuhpocken infiziert hatten, bei einer späteren Infektion mit dem Variola-Virus nicht zum Ausbruch der Pocken kam⁴². Diese immunologische Kreuzreaktion ermöglichte somit erstmals die Vakzinierung von Menschen gegen Pocken. Auf dieser Grundlage wurde von der WHO nach jahrelanger Untersuchung schließlich 1967 eine weltweite Impfpflicht mit dem überwiegend nicht-pathogenen Vaccinia-Virus veranlasst. Der letzte bekannte Fall der Infektionskrankheit trat 1977 in Somalia auf, bevor Pocken von der WHO 1980 als ausgerottet erklärt wurden⁴³. Die exakte Herkunft des Vaccinia-Virus ist bis heute unklar. Man geht davon aus, dass das Virus ursprünglich aus infizierten Kühen isoliert wurde, allerdings wurde der Impfstoff im Laufe der Jahre zusätzlich mit Isolaten aus infizierten Pferden gemischt, um die Wirksamkeit zu erhöhen⁴³.

1.3.1.2 Systematik der Poxviridae

Die Familie der Poxviridae lässt sich in zwei Unterfamilien einteilen, den Chordopoxvirinae und den Entomopoxvirinae. Während die Entomopoxvirinae ausschließlich Insekten infizieren, bevorzugen die Chordopoxvirinae Vertebraten als Wirtsorganismen⁴⁰. Die Chordopoxvirinae können wiederum in acht Gattungen unterteilt werden, wobei die Orthopoxviren (echte Pockenviren) eine spezielle Rolle für den Menschen spielen. Sowohl das humanpathogene Variola-Virus als auch das als Impfstoff eingesetzte Vaccinia-Virus gehören dieser Gattung an⁴⁴.

1.3.1.3 Morphologie des Vaccinia-Virus

Die Pockenviren und damit auch die Vaccinia-Viren zählen zu den großen DNA-Viren. Das Genom besteht aus einem 130-300 kbp langen doppelsträngigen DNA-Molekül, welches an den Enden über einzelsträngige Haarnadelschleifen kovalent verknüpft ist. Von den Vaccinia-Viren existieren zwei Hauptformen von infektiösen Partikeln. Das *intracellular*

mature vaccinia virion (IMV) sowie das *extracellular enveloped virion* (EEV), welches sich durch eine zusätzliche äußere Membran von einem IMV unterscheidet. Die Membran eines IMV besteht aus einer Lipidmembran mit eingelagerten nichtglykosylierten viralen Proteinen. Im Innern des IMV befindet sich der Kern, welcher meist eine hantelförmige Struktur aufweist (Abbildung 2) und ebenfalls von einer Membran umgeben ist. Im Innern des Kerns befindet sich neben dem viralen DNA-Genom die komplette enzymatische Maschinerie, welche für die frühe Genexpression benötigt wird. Dazu gehören unter anderem die DNA-abhängige RNA-Polymerase sowie RNA-Prozessierungs-Enzyme^{40,45}.

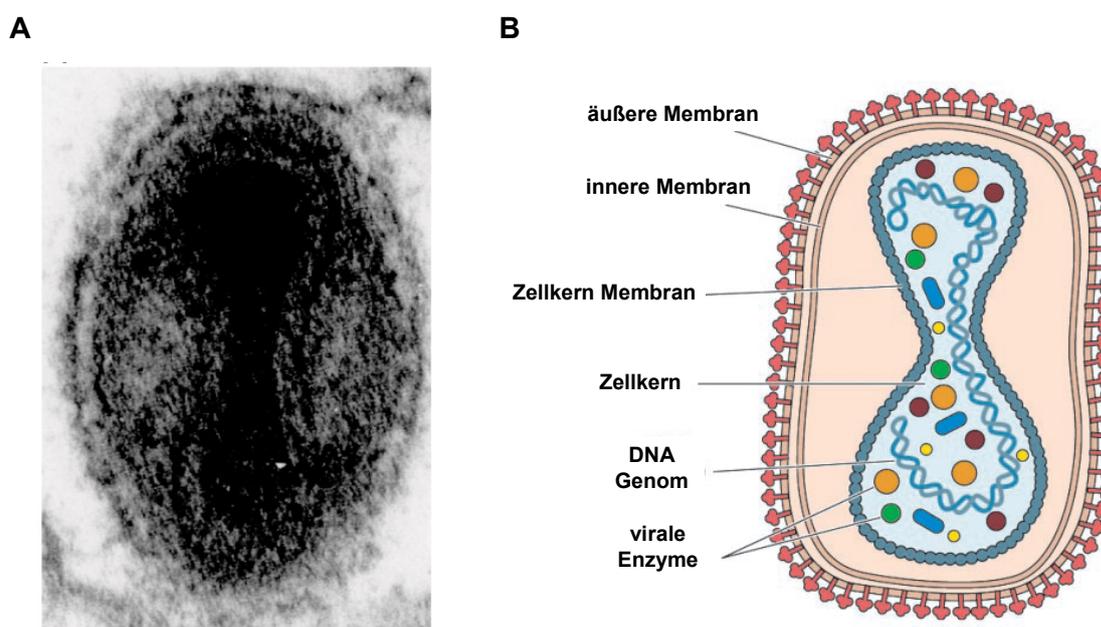


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines infektiösen Vaccinia-Virus IMV-Partikels im Querschnitt (A) sowie eine schematische Darstellung des Virions (B)⁴⁰.

Das Vaccinia-Virus gehört zu den am besten untersuchten Viren überhaupt und war das erste Virus, dessen Struktur sowohl mikroskopisch visualisiert als auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bis ins Detail aufgeklärt werden konnte⁴⁶.

1.3.1.4 Vaccinia-Virus als onkolytisches Virus in der Krebstherapie

Das Vaccinia-Virus zeichnet sich durch eine Vielzahl von Eigenschaften aus, welche es zu einem attraktiven und häufig eingesetzten Kandidaten in der Krebstherapie machen. Während der langjährigen Verwendung als Impfstoff konnte das Vaccinia-Virus in Bezug auf die Verträglichkeit und die Auswirkungen auf den Menschen ausführlich charakterisiert werden⁴⁷. Darüber hinaus ermöglicht das große doppelsträngige DNA-Genom die Integration einer Vielzahl von therapeutischen oder diagnostischen Reportergenen mit einer

Integrationskapazität von annähernd 25 kb⁴⁸. Vaccinia-Viren replizieren ausschließlich in mini-nukleären Strukturen, sogenannten Virus-Fabriken, im Zytoplasma der infizierten Zelle. Dies stellt einen herausragenden Sicherheitsaspekt dar, da somit eine Integration viraler Gene in das Wirtsgenom ausgeschlossen werden kann⁴⁹. Des Weiteren ist das Vaccinia-Virus bekannt durch seine effiziente Replikation, durch welche bereits in den ersten 8 Stunden infektiöse Partikel von der infizierten Zelle sezerniert werden und es nach 48-72 Stunden zu einer kompletten Zerstörung der Zellen kommt⁵⁰. Darüber hinaus zeichnet sich das Vaccinia-Virus zusätzlich durch eine natürliche Spezifität für Tumor-Gewebe sowie ein breites Wirtsspektrum aus. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Virus keine spezifischen Rezeptoren für den Eintritt in die Wirtszelle benötigt, sondern über mehrere Membranfusionen in die Zelle gelangt⁵¹⁻⁵². Eine weitere positive Eigenschaft betrifft den effektiven Transport viraler Partikel durch den Blutkreislauf, wodurch eine systemische Applikation der Vaccinia-Viren ermöglicht wird. Dies kann dadurch erklärt werden, dass vor allem EEV-Partikel (*extracellular enveloped virion*) durch ihre äußere Membran, welche von der Wirtszelle abstammt, vom Immunsystem unerkannt bleiben und demnach unbeeinträchtigt selbst zu entfernten Tumoren gelangen können⁵³⁻⁵⁴. Außerdem wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Wirkstoffen entwickelt, die im Falle unerwarteter Nebenwirkungen einer Vaccinia-Virus-Infektion entgegenwirken können. Dazu gehören beispielsweise Cidovir⁵⁵, ST-246⁵⁶ oder spezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitoren⁵⁷.

1.4 Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6

1.4.1 Zytokine

Zytokine werden sowohl von Gliazellen des Nervensystems als auch von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems gebildet und spielen in vielzelligen Organismen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen einzelnen Zellen. Diese interzellulären Mediatoren kommen überwiegend in lymphatischen Organen sowie in entzündetem Gewebe vor und regulieren in extrem geringen Konzentrationen das Überleben, das Wachstum sowie die Differenzierung von Zellen. Zusätzlich sind Zytokine maßgeblich an der Kontrolle von Akute-Phase-Prozessen, Hämatopoese und der zellulären und humoralen Immunantwort beteiligt. Man unterscheidet fünf Hauptgruppen von Zytokinen, Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine⁵⁸. Im Gegensatz zu Hormonen, eine andere Art humoraler Mediatoren, werden Zytokine nicht in speziellen Drüsen gelagert, sondern nach Stimulation innerhalb kürzester Zeit neu synthetisiert und von den entsprechenden Zellen sezerniert. Zytokine können viele unterschiedliche Zielzellen

ansprechen und sind zusätzlich in der Lage, die Wirkung von anderen Zytokinen in einer additiven, synergistischen oder antagonistischen Weise zu beeinflussen. Alle Zytokine wirken auf ihre Zielzellen über spezifische Rezeptoren, die sich meist aus einer ligandenbindenden α -Untereinheit und einer signaltransduzierenden β -Untereinheit zusammensetzen⁵⁹. Zytokine werden sowohl anhand ihrer biologischen Funktionen in pro- oder anti-inflammatorische Zytokine eingeteilt, aber auch anhand ihrer dreidimensionalen Struktur oder den jeweiligen Rezeptoren klassifiziert⁶⁰.

Der Einfluss von Zytokinen auf das Wachstum von Tumorzellen spielt eine bedeutende Rolle. Diese Effekte können sowohl tumorfördernd als auch tumorinhibierend ausgeprägt sein. Zytokine können entweder direkt als wachstumsfördernde oder -hemmende Faktoren auf Tumorzellen einwirken oder indirekt, indem sie Entzündungs-Modulatoren anlocken oder einen Einfluss auf die Angiogenese ausüben⁶¹.

1.4.2 Interleukin-6

Ursprünglich wurde Interleukin-6 (IL-6) unabhängig von mehreren Forschergruppen gleichzeitig entdeckt, wodurch dieses Zytokin verschiedene Bezeichnungen erhielt. So wurde 1981 ein Faktor in Zellkulturüberständen von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) identifiziert, welcher aufgrund seiner Funktion, der Stimulierung von B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen, die Bezeichnung *B-cell stimulatory factor 2* (BSF-2) erhielt⁶²⁻⁶³. Zur selben Zeit wurden Faktoren, wie Interferon- β 2 (IFN- β 2)⁶⁴, *hybridoma growth factor* (HGF)⁶⁵ oder *hepatocyte-stimulating factor* (HSF)⁶⁶, bekannt, welche alle eine identische Sequenz aufwiesen. Später wurde die einheitliche Nomenklatur Interleukin-6 für all diese Komponenten eingeführt⁶⁷.

IL-6 gehört, neben IL-11, IL-27, IL-31, LIF (*leukaemia inhibitory factor*), OSM (*oncostatin-M*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin-1*), CLC (*cardiotrophin-like cytokine*) und NP (*neuropoietin*), zur Familie der IL-6-artigen Zytokine⁶⁸⁻⁶⁹. Mit Hilfe von Röntgenkristallographie sowie von NMR- (nuclear magnetic resonance) Spektroskopie konnte die Tertiärstruktur von IL-6 aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um eine 4-Helix-Bündel-Struktur, welche aus vier antiparallelen Helices (A, B, C, und D), einem langen A-B-Loop, einem kurzen B-C-Loop sowie einem langen C-D-Loop besteht⁷⁰ (Abbildung 3).

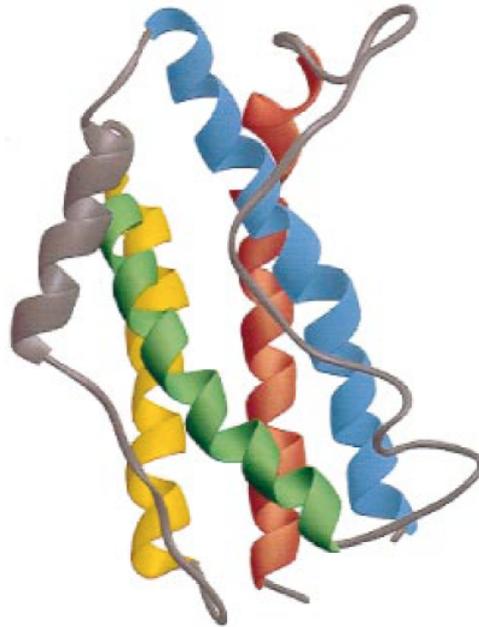


Abbildung 3: Tertiärstruktur von Interleukin-6⁵⁹. Interleukin-6 weist eine 4-Helix-Bündel-Struktur auf, welche aus den vier langen α -Helices A (rot), B (grün), C (gelb) und D (blau) sowie einem Verbindungs-Loop (grau) aufgebaut ist.

1.4.2.1 Rezeptoren und Signalwege für Interleukin-6

Der Rezeptorkomplex für IL-6 besteht aus zwei Komponenten, einer Liganden-Bindungsdomäne (α -Kette) sowie einer Signalweiterleitungsdomäne (β -Kette). Interleukin-6 bindet zunächst an die Liganden-Bindungsdomäne IL-6-R auf der Zelloberfläche, ein 80 kDa großes membranständiges Glykoprotein⁷¹. Der IL-6/IL-6-R-Komplex bindet dann an die Signalweiterleitungs-Domäne gp130 (Glykoprotein 130), wodurch es zur Bildung von gp130-Homodimeren kommt, welche in der Lage sind, intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in Gang zu setzen (Abbildung 4A). Gp130 ist Bestandteil der Rezeptorkomplexe aller IL-6-artigen Zytokine, wodurch sich die funktionelle Redundanz dieser Zytokine erklären lässt⁷¹.

Die Expression von Zytokinrezeptoren variiert zwischen verschiedenen Zelltypen des Körpers. So kommt IL-6-R nur auf bestimmten Zellen vor, wie beispielsweise Hepatozyten oder Subpopulationen von Leukozyten, welche Monozyten/Makrophagen und Neutrophile aber auch B- und T-Zellen miteinschließen. Im Gegensatz dazu konnte die Expression der Signaltransduktions-Domäne gp130 in annähernd allen Organen nachgewiesen werden⁷²⁻⁷³. Zellen, die nur gp130, nicht aber den IL-6-R exprimieren, können nicht auf IL-6 reagieren, da nur der Komplex aus IL-6 und IL-6-R von gp130 erkannt wird.

Interessanterweise kommt die Ligandenbindungs-Domäne IL-6-R auch als löslicher Rezeptor (sIL-6-R) vor⁷⁴. Dieser entsteht entweder durch alternatives mRNA Spleißen oder durch proteolytische Abspaltung der Transmembran-Domäne, wodurch der Rezeptor von der

Zelloberfläche abgelöst wird⁷². Der lösliche sIL-6-R bildet mit IL-6 einen frei zirkulierenden Komplex, der alle gp130-exprimierenden Körperzellen aktivieren kann. Dieser Prozess verstärkt demnach nicht nur das Signal, welches über den membrangebundenen Rezeptor weitergeleitet wird, sondern erweitert zusätzlich das Spektrum an Zellen, die von IL-6 angeregt werden können. So können in der Gegenwart von sIL-6-R beispielsweise hämatopoetische Vorläuferzellen⁷⁵, Nervenzellen⁷⁶, Endothelzellen⁷⁷ oder auch Keratinozyten⁷⁸ auf IL-6 reagieren. In der Literatur wird dieser Prozess als *Trans-Signaling* bezeichnet (Abbildung 4B)⁷⁹.

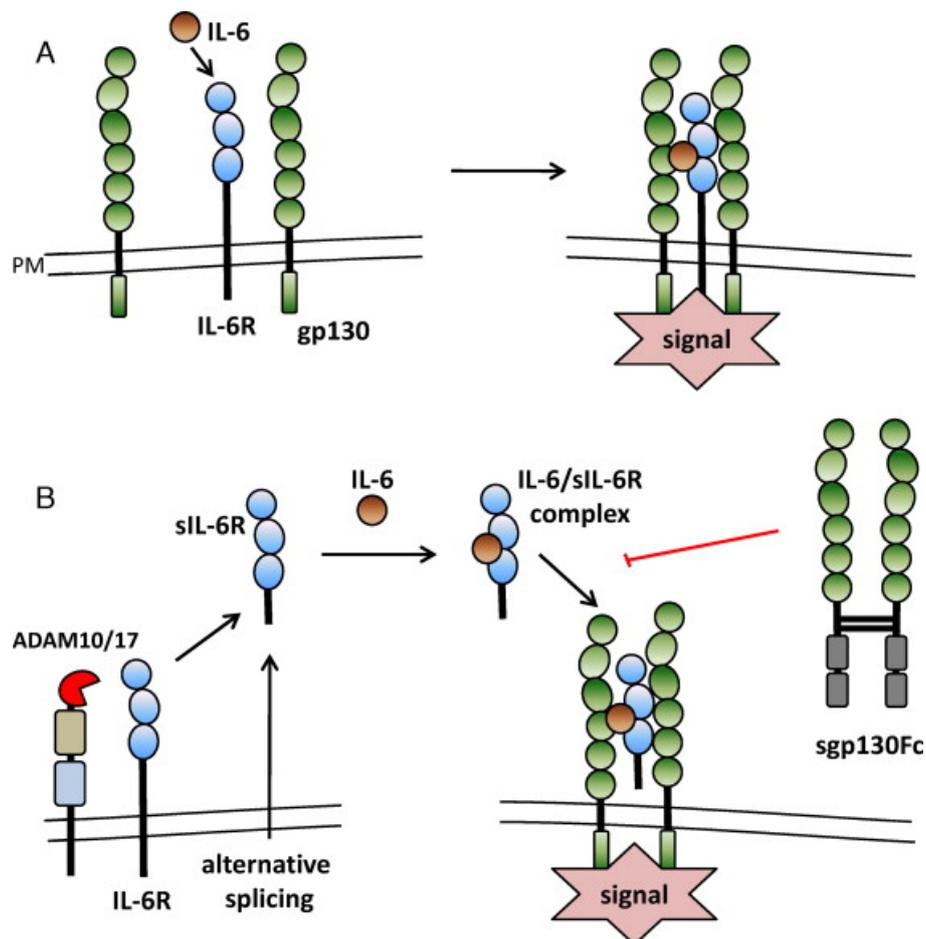


Abbildung 4: Unterschiedliche Signalwege von Interleukin-6. (A) Klassischer Signalweg über den membrangebundenen IL-6-Rezeptor. (B) IL-6-*Trans-Signaling* über den löslichen IL-6-Rezeptor⁸⁰. Interleukin-6 (IL-6), löslicher (sIL-6R) und membrangebundener (IL-6R) IL-6-Rezeptor, ADAM- (A *Disintegrin And Metalloproteinase*) Metalloproteinase 10/17 (ADAM10/17) vermittelt die proteolytische Spaltung von IL-6R, Signalweiterleitungsdomäne Glykoprotein 130 (gp130), lösliche Signalweiterleitungsdomäne gp130 (sgp130Fc) fungiert als Antagonist des IL-6/sIL-6-R-Komplexes.

Neben dem löslichen IL-6-R liegt in humanem Serum auch eine lösliche Form des gp130 (sgp130) vor, welche ebenfalls durch alternatives mRNA Spleißen oder proteolytische Spaltung des membrangebundenen Rezeptors entstehen kann. Dieses Protein fungiert als Antagonist des IL-6/sIL-6-R-Komplexes und hemmt selektiv IL-6-Antworten⁸¹. Die

Signaltransduktion über den membranständigen IL-6-R wird dagegen nicht beeinflusst. Aufgrund dieser Wirkung kann sgp130 als molekulares Werkzeug eingesetzt werden, mit welchem zwischen den Signalen über den membranständigen IL-6-R und Signalen, die auf IL-6-Trans-Signaling beruhen, unterschieden werden kann. Durch genetische Fusion von gp130 mit dem konstanten Teil eines IgG-Antikörpers (Fc) konnte diese Wirkung deutlich gesteigert werden. Dies lässt sich durch eine Fc-vermittelte Dimerisierung des *Trans-Signaling Designer*-Antagonisten sgp130/Fc erklären⁸².

1.4.2.2 Die JAK/STAT-Signalkaskade

Ebenso wie beim Ras/MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) sowie beim PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt-Signalweg handelt es sich bei der JAK/STAT-Signalkaskade um eine weitere wichtige Form der Signalweiterleitung in Folge einer gp130-Aktivierung durch IL-6 (Abbildung 5)⁸³.

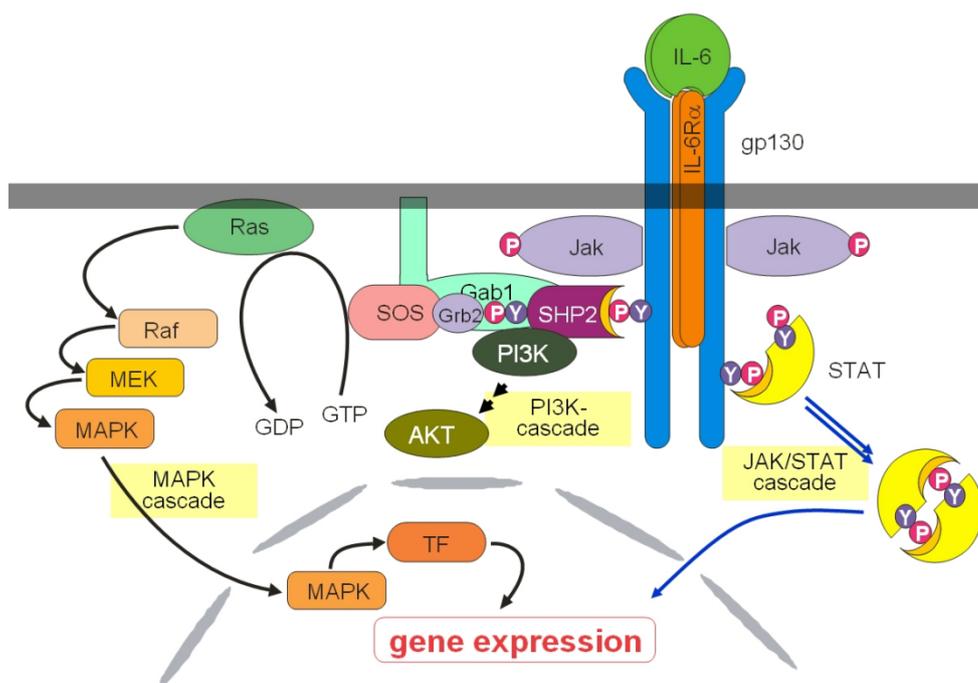


Abbildung 5: Differentielle Signalweiterleitung von Interleukin-6⁸⁴. MAPK- (*Mitogen-activated protein kinase*) Signalkaskade: GTP-bindendes Proto-Onkogen Ras (*Rat sarcoma*), Proteinkinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*), spezielle MAP-Kinase MEK, TF (Transkriptionsfaktor). PI3K- (*phosphatidylinositol 3-kinase*) Signalkaskade: Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), Gab1 (*Grb2-associated binding protein 1*), SOS (*Son of Sevenless*), Protein-Tyrosin Phosphatase SHP2 (*SH2-domain containing*), Serin-Threonin Proteinkinase AKT. JAK/STAT- Signalkaskade: JAK (*Janus kinase*), STAT (*Signal Transducer and Activator of Transkription*).

Im Gegensatz zu den meisten Zytokinrezeptoren der JAK/STAT-Signalkaskade (Abbildung 6) ist der zytoplasmatische Teil von gp130 konstitutiv mit Janus-Tyrosinkinasen

(JAK) assoziiert. Bei der Signalauslösung durch IL-6 sind die Janus-Tyrosinkinasen 1 (JAK1) und 2 (JAK2) sowie die Tyrosinkinase 2 (Tyk2) beteiligt. Durch die Bildung von Homodimeren zweier gp130-Moleküle bei der Aktivierung werden zwei Tyrosinkinasen in räumliche Nähe zueinander gebracht, wodurch eine Trans-Phosphorylierung ermöglicht wird⁸⁵. Die auf diesem Weg aktivierten Kinasen JAK1, JAK2 und Tyk2 sind in der Lage, intrazelluläre Tyrosinreste von gp130 zu phosphorylieren⁸⁶. Einige dieser Phosphotyrosin-Reste von gp130 können dann als Bindungsstellen für STAT-Faktoren (*Signal Transducer and Activator of Transkription*) dienen, in diesem Fall für STAT1 und STAT3. Die Aktivität von STAT-Faktoren wird ebenfalls über post-translationale Modifikationen reguliert, vorwiegend über Phosphorylierung von Tyrosin- oder Serin-Resten. Diese Aktivierung findet im Zytoplasma der Zelle statt, woraufhin sich STAT-Dimere bilden, die in dieser Konstellation den Zellkern passieren können und dort als Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen regulieren⁸⁷. Interessanterweise kommen STAT-Faktoren vor der Aktivierung gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt vor, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Erst nach einer Stimulation durch IL-6 können phosphorylierte STAT1- und STAT3-Moleküle ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden⁵⁹. Der exakte Mechanismus der Translokation von phosphorylierten STAT-Molekülen in den Zellkern ist noch nicht vollständig bekannt, es werden allerdings zwei mögliche Wege diskutiert. Der Transport könnte über eine untypische NLS-Sequenz (*nuclear localisation sequence*) oder über ein spezifisches Transport-Protein, welches phosphorylierte STAT-Moleküle bindet und seinerseits über eine NLS-Sequenz verfügt, stattfinden⁵⁹. Die Regulation der Genexpression im Zellkern erfolgt durch die Bindung der STAT-Dimere an spezifische *enhancer*-Elemente in der DNA, wodurch die Transkription von entsprechenden Zielgenen entweder stimuliert oder gehemmt wird. Diese Regulation erfolgt oft in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, wobei es sich im Fall von STAT3 zum Beispiel um NF- κ B⁸⁸ (*nuclear factor* κ B) oder AP-1⁸⁹ (*activator protein 1*) handelt.

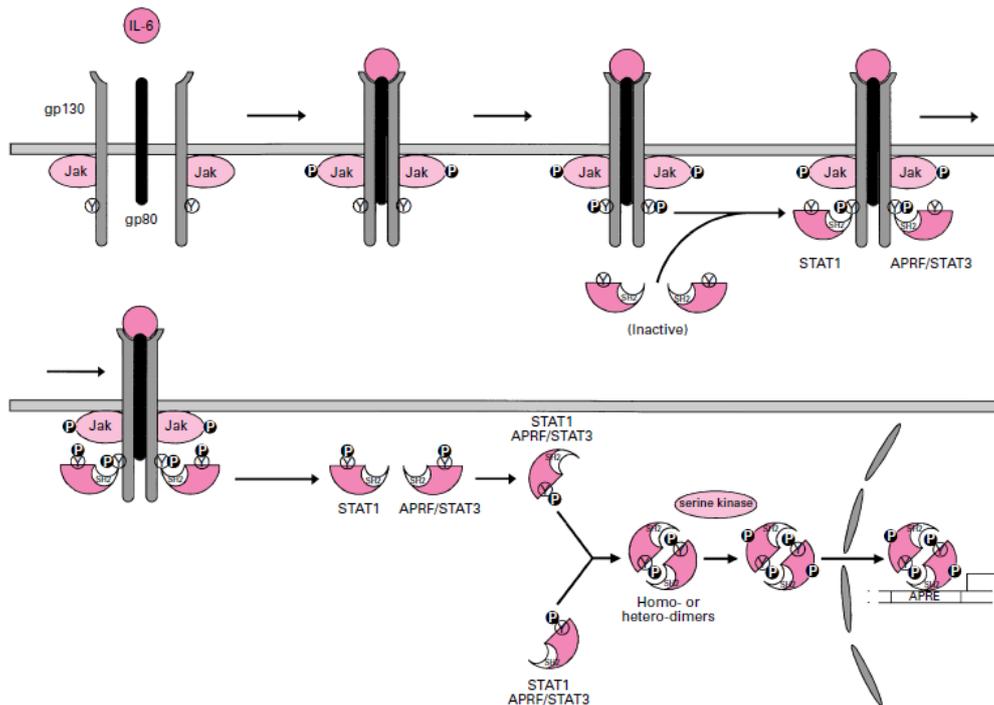


Abbildung 6: IL-6-Signaltransduktion über die JAK/STAT-Kaskade ⁵⁹.

1.4.2.3 Pleiotrope Funktionen von Interleukin-6

Bei IL-6 handelt es sich um ein multifunktionelles Zytokin, welches von einer Vielzahl von Zellen produziert wird. Dazu gehören unter anderem Monozyten bzw. Makrophagen, B-Zellen, Keratinozyten, aber auch einige Tumorzellen. Darüber hinaus ist IL-6 in der Lage, in annähernd allen Organen des Körpers einen Einfluss auf die unterschiedlichsten Zelltypen auszuüben, wodurch sich die Vielzahl von unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieses Zytokins erklären lässt (Abbildung 7) ⁹⁰

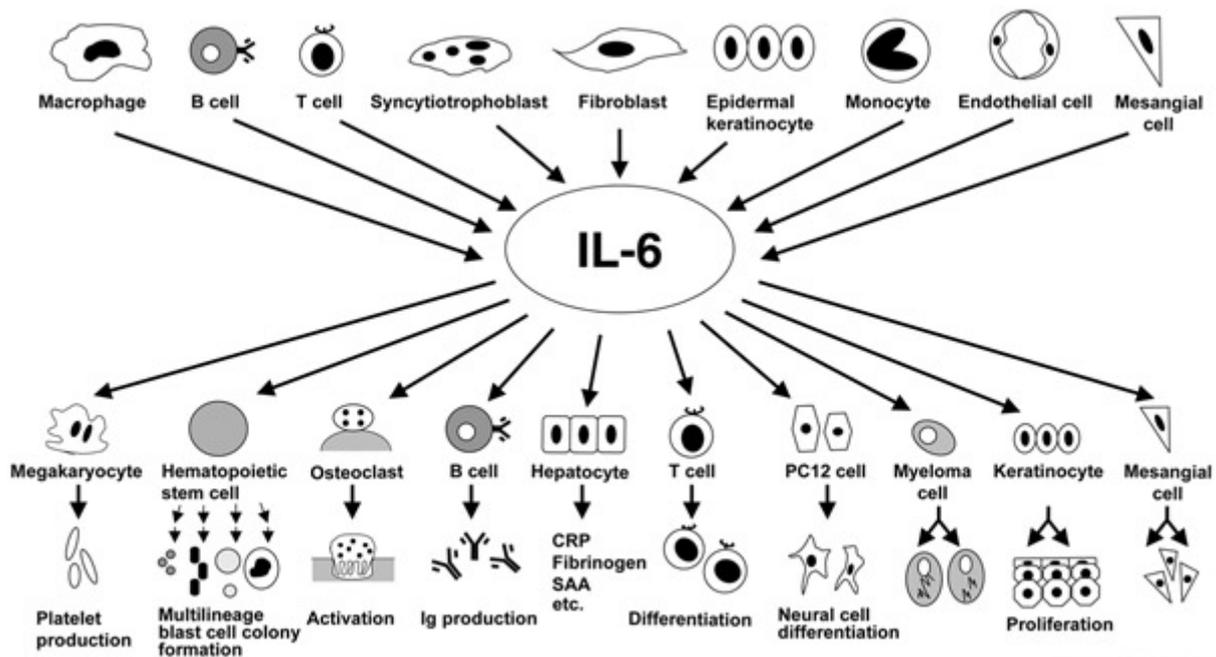


Abbildung 7: Pleiotrope Funktionen von Interleukin-6⁹¹.

Anhand der ursprünglich unterschiedlichen Bezeichnungen für IL-6, wie BSF-2, IFB- β 2 oder HGF, lassen sich bereits einige wichtige biologische Funktionen von IL-6 ableiten. So ist IL-6 beispielsweise an der Proliferation von T-Zellen sowie deren Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen beteiligt. Des Weiteren reguliert IL-6 die B-Zell-Differenzierung, die Antikörper-Sekretion von B-Zellen sowie die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen⁷⁹. Dies lässt bereits erkennen, dass IL-6 ein wichtiger Regulator der Immun- und Entzündungsantwort ist. Neben diesen Wirkungen wird in der Literatur noch eine Vielzahl weiterer biologischer Aktivitäten von IL-6 beschrieben. Dazu gehört die Wachstumsstimulierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im blutbildenden System⁹², die Regulation der Akute-Phase-Antwort in der Leber durch Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen oder Serum-Amyloid A⁹³, die Stimulation der Angiogenese durch Produktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*)⁹⁴ sowie die Regulation der neuronalen Differenzierung⁹⁵.

Eine weitere wichtige Funktion von IL-6 betrifft seinen Einfluss auf die Hämostase, welcher durch eine Reihe unterschiedlicher Effekte vermittelt wird. Dazu zählt beispielsweise die Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten, die Produktion von Gerinnungsfaktoren, wie Fibrinogen oder Faktor VIII und darüber hinaus die Stimulierung der Thrombozyten-Produktion, auch Thrombopoese genannt⁹⁶. Neben Thrombopoetin (TPO), dem wichtigsten Hormon in der Regulation der Thrombopoese, sind noch eine Reihe von Zytokinen bekannt, welche sowohl in Kombination mit TPO als auch allein die Reifung von Megakaryozyten und in Folge die Thrombozyten-Produktion stimulieren können⁹⁷. Bereits 1989 beschrieben Ishibashi und Kollegen, dass IL-6 auch in Abwesenheit anderer Wachstumsfaktoren in der

Lage ist, die Reifung von Megakaryozyten anzuregen. Sie konnten zeigen, dass IL-6 bei intraperitonealer (i.p.) Applikation in immunkompetente Mäuse die Thrombozytenzahl abhängig von der Dosis erhöht. Darüber hinaus konnte eine beträchtliche Steigerung der Megakaryozyten-Größe bei gleichbleibender Anzahl beobachtet werden⁹⁸. Die Megakaryopoese beschreibt die Reifung der Megakaryozyten im Knochenmark bis zur Abschnürung der Thrombozyten in den Blutkreislauf (Abbildung 8). Durch Endomitose, ein Prozess, bei dem es ausschließlich zur Teilung des Zellkerns kommt, entstehen dabei polyploide Megakaryozyten, welche mit steigender Polyploidie-Zahl an Größe zunehmen. Folglich lässt sich die IL-6-vermittelte Thrombozyten-Erhöhung dadurch erklären, dass IL-6 die Reifung der Megakaryozyten im Knochenmark stimuliert, wodurch es zu einer gesteigerten Abschnürung von Thrombozyten in den Blutkreislauf kommt⁹⁹⁻¹⁰⁰.

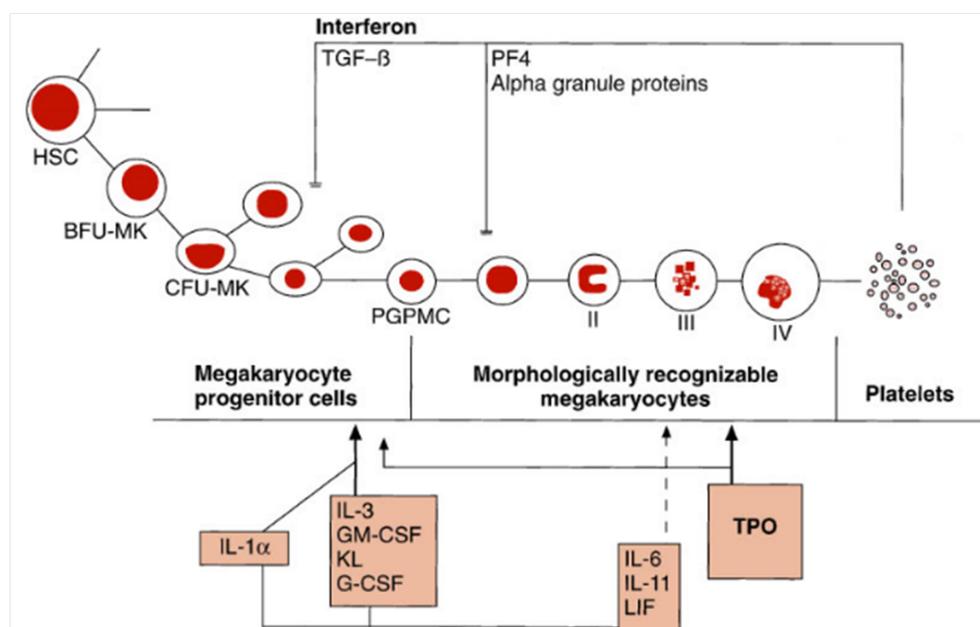


Abbildung 8: Reifungsprozess von Megakaryozyten im Knochenmark¹⁰¹. HSC (Hematopoietic stem cell), BFU-MK (burst forming unit megakaryocyte), CFU-MK (colony-forming unit megakaryocyte), PGPMC (promeg cytoblast), TGF-β (transforming growth factor β), PF4 (platelet factor 4), IL (Interleukin), GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor), G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), Stammzellfaktor KL (kit-ligand), LIF (Leukemia inhibitory factor), TPO (Thrombopoetin).

Darüber hinaus wurden IL-6 wichtige Funktionen zugesprochen, welche mit Prozessen der Wundheilung in Verbindung stehen. Dazu gehören unter anderem die Anlockung von Neutrophilen Granulozyten sowie ihre Anheftung an Fibroblasten der Haut¹⁰², die Rekrutierung von Monozyten oder Makrophagen, welche für den Abtransport von Zelltrümmern verantwortlich sind, die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren oder Faktoren, welche die Angiogenese regulieren¹⁰³ sowie die Stimulation der Keratinozyten-Proliferation, wodurch ein beschleunigter Wundverschluss in Folge einer Verletzung hervorgerufen werden kann¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-6 sowohl an der Entstehung als auch der Progression einer Vielzahl an Tumorarten beteiligt ist¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Im Gegensatz dazu konnten allerdings auch anti-Tumor-Effekte beobachtet werden, beispielsweise bei der Behandlung des B16-Melanoms¹⁰⁸, des humanen Osteosarkoms¹⁰⁹ oder des kleinzelligen-Bronchialkarzinoms¹¹⁰. Interessanterweise konnte in allen drei Fällen ausschließlich durch Zugabe des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6-R) eine Inhibition des Zellwachstums beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine anti-Tumor Wirkung von IL-6 hauptsächlich über das IL-6-*Trans-Signaling* vermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich das pleiotrope Verhalten von IL-6, nicht nur in Bezug auf Tumorzellen sondern auch auf alle weiteren Zelltypen, höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen Signalwege erklären, welche zum einen den klassischen IL-6-Signalweg über den membrangebundenen mIL-6-R sowie das IL-6-*Trans-Signaling* über den löslichen sIL-6-R miteinschließen⁸³.

1.4.2.4 Das *Designer-Zytokin* Hyper-IL-6

Die Beobachtung, dass das Vorhandensein eines löslichen IL-6-Rezeptors das Spektrum an Zellen, die von IL-6 angeregt werden, erweitert, führte zu der Idee, ein Molekül zu konstruieren, welches die Funktion beider Proteine vereint. Rose-John und Kollegen entwickelten daraufhin 1996 ein Fusionsprotein, bestehend aus dem humanen Zytokin Interleukin-6 und seinem spezifischen sIL-6-R, welche über eine flexible Kette aus 13 Aminosäuren kovalent miteinander verbunden sind (Abbildung 9). Dieses unimolekulare *Designer-Zytokin* wird in der Literatur als Hyper-IL-6 bezeichnet¹¹¹.

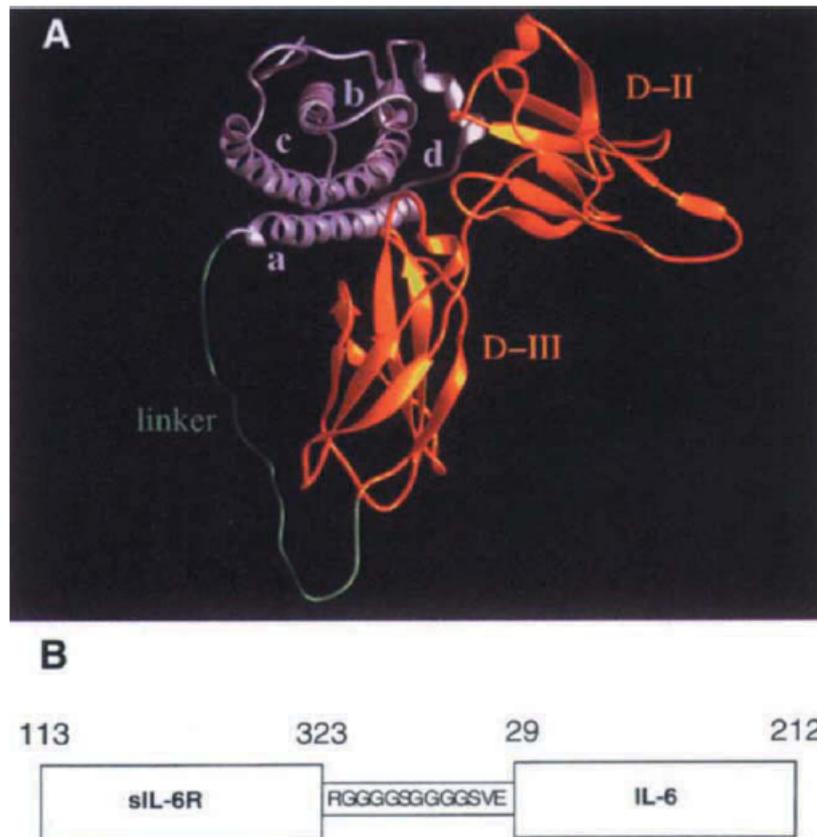


Abbildung 9: Konstruktion des Designer-Zytokins Hyper-IL-6 ¹¹¹. (A) Dreidimensionale Struktur des Fusionsproteins, bestehend aus IL-6 (grau) und sIL-6-R (orange) verbunden durch einen flexiblen Peptid-Linker (grün). (B) Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz des Fusionsproteins.

Es konnte gezeigt werden, dass Hyper-IL-6, genau wie der IL-6/sIL-6-R-Komplex, Zellen über das IL-6-*Trans-Signaling* aktivieren kann ¹¹². Darüber hinaus weist das *Designer-Zytokin* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine 100-1000fach erhöhte biologische Aktivität im Vergleich zu IL-6 auf, welche zusätzlich eine beträchtlich längere Zeit persistiert. Diese verlängerte Wirksamkeit lässt sich möglicherweise auf die höhere Stabilität von Hyper-IL-6, im Vergleich zu IL-6 und sIL-6-R allein, und die demnach längere Halbwertszeit im Blut-Plasma zurückführen ¹¹³. Ebenfalls wurde beschrieben, dass Hyper-IL-6 im Vergleich zu IL-6 in weitaus geringeren Konzentrationen das Wachstum von Tumorzellen hemmt ^{112,114}.

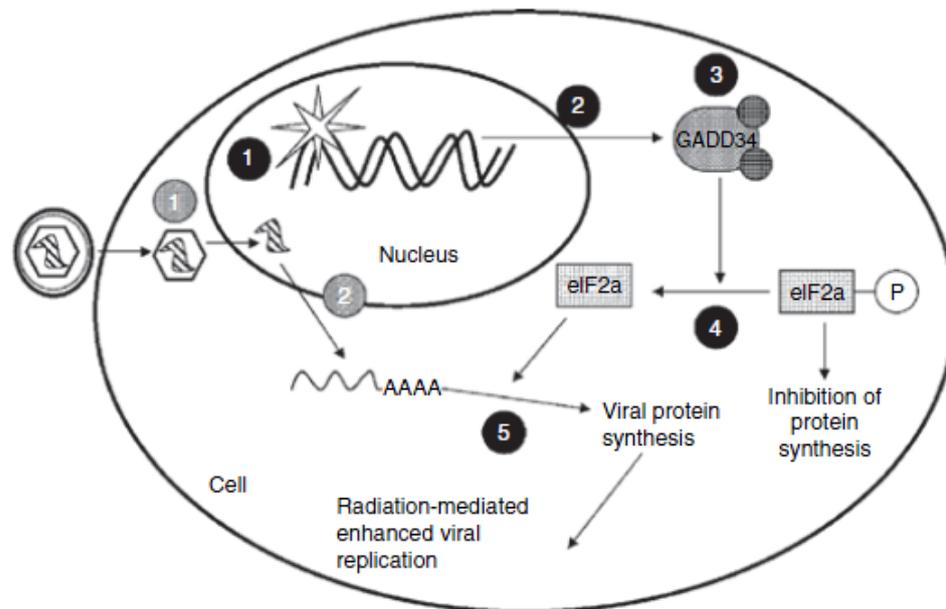
1.5 Kombinationsstrategien mit onkolytischen Viren

Onkolytische Viren zeichnen sich maßgeblich durch ihre spezifische Zerstörung von Tumorzellen aus, während gesunde Zellen kein Ziel darstellen. Sie nutzen dabei spezielle Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen, Tumorzellen zu erkennen und in sie

einzudringen, sich die zelluläre Biosynthese-Maschinerie zunutze zu machen oder Zelltod-Programme zu manipulieren. Interessanterweise sind die zytotoxischen Mechanismen, welche durch herkömmliche Bestrahlungs- oder Chemotherapien ausgelöst werden, davon meist deutlich verschieden. Aus diesem Grund können onkolytische Viren in Kombination mit traditionellen Behandlungsmaßnahmen oft einen synergistischen und damit verstärkenden Effekt auf die Tumortherapie auslösen¹¹⁵⁻¹¹⁶. Neben der Kombination mit herkömmlichen Therapieformen gibt es noch weitere Ansätze, die onkolytische Virus-Therapie durch Kombination zu verbessern. Dazu zählt zum einen die Identifikation von Schwachstellen, um diese mit Hilfe einer gezielten Therapie einzudämmen. Eine weitere Kombinationsstrategie betrifft onkolytische Viren, die neben der Replikations-bedingten Onkolyse, eine Immunantwort auslösen, welche speziell gegen Tumorzellen gerichtet ist. Werden solche Viren mit weiteren Formen der Immuntherapie kombiniert, kann eine synergistische Immunantwort und damit eine verstärkte Tumorbekämpfung erzielt werden.

Allerdings findet eine Kombination mit herkömmlichen Therapieformen immer noch am häufigsten Anwendung, da durch die langjährige Erfahrung mit den jeweiligen Monotherapien eine direkte Übertragung der Kombinationstherapie in die Klinik ermöglicht wird¹¹⁷.

Ein Beispiel für solch eine Anwendung stellt die Kombination von γ 34.5-deletierten Herpes simplex-Viren (HSV-1) mit herkömmlichen Bestrahlungs- oder Chemotherapien dar. Ein synergistischer Wirkmechanismus führt hierbei zu einer verstärkten Virus-Replikation im Tumor und in Folge dessen zu einer massiv verbesserten Tumorregression¹¹⁸⁻¹¹⁹. Eine viel diskutierte Hypothese, wie es zu der verstärkten Virus-Replikation kommt, beruht auf einer durch Bestrahlung oder Chemotherapie ausgelösten intrazellulären Expression von GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 34*), welches eine starke strukturelle Homologie zu dem viralen HSV-1 γ 34.5-Protein aufweist¹²⁰ (Abbildung 10). Dieses Protein bewirkt eine andauernde Protein-Synthese und bestimmt das Überleben der Zelle. Ist das Gen, welches für dieses Protein kodiert, deletiert, wie es in dem hier beschriebenen Herpes simplex-Virus der Fall ist, führt dies einerseits zu einer reduzierten Toxizität, aber in Folge ebenfalls zu einer attenuierten Virus-Replikation¹²¹⁻¹²². Die Bestrahlungs- oder Chemotherapie-bedingte Hochregulierung der GADD34-Expression wäre in der Lage, das γ 34.5-Protein funktionell zu ersetzen, wodurch sich die verstärkte Replikation und demnach die verbesserte onkolytische Kapazität des HSV-1 erklären lässt¹²³⁻¹²⁴.



- | | |
|---|--|
| 1 DNA-Schäden durch Chemotherapie oder Bestrahlung | 1 Infektion mit γ 34.5-deletierten Herpes-Viren |
| 2 Überexpression von GADD34 | 2 Transkription viraler mRNAs |
| 3 GADD34 bindet an weitere Translations-Regulatoren | |
| 4 GADD34 dephosphoryliert eIF2a | |
| 5 Translation von Herpes-Virus-Proteinen | |

Abbildung 10: Synergistische Wirkung von γ 34.5-deletierten Herpes simplex-Viren und konventionellen Krebstherapien ¹¹⁷.

Im Gegensatz zu dieser synergistischen Verstärkung der Tumorthherapie können spezielle Kombinationen von onkolytischen Viren mit herkömmlichen Behandlungsformen allerdings auch negative Auswirkungen sowohl auf die Gesundheit des Patienten als auch auf den Behandlungserfolg haben. So ist bekannt, dass spezielle Bestrahlungsformen ¹²⁵ oder auch manche Chemotherapeutika ³³ aufgrund ihrer Eigenschaft, direkt an der DNA anzugreifen, auch negative Einflüsse auf die Replikation von onkolytischen Viren ausüben können. Aus diesem Grund muss bei einer Kombination von unterschiedlichen Therapieansätzen darauf geachtet werden, ob die jeweiligen Behandlungsformen miteinander kompatibel sind.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines speziellen onkolytischen Vaccinia-Virus, welches zusätzlich zu den Reporterproteinen β -Galaktosidase und Ruc-GFP für das humane *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 kodiert. Dieses rekombinante Virus (GLV-1h90) sollte in allen Experimenten im Vergleich zu dem Kontrollvirus GLV-1h68 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden. Als Tumormodell sollte das humane androgen-unabhängige Prostatakarzinom DU-145 eingesetzt werden.

Zur Charakterisierung in Zellkultur sollte zunächst das Replikationsverhalten von GLV-1h90, die Expression des *Designer*-Zytokins sowie die funktionelle Aktivität des von GLV-1h90-exprimierten Hyper-IL-6 analysiert werden.

Basierend auf dieser Grundvoraussetzung, stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung des rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen dar. Hierbei sollte zunächst nach intravenöser Injektion die gezielte Überexpression von Hyper-IL-6 im Tumor sowie das Vorhandensein des Fusionsproteins in der Blutzirkulation untersucht werden. Des Weiteren sollte aufgeklärt werden, welche Einflüsse das *Designer*-Zytokin auf die Tumorregression ausübt und ob es darüber hinaus systemische Effekte vermitteln kann.

Basierend auf der Beobachtung, dass GLV-1h90-injizierte Tumor-tragende Mäuse eine temporäre Erhöhung der Thrombozyten-Zahl aufwiesen, sollte weiterhin eine mögliche klinische Anwendung für dieses Virus untersucht werden. In einer Kombinationstherapie mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C und dem rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h90 sollte daher analysiert werden, ob das intratumoral exprimierte Hyper-IL-6 der Mitomycin C-induzierten Thrombozytopenie, eine häufig auftretende Nebenwirkung bei Chemotherapien, aufgrund der systemisch-vermittelten Thrombozyten-Produktion entgegenwirken kann.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Materialien	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid / Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose Low Melt	AppliChem, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Azur II	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstad
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylat	Roth, Karlsruhe
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Citronensäure	AppliChem, Darmstadt
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM-Medium	PAA, A-Pasching
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Epon 812	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Ethanol (p.a.)	Riedel deHaen, Seelze
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, A-Pasching
Glucose (45 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
1x Hank's BSS	PAA, A-Pasching

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	PAA, A-Pasching
Hoechst	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung 0,9 % Miniplasco connect	Braun, Melsungen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	PAA, A-Pasching
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luminol	Amersham, Freiburg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MEM-Medium	PAA, A-Pasching
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mitomycin C (<i>Streptomyces caespitosus</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mitomycin C medac	Medac GmbH, Wedel
Moviol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumborat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA (Na ₂ -EDTA)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Whatman, Dassel
Nonidet P-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Osmium	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
1x PBS	PAA, A-Pasching
Penicillin / Streptomycin	PAA, A-Pasching
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot

Proteaseinhibitoren-Mix Complete Mini	Roche, US-Indianapolis
Schwefelsäure (95 %)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth Karlsruhe
Streptavidin-HRP	R&D Systems, US-Minneapolis
Substrate Solution (ELISA)	R&D Systems, US-Minneapolis
Thiozoly Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, CH-Buchs
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	PAA, A-Pasching
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

2.2 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen

ACD-Puffer:	2,5 %	Trinatriumcitrat
	2 %	D-Glucose
	1,5 %	Citronensäure
	pH 6,7	
	+ zusätzlich immer frisch 40 µl 0,5 M EGTA pro 1 ml Puffer	
1x Bradford-Lösung:	50 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
	25 ml	Ethanol (96 %)
	50 ml	Phosphorsäure (85 %)
	mit H ₂ O auf 550 ml auffüllen	
CMC-Medium:	7,5 g	CMC
	500 ml	DMEM (+ 1 % Pen/Strep + 5 % FKS)

ECL-Reagenz:	Lösung 1:	90 mM	p-Cumarsäure
	Lösung 2:	250 mM	Luminol
	Lösung 3:	1 M	Trisi-HCl pH 8,5
			0,5 ml von Lösung 1 1,0 ml von Lösung 2 20 ml von Lösung 3 mit H ₂ O auf 200 ml auffüllen → 3 µl H ₂ O ₂ auf 10 ml Lösung
Einfriermedium:	90 %		Medium
	10 %		DMSO
ELISA Wasch-Puffer:	2 l		1x PBS
	0,05 %		Tween-20
	pH 7,4		
ELISA Blockier-Puffer:	200 ml		1x PBS
	1 %		FKS
	5 %		Saccharose
	0,05 %		NaN ₃
ELISA Stopp-Lösung:	2 N		H ₂ SO ₄
Karnovsky-Lösung:	2 %		Paraformaldehyd
	2,5 %		Glutaraldehyd
	0,1 M		Cacodylat pH 7.2
Kristallviolett-Lösung:	1,3 g		Kristallviolett
	50 ml		Ethanol
	300 ml		Formaldehyd 37 %
	650 ml		H ₂ O _{bidest.}
Methylenblau-Färbelösung:	Lösung 1:	1 %	Methylenblau in 1%iger Natriumboratlösung
	Lösung 2:	1 %	Azur II in ddH ₂ O
			→ beide Lösungen 1:1 mischen und zweimal filtrieren

Protein-Lysepuffer für Organe:	50 mM	Tris-HCl
	2 mM	EDTA, pH 7,4
	2 mM	PMSF
	+ zusätzlich immer frisch eine Proteaseinhibitoren- Tablette (Roche) pro 10 ml Lösung	
Paraformaldehyd (PFA):	4 g PFA in 80 ml warmen H ₂ O _{bidest.} lösen NaOH zugeben bis Lösung klar ist 10 ml 10x PBS pH 7,4 mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen	
1x PBS:	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x12 H ₂ O
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
1x PBS ⁺⁺ :	1x PBS	
	2,5 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
Ponceau S-Färbelösung:	0,5 g	Ponceau S
	1 ml	Essigsäure
	mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen	
RIPA-Puffer pH7,4:	25 mmol/l	Tris-HCl, pH 7,6
	150 mmol/l	NaCl
	1 %	NP-40
	1 %	sodium deoxycholate
	0,1 %	SDS
	→ pH 7,4 + zusätzlich immer frisch eine Proteaseinhibitoren- Tablette (Roche) pro 10 ml Puffer	

10x SDS-Laufpuffer:	440 mM	Tris-Base
	2 M	Glycin
	1,5 % (w/v)	SDS
	pH 8,3	
5x SDS-Probenpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	30 %	Glycerin
	0,04 %	Bromphenolblau
	84 mM	β -Mercaptoethanol
	4 M	Harnstoff
Strip-Lösung für Western Blots:	4 ml	SDS (10 %)
	25 ml	Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)
	140 μ l	β -Mercaptoethanol
	mit H ₂ O auf 20 ml auffüllen	
1x Towbin-Puffer:	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	20 %	EtOH
	pH 8,3	

2.3 Verwendete Zelllinien und entsprechende Zellkulturmedien

2.3.1 Zelllinien

CV-1 Zellen	adhärent wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
DU-145-Zellen	adhärent wachsende humane Prostatakarzinomzellen isoliert aus Gehirnetastasen; hormonunabhängig

2.3.2 Zellkulturmedien

CV-1:	500 ml	DMEM High Glucose (4,5 g/l)
	10 %	FKS
	1 %	Antibiotika (Pen/Strep)
DU-145:	500 ml	MEM
	10 %	FKS
	1,5 g/l	Natriumbicarbonat
	1 %	Glutamax
	1 %	Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
	1 %	Natriumpyruvat
	1 %	Antibiotika (Pen/Strep)

2.4 Verwendete Antikörper und rekombinante Proteine

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
anti- <i>mouse</i> β -Aktin (IgG1), polyklonal	Maus IgG	Abcam, US-Cambridge
anti- <i>mouse</i> CD31, monoclonal	Hamster IgG	Millipore, US-Billerica
anti- <i>mouse</i> CD41, monoclonal	Ratte IgG1	GeneTex, US-Irvine
anti- <i>mouse</i> CRP, polyklonal	Kaninchen IgG	Immunology Consultants ab.
anti- <i>mouse</i> β -Galactosidase, polyklonal	Kaninchen IgG	Molecular Probes, Leiden
anti- <i>mouse</i> GFP (IgG), polyklonal	Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
anti- <i>human</i> IL-6, polyklonal	Ratte IgG1	BioLegend, US-San Diego
anti- <i>human</i> IL-6 (ELISA), monoklonal	Maus IgG	R&D Systems, US-Minneapolis
biotinylierter anti- <i>human</i> IL-6 (ELISA), polyklonal	Ziege IgG	R&D Systems, US-Minneapolis
anti- <i>mouse</i> Phospho-STAT3 (Tyr705), polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, US-Danvers
anti- <i>mouse</i> STAT3, polyklonal	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, US-Danvers

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
anti-Maus (IgG), HRP-konjugiert	Ziege	Abcam, Cambridge
anti-Ratte, HRP-konjugiert	Esel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen, Cy3-konjugiert	Esel	Jackson Immuno Research, US-West Crove
anti-Ratte, Cy3-konjugiert	Esel	Jackson Immuno Research, US-West Crove
anti-Hamster, Cy5-konjugiert	Esel	Jackson Immuno Research, US-West Crove

Rekombinante Proteine

Bezeichnung	Hersteller
gp130/Fc Chimera	R&D Systems, US-Minneapolis
Onkostatin M	Biomol, Hamburg
<i>human</i> IL-6	R&D Systems, US-Minneapolis

2.5 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Hersteller
Anästhesie-Anlage	Berthold Technologies, Bad Wildbad
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroblot-Apparatur	BioRad, München
ELISA-Photometer Sunrise™	TECAN Group, Männedorf
FastPrep™ FP12	Bio101, Thermo Electron Corp.
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filmkassette	Dr. Goos suprema, Heidelberg
Flow-Hood LaminAir	Kendro, Langenselbold
Glaskapillare, heparinisiert	Hecht, Sondheim
Glaswaren	Schott, VWR Brand

Gelapparatur für Polyacrylamidgelelektrophorese	BioRad, München
Infrarotlampe	Petra, Burgau
Kanülen	Braun, CH-Emmenbrücke
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
<u>Mikroskope:</u>	
• TCS SP2 Konfokales Mikroskop	Leica, Wetzlar
• MZ 16 FA Stereo-Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
• DMIRB Inverses Mikroskop	Leica, Wetzlar
• Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
NightOWL LB 981 imaging system	Berthold, Bad Wildbach
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Objekträger	Hecht-Assistent, Sondheim
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
Schredder GentleMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Semi-Dry Blotapparatur	Peqlab, Erlangen
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
Sysmex KX-21 <i>automatic micro-cell counter</i>	Sysmex, Nordstedt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Schüttler	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom MT-7000 Ultra	Boeckeler Instruments, Tucson
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	TPP, Schwerin

2.6 Rekombinante Vaccinia-Virus-Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Vaccinia-Virus-Konstrukte eingesetzt, welche beide durch zielgerichtete Mutagenese aus dem Wildtypstamm L1VP entstanden sind. Dabei handelt es sich zum einen um das kürzlich beschriebene Konstrukt GLV-1h68 (Abbildung 11)¹²⁶ und zum anderen um das Viruskonstrukt GLV-1h90 (Abbildung 12), dessen Charakterisierung Inhalt dieser Arbeit ist.

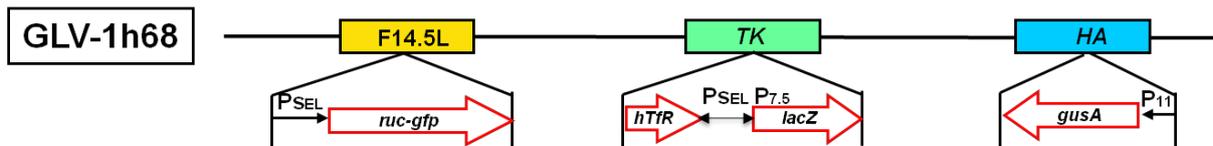


Abbildung 11: Viruskonstrukt GLV-1h68.

Das Virus GLV-1h68 trägt im Genort *F14.5L* hinter einem *early/late*-Promotor ein Fusionsprodukt aus den Genen, die für die *Renilla*-Luziferase (*RUC*) und für das grün-fluoreszierende Protein (*GFP*) kodieren. Im Lokus der Thymidinkinase (*TK*) trägt das Virus das revers zum *early/late*-Promotor P_{SEL} eingebaute Transferrin-Rezeptor-Gen (*rtfr*) sowie das Markergen β -Galaktosidase (*lacZ*), welches durch den Promotor $p_{7.5}$ kontrolliert wird. Ein weiteres Markergen, das für die β -Glucuronidase (*gusA*) kodiert, wird durch den viralen Promotor p_{11} kontrolliert und ist im *HA*-Locus (Hämagglutinin-Gen) inseriert.

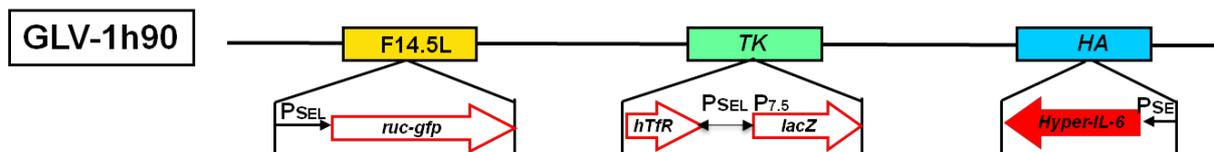


Abbildung 12: Viruskonstrukt GLV-1h90.

Das Viruskonstrukt GLV-1h90 ist ähnlich zusammengesetzt wie GLV-1h68. Das Gen des Ruc-GFP Fusionsproduktes befindet sich ebenfalls im Genort *F14.5L* und der *TK*-Lokus trägt die Markergene für den Transferrin-Rezeptor und für *lacZ*. Der *HA*-Lokus dagegen trägt anstelle des Markergens für die β -Glucuronidase ein Fusionsgen, das für Hyper-IL-6 kodiert. Hyper-IL-6 besteht aus den N-terminalen 323 Aminosäuren des humanen Interleukin-6 Rezeptors (IL-6-R) verbunden über einen *Linker* aus 13 Aminosäuren (RGGGSGGGGSVE) mit dem humanen Interleukin-6 (IL-6) ohne Signalpeptid.

Beide rekombinanten Viren wurden von Dr. Qian Zhang und Dr. Nanhai Chen, Genelux Corp., San Diego, USA, konstruiert und zu Analysezwecken der AG Szalay, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

2.7 Versuchstiere

Für *in vivo* Experimente wurden in dieser Arbeit weibliche, athymische *Nude*-Mäuse von der Firma Harlan (Borchen) eingesetzt. Diese Mäuse zeichnen sich durch eine autosomal rezessive Mutation im *nu*-Lokus auf Chromosom 11 aus, wodurch ein vollkommen haarloser Phänotyp entsteht. Zusätzlich weisen diese Tiere einen dysfunktionalen, rudimentären Thymus auf. Dies äußert sich in einer T-Zell-Defizienz, die Funktion der B-Zellen dagegen ist normal. Aufgrund des defekten Immunsystems eignen sich athymische *Nude*-Mäuse für den Einsatz in der Onkologie, Immunologie oder anderen Bereichen der biomedizinischen Forschung. Xenotransplantate werden nicht abgestoßen und auch Antikörperproduktion ist möglich.

Die Tiere wurden in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h hell und 12 h dunkel gehalten. Zusätzlich wurde die Lichtintensität abgeschwächt, da es sich bei *Nude*-Mäusen um Albinoten handelt.

Alle Versuchstiere wurden als Gruppen in separaten, sterilen Käfigen mit steriler Einstreu und bestrahltem Nagetierfutter entsprechend den Vorgaben der Regierung Unterfranken (Würzburg) gehalten.

2.8 Software

Adobe Photoshop CS4	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator	Bildbearbeitung
Axiovision 4.5	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Zeiss)
Image J	http://rsbweb.nih.gov/ij
Leica IM1000 4.0	Bildaufnahme (Stereomikroskop, Leica)
Leica Confocal 2.16	Bildaufnahme (Konfokales Mikroskop, Leica)
Magellan5	ELISA-Reader
Microsoft Word 2007	Textverarbeitung
Microsoft Excel 2007	Diagramme und Statistik

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Säugetierzellen

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Flow-Hood) durchgeführt. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wurden die verwendeten Zellkulturmedien, Lösungen und Gebrauchsmaterialien vor Gebrauch autoklaviert und den Medien zusätzlich Penicillin/Streptomycin zugefügt.

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten eukaryontischen Zellen wurden in verschieden großen Zellkulturflaschen oder -schalen in einem sensorgesteuerten Inkubator kultiviert. Dieser sorgt für die Aufrechterhaltung der exogenen Parameter (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂), wodurch ein optimales Wachstum der Zellen sichergestellt wird. Die spezielle Oberflächenbeschaffenheit (TC-Beschichtung) der Zellkulturflaschen und -schalen ermöglicht den adhärent wachsenden Zellen eine Anheftung über ihre Adhäsionsproteine wie Fibronectin, Laminin und Kollagen. Fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Zugabe zu den Medien für 20 Minuten bei 40 °C hitzeinaktiviert.

Die Kulturmedien und Waschpuffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, ein Vorgang, der eine möglichst schonende Behandlung der Zellen gewährleistet. Teilung und Wachstum der Zellen ist nicht unbegrenzt möglich. Bevor die Zellen eine Konfluenz von 100 % erreichten, wurden sie passagiert, da es sonst entweder zur Ausbildung eines Bi- bzw. Multilayers kommt oder aber das Wachstum stagniert. Zusätzlich muss nach zwei bis drei Tagen das Zellkulturmedium gewechselt werden, da die Inhaltsstoffe verbraucht werden und sich Stoffwechselprodukte der Zellen und zum Teil auch tote Zellen im Überstand anreichern. Der im Medium enthaltene pH-Indikator zeigt durch einen Farbumschlag von rot nach gelb den fortschreitenden Verbrauch des Mediums an.

3.1.1.1 Kultivierung von CV-1 Zellen

CV-1-Zellen sind sehr stoffwechselaktiv und wurden daher alle drei bis vier Tage passagiert. Hierbei wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Zellkulturflaschenboden adhärent wachsenden Zellen mit Hank's BSS (*Balanced Salt Solution*) gewaschen. Dadurch wurden abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Mediumreste entfernt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37 °C vom Boden abgelöst. Das Enzym Trypsin ist eine

Endopeptidase und spaltet Peptidbindungen spezifisch hinter den Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein, wodurch die proteolytische Ablösung der Zellen hervorgerufen wird. Durch kräftiges Klopfen an das Kulturgefäß konnte das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden unterstützt werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt, da dieses die divalente Kationen Calcium und Magnesium enthält, welche in der Lage sind, Trypsin zu inhibieren. Zellkontakte wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Je nach Bedarf wurde diese Zellsuspension in der gewünschten Konzentration in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium ausgesät.

3.1.1.2 Kultivierung von DU-145-Zellen

Das Passagieren von DU-145-Zellen erfolgte analog der CV-1 Zellkultivierung, wobei DU-145-spezifisches Medium verwendet wurde.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Nachfolgende Versuche sowie das Passagieren der Zellen machen eine genaue Bestimmung der Zellzahl in der vorhandenen Zellsuspension notwendig. Zu diesem Zweck wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Objektträger, der über ein eingezätztes Gitternetzwerk verfügt, sowie ein dazugehöriges Deckgläschen. Ist dieses aufgelegt, lassen sich mit Hilfe von Kapillarkräften ca. 10 µl Zellsuspension unter das Deckgläschen ziehen. Das Gitter besteht aus vier großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wurde aus jedem der vier großen Quadrate jeweils eine Reihe aus 4 kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die vorhandene Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension}$$

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen mit einer Konfluenz von 90-100 % wurden einmal mit Hank`s BSS gewaschen und mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Im Anschluss an die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellsuspension bei 800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Einfriermedium verdünnt, dass Aliquots von 5×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen gefüllt werden konnten. Die Röhrchen wurden zunächst für

4 Stunden bei -20 °C und weiter über Nacht bei -80 °C abgekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen für ca. 30 s in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Zu den noch nicht komplett aufgetauten Zellen wurde 1 ml des entsprechenden Kulturmediums zugegeben, wodurch sie vollständig auftauten. Nach Zugabe von weiteren 4 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (800 rpm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Nach ca. 24 Stunden waren die Zellen adhärent und das Medium konnte erneuert werden.

3.1.4 MTT-Proliferations-Assay

Um den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu bestimmen wurde der MTT-Proliferations-Assay eingesetzt. Er basiert auf der, durch vitale Zellen vermittelte, Reduktion des Farbstoffes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) in ein blau-violettes Formazan. Dafür wurden Zellen in 24-Well-Platten mit je Well 250 µl MTT-Lösung (2,5 mg/ml, gelöst in farblosem DMEM-Medium) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an das Anfärben der vitalen Zellen wurden diese durch die Zugabe von je Well 1 ml 1 N HCl in Isopropanol lysiert. Die kolorimetrische Auswertung erfolgte in 96-Well-Platten bei 570 nm mittels eines ELISA-Readers.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Infektion von Säugierzellen mit Vaccinia-Viren

Die Infektion mit Vaccinia-Viren erfolgte bei 95 % Konfluenz der Zellen in entsprechend ausgesäten Kulturschalen oder -platten. Um die zur Infektion benötigte Virusmenge zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Virustiter}} = \text{Virusmenge (Volumen)}$$

Die Berechnung erfolgt auf Basis der gewünschten Infektionsrate (= Rate der infektiösen Partikel pro Zelle). Die Angabe MOI 1 (*multiplicity of infection*) bedeutet, dass theoretisch jede Zelle von einem Viruspartikel infiziert wird, bei MOI 0,5 entspricht dies einer

Infektionsrate von 0,5 Viren pro Zelle. Der Virustiter wird in pfu/ml (*plaque forming units pro ml*) angegeben.

Vor jeder Infektion wurde die Virus-Suspension im Wasserbad aufgetaut und dreimal für je 30 s bei 4 °C sonifiziert, wodurch sich Virusaggregate trennten. Die zu infizierenden Zellen wurden mit Hank's BSS gewaschen und anschließend die zuvor berechnete Virusmenge in einem möglichst geringen Volumen Infektionsmedium (DMEM, 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin) vorsichtig daraufgegeben. Die infizierten Zellen wurden für eine Stunde in den Inkubator gestellt und im Abstand von jeweils 20 min geschwenkt, wodurch eine gleichmäßige Infektion gewährleistet wurde. Im Anschluss wurde das Infektionsmedium abgenommen, die Zellen erneut mit Hank's BSS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters mittels *Plaque Assay*

Durch *Plaque-Assays* kann die Anzahl der Viruspartikel in einer Suspension bestimmt werden. Hierfür wurden CV-1 Zellen in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Von den zu analysierenden Proben wurden zunächst nach dreimaligem Sonifizieren Verdünnungsreihen in Infektionsmedium hergestellt. Anschließend wurden die CV-1 Zellen mit Hank's BSS gewaschen und mit 250 µl der jeweiligen Verdünnung infiziert. Um die Genauigkeit zusätzlich zu erhöhen, wurden pro Verdünnung zwei *Wells* infiziert und in der Endauswertung ein Mittelwert aus beiden gebildet. Nach einer Stunde Inkubation wurde 1 ml Carboxymethylcellulose-Medium (CMC-Medium) zugegeben und nach weiteren 48 h bei 37 °C wurden die Zellen pro *Well* mit 250 µl Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die Zugabe von CMC-Medium verhindert die Ausbreitung der Virusinfektion über das Medium, so dass sich die Viren ausschließlich von Zelle zu Zelle ausbreiten und somit Plaques bilden. Nach einer Färbezeit von etwa 24 h bei Raumtemperatur waren diese Plaques als nicht-gefärbte Regionen sichtbar. Über das Auszählen der Plaques konnte der Virustiter in pfu/ml (*plaque forming units pro ml*) mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Plaques [pfu]}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Infektionsvolumen [ml]}} = \text{Virustiter [pfu/ml]}$$

3.2.3 Analyse der Virusreplikation

Zur Analyse des Replikationsverhaltens von GLV-1h68 oder GLV-1h90 in DU-145-Zellen wurden die Viruskonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl in Zelllysaten als auch in Zellkulturüberständen von infizierten Zellen bestimmt.

Dazu wurden zunächst DU-145-Zellen in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Diese wurden anschließend mit dem zu untersuchenden Virus infiziert (MOI 0,1). Zu den Zeitpunkten 1, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 hpi (*hours post infection*) wurden von je 3 Wells zunächst das Medium abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden mit Hank's BSS gewaschen und mit je 500 µl Trypsin vom Boden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 10000 rpm für 2 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Hank's BSS aufgenommen. Diese Suspension wurde ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Damit das amplifizierte Virus frei wird, müssen die geernteten Zellen lysiert werden. Hierfür wurden die Proben dreimal bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut (*freeze-and-thaw*-Zyklen).

In einem darauf folgenden *Plaque-Assay* wurden anschließend die Virustiter der jeweiligen Proben bestimmt, wobei jeweils der Mittelwert aus den drei unabhängigen Ansätzen berechnet wurde.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden zunächst DU-145-Zellen in 6-Well Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % mit dem entsprechenden Virus infiziert (MOI 0,5). Als Negativkontrolle diente ein Well mit uninfizierten DU-145-Zellen.

2, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 hpi wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit Hank's BSS gewaschen. Zum Ablösen und Lysieren der Zellen wurden jeweils 400 µl RIPA-Puffer direkt auf den Zellrasen pipettiert, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen zusätzlich aufzuschließen, wurden die Lysate anschließend für 30 sec sonifiziert. Durch eine folgende Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) wurden die Zelltrümmer abgetrennt, die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur weiteren Analyse der im Zelllysat enthaltenen Proteine ist es notwendig, die jeweilige Proteinkonzentration zu bestimmen. Dafür wurde ein von Bradford¹²⁷ etabliertes Verfahren eingesetzt. Diese Methode macht sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm zu 595 nm nach Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste von Polypeptiden zunutze.

Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe definierter Proteinmengen von 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 µg/ml BSA erstellt, anhand deren die Ermittlung der Proteinkonzentration im Zelllysat möglich war.

Für die eigentliche Bestimmung der Proteinmenge wurde 1 µl des jeweiligen Zelllysats zu 99 µl H₂O_{bidest.} gegeben und dieser Ansatz mit 900 µl Bradford-Lösung vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben in Einmalküvetten überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.3.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Konzentrierung von Proteinen aus verdünnten Lösungen wird Trichloressigsäure (TCA) eingesetzt. Dies ist vor allem dann nötig, wenn ein Protein nur in sehr geringen Mengen in der Zelle exprimiert wird. Durch TCA werden Proteine ausgefällt und können so aus Lösungen isoliert werden.

Bis zu einer Endkonzentration von 15 % wurde zu jeder Probe 100%ige TCA-Lösung zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. In einem ersten Aufreinigungsschritt wurden anschließend die präzipitierten Proteine abzentrifugiert (5100 rpm, 45 min, 4 °C) und das Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde zweimal mit jeweils 200 µl Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Protein-Pellet 1 h mit offenem Deckel getrocknet und in einem bestimmten Volumen 5x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

3.3.4 Analyse von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen werden häufig gelelektrophoretische Methoden verwendet. Der Vorteil der diskontinuierlichen PAGE¹²⁸ ist eine Vermeidung von Aggregationen und Präzipitationen mancher Proteine, wodurch eine effektivere Auftrennung gewährleistet wird.

Das Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) gliedert sich in ein weitporiges Sammelgel (pH 6,8) und ein engporiges Trenngel (pH 8,8).

Um Proteine nach ihrer Masse aufzutrennen, nutzt man die Methode der SDS-PAGE. SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ist ein anionisches Detergenz, welches sich an positive Seitenketten von Proteinen anlagert und ihnen dadurch eine homogene negative Ladung verleiht.

Da die Größe eines Proteins bestimmt, wieviel SDS gebunden wird, erfolgt die Auftrennung nach der Masse. Zunächst wird mit Hilfe von SDS die Raumstruktur der Proteine zerstört und mittels des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken reduziert. Beide Reagenzien sind Bestandteile des 5x SDS-Probenpuffers, der vor dem Gellauf zu den Proben pipettiert wird.

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels werden unter anderem Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie Tetramethyldiamin (TEMED) benötigt. APS ist ein Hilfsmolekül (Radikalbildner), welches Acrylsäure mit Hilfe des Katalysators TEMED radikalisiert, wodurch eine Polymerisation in Gang gesetzt wird.

Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wird der Anteil an Acrylamid im Trenngel verändert.

Die Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Reagenzien	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel 5 %
H₂O_{bidest.}	4,1 ml	3,4 ml	3,05 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	3,3 ml	3,3 ml	0,65 ml
1,5 M Trisi-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	/
0,5 M Trisi-HCl pH 6,8	/	/	1,25 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	50 μl
10 % APS	50 μl	50 μl	25 μl
TEMED	5 μl	5 μl	5 μl

Nachdem die mit Probenpuffer versetzten Proteinproben, wie zum Beispiel Zellysate und Überstände von infizierten DU-145-Zellen oder auch Organlysate, bei 95 °C für 5 min vollständig denaturiert wurden, konnte das Gel beladen werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei Spannungen bis zu 180 V. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Laufpuffer.

3.3.5 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)

Da Proteine im Inneren der Polyacrylamid-Matrix des Gels nicht für makromolekulare Liganden, beispielsweise Antikörper, zugänglich sind, müssen diese für genauere Analysen elektrophoretisch auf eine immobilisierende Membran transferiert werden¹²⁹. Für diese Übertragung wurde das *Semidry-Blot*-System verwendet.

Die denaturierten Proteine werden durch Wanderung im Ionengradienten auf die Membran überführt, auf welcher sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen haften bleiben. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur zurückgewinnen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

Hierfür wurden die Proteine auf dem Polyacrylamidgel zusammen mit in Towbin-Puffer getränkten Whatman-Papieren und der Nitrocellulose-Membran horizontal in einer entsprechenden Apparatur dem Transfer unterzogen. Die hierfür notwendige Stromstärke richtet sich nach der Größe des Gels und wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

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

Der Aufbau des *Semidry-Blot*-Systems erfolgte nach folgendem Schema:

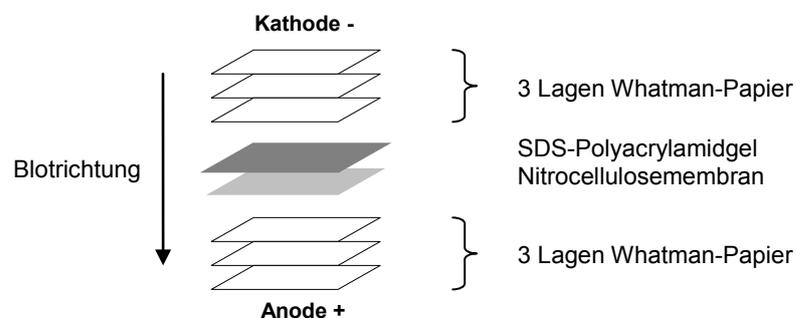


Abbildung 13: Aufbau einer *Semidry-Blot*apparatur.

Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran für einige Minuten mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen, die nach der Entfärbung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ als rote Banden auf weißem Hintergrund erkennbar sind.

3.3.6 Immundetektion mit Hilfe der ECL-Methode

Eine Möglichkeit, die auf eine Membran transferierten Proteine zu visualisieren, ist die Immundetektion. Dabei bindet ein antigenspezifischer primärer Antikörper an Epitope des zu analysierenden Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein HRP-markierter (*horseradish Peroxidase*) sekundärer Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt. Diese Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol zu 5-Aminophtalsäure unter Katalysatorwirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Oxidation des Luminols bewirkt eine Lichtemission, die mit Hilfe eines Röntgenfilms erfasst werden kann.

Bevor mit der Immundetektion begonnen werden konnte, wurden mit Hilfe einer 5%-igen Milchpulver-Lösung die freien Stellen auf der Membran für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Dies verhindert eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrocellulose-Membran.

Anschließend wurde die Membran mit dem Protein-spezifischen primären Antikörper in 1x TBT für 3 h behandelt. Im nächsten Schritt wurde der entsprechende HRP-markierte sekundäre Antikörper dazugegeben, welcher ebenfalls in 1x TBT verdünnt wurde. Vor und zwischen den einzelnen Behandlungen mit Antikörper-Lösungen wurde die Membran je dreimal für 5 min in 1x TBT gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.

Zur anschließenden Visualisierung wurde die ECL-Lösung mit enthaltenem Luminol auf die Membran gegeben und unter leichtem Schütteln für 1 min inkubiert. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach verwendeten Antikörpern die optimale Expositionszeit ausgewählt. Bei allen Reaktionsschritten wurde darauf geachtet, dass alle Antikörper-Lösungen möglichst frisch angesetzt wurden und die Membran immer vollständig mit Flüssigkeit benetzt war. Zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen auf der Membran wurden alle Inkubationsschritte auf einem Schüttler durchgeführt.

Zusätzlich konnte die Lichtemission der einzelnen Banden auf der Membran mit Hilfe eines *Biolumineszenz-Imagers* (NightOWL II LB 983) quantifiziert werden. Dabei wurde die Photonenemission mit einer gekühlten CCD-Kamera detektiert und mit Hilfe der WinLight Software ausgewertet.

Um eine Detektion von verschiedenen Proteinen innerhalb derselben Ausgangsprobe zu gewährleisten, kann die Nitrocellulose-Membran von allen gebundenen Antikörpern entfernt (*Strippen*) und mit anderen Antikörpern behandelt werden. Dafür wurde die Membran zunächst für 15 min in 10 ml Strip-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit 1x TBT gewaschen, woraufhin die erneute Immundetektion mit dem Blockierschritt begonnen werden konnte.

3.3.7 Quantifizierung der Hyper-IL-6-Expression mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Eine weitere Möglichkeit, die Expression des rekombinanten Proteins Hyper-IL-6 sowohl nachzuweisen als auch zu quantifizieren, stellt das ELISA-Testverfahren dar. Hierbei handelt es sich um eine immunologische Nachweismethode, welche auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. In dieser Arbeit wurde die Technik des Sandwich-ELISAs eingesetzt, bei der zwei Antikörper verwendet werden, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, allerdings an unterschiedlichen Stellen.

Zunächst wurde der *capture*-Antikörper (monoklonaler anti-human IL-6 Antikörper) an eine feste Phase gebunden. Dafür wurden jeweils 2 µg/ml Antikörper in 100 µl 1x PBS über Nacht bei 4 °C in einer 96-Well-Platte inkubiert. Nach einem Waschschrift (dreimaliges Waschen mit je 400 µl ELISA-Waschpuffer) wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit je 300 µl ELISA-Blockierlösung maskiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde nun die jeweilige Probe hinzugegeben. Hierbei wurden sowohl Zelllysate und Überstände von infizierten DU-145-Zellen als auch Tumorlysate und Serumproben in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Standard-Verdünnungsreihe des rekombinanten humanen IL-6 Proteins von 2000 - 31,25 pg/ml aufgetragen. Während einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bildete der *capture*-Antikörper Komplexe mit dem entsprechenden Antigen in der Probe. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurde ein spezifischer *detection*-Antikörper (polyklonaler biotinylierter anti-human IL-6 Antikörper) in einer Konzentration von 25 ng/ml in 1x PBS hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Durch diesen Vorgang entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, welcher in einem folgenden Schritt durch ein Streptavidin-HRP-Konjugat (1:200 in 100 µl 1x PBS, 20 min) nachgewiesen wurde. Streptavidin geht eine spezifische Bindung mit Biotin ein und aufgrund der *horseradish peroxidase* (HRP) kommt es durch Umsetzung des Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB) in der *Substrat Solution* (100 µl, 20-30 min) zu einer enzymatischen Farbreaktion. Diese Farbreaktion verlief von farblos zu blau, wobei sich die Farbe durch Abstoppen der Reaktion mit je 50 µl 1 M H₂SO₄ zu gelb veränderte. Diese Farbreaktion konnte nun photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Anhand der Geradengleichung, welche sich aus der Standard-Verdünnungsreihe ergab, konnten daraus die (Hyper-)IL-6 Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden.

3.3.8 Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6

Interleukin-6 (IL-6) führt über den *JAK/STAT*-Signalweg zur Phosphorylierung von STAT3 und dessen Translokation in den Zellkern. Um zu überprüfen, ob das von GLV-1h90 exprimierte Hyper-IL-6 eine Wirkung auf Krebszellen ausübt, wurde das Vorhandensein von Phospho-STAT3 sowie dessen Lokalisation in der Zelle untersucht. Dafür wurden zwei Test-Systeme entwickelt. Zum einen die Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Lysaten von Hyper-IL-6 behandelten Zellen durch Western Blot-Analysen und zum anderen die Detektion dieser Transkriptionsfaktoren über Immunfluoreszenz-Färbungen in Hyper-IL-6 behandelten Zellen.

3.3.8.1 Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten

DU-145-Zellen wurden zunächst in 10 cm-Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % mit den Vaccinia-Viren GLV-1h68 sowie GLV-1h90 mit MOI 1 infiziert. Als zusätzliche Kontrolle diente eine 10 cm-Schale mit uninfizierten DU-145-Zellen.

Parallel dazu wurden 6-Well-Platten mit den zu untersuchenden Zellen ausgesät und bei 90 % Konfluenz für 24 h mit zellspezifischem Medium inkubiert, welches nur 1 % FKS enthält (Mangelmedium). Dadurch werden den Zellen Nährstoffe entzogen, wodurch diese ihre Aktivität herunter regulieren (*Starven*) und beispielsweise weniger STAT3 phosphoryliert wird. Das unter normalen Zellkulturbedingungen in jeder Zelle vorkommende Phospho-STAT3 hätte eine spätere Auswertung verfälscht.

24 h nach Infektion der DU-145-Zellen wurde jeweils der Überstand abgenommen und sterilfiltriert (0,1 µm), um Viruspartikel und tote Zellen zu entfernen. Der Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen enthielt im Gegensatz zu den GLV-1h68-infizierten und uninfizierten Zellen große Mengen des exprimierten Hyper-IL-6 (konditioniertes Medium). Im Anschluss wurde ein Teil dieses Überstands für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 µg/ml rekombinantem humanen gp130/Fc Chimera versetzt. Gp130 erkennt den Komplex aus IL-6 und IL-6-R und komplexiert dadurch das produzierte Hyper-IL-6, wodurch die Aktivierung des *JAK/STAT*-Signalwegs unterbunden wird. Dieser Ansatz diente als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde die Hälfte des Überstands uninfizierter Zellen mit 100 µg/ml humanem Onkostat M versetzt, da dieser Wachstumsfaktor dieselbe Signalkaskade wie Hyper-IL-6 in Gang setzt.

Nun wurden die mit Mangelmedium behandelten Zellen vom Überstand befreit, mit 1x PBS gewaschen und mit 3 ml der jeweiligen sterilfiltrierten konditionierten Medien versetzt. Während einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C setzten das zuvor ins Medium

abgegebene Hyper-IL-6 sowie das Onkostat M den JAK/STAT-Signalweg in Gang, an dessen Ende phosphorylierte STAT3-Moleküle stehen.

Durch anschließende Herstellung eines Proteinextraktes und Analyse der Proben durch SDS-PAGE und Western Blot konnten diese phosphorylierten STAT3-Proteine detektiert werden.

3.3.8.2 Lokalisation von STAT3 und Phospho-STAT3 in Tumorzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung

Der erste Teil dieser Methode verlief analog zu der Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten, wobei die zu untersuchenden Zellen statt in 6-Well-Platten auf Deckgläschen in 24-Well-Platten kultiviert wurden. Dafür wurden die Deckgläschen zunächst mit 1 N HCl und kurz vor Gebrauch mit Polylysin (300 µl, 1:10 in Hank's BSS) behandelt, wodurch ein adhärentes Wachstum der Zellen gewährleistet wurde. Bei einer Konfluenz von 50 % wurden die Zellen ebenfalls für 24 h mit Mangelmedium versetzt.

Von den konditionierten Medien der infizierten DU-145-Zellen und den Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen wurde jeweils 1 ml auf die gehungerten Zellen gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Medien entfernt und die Zellen durch Überschichten mit 500 µl Paraformaldehyd (PFA) und 10-minütiger Inkubation fixiert. Durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS⁺⁺ wurde das restliche PFA entfernt. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen zunächst mit einer Lösung aus 1x PBS⁺⁺, 5 % FKS und 0,1 % Triton-X 100 für 10-15 min behandelt. Dadurch werden die Zellen zum einen durchlässig für Antikörper und zum anderen kommt es durch den Zusatz von FKS zu einer Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen. Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper (1:100; anti-*mouse* STAT3, anti-*mouse* Phospho-STAT3 (Tyr 705)) in derselben Lösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Zellen belassen. Nachdem durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS⁺⁺ alle Reste des primären Antikörpers entfernt und die Zellen erneut 10-15 min blockiert wurden, vervollständigte die Inkubation (45 min) mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (1:200; Cy3-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper) sowie mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (1:400) in einer Feuchtekammer die Immunfluoreszenz-Färbung. Abschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig entnommen und mit Moviol 4-88 auf einem Objektträger eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axiovert 200M), ausgestattet mit einer Quecksilber-UV-Quelle und dem Programm Axiovision 4.5.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Implantation von humanen Tumorzellen

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden an 5-6 Wochen alten athymischen *Nude*-Mäusen durchgeführt.

Für die Tumor-Implantation wurden DU-145-Zellen in großen Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 95 % kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hank's BSS gewaschen, mit Trypsin vom Boden abgelöst und pelletiert (800 rpm, 5 min). Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und auf 5×10^6 Zellen/100 μ l 1x PBS eingestellt. Mit Hilfe einer 29G^{1/2} Insulin-Spritze erfolgte anschließend die Implantation der Zellen subkutan in die rechte Flanke der *Nude*-Mäuse. Zweimal wöchentlich wurde das Tumolvolumen mit Hilfe einer digitalen Schieblehre ermittelt:

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

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) von Explora Biolabs (San Diego, USA) oder der Regierung von Unterfranken durchgeführt.

3.4.2 Intravenöse Injektionen

3.4.2.1 Applikation von rekombinanten Vaccinia-Viren

Sobald die Tumore ein durchschnittliches Volumen von 250 mm³ erreicht hatten, erfolgte eine einmalige intravenöse (i.v.) Applikation von 5×10^6 *plaque forming units* (pfu) in 100 μ l PBS des jeweiligen Viruskonstrukts in die laterale Schwanzvene.

Dafür wurde die jeweilige Virus-*Stock*-Lösung zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend dreimal 30 sec sonifiziert, wodurch Virusaggregationen gelöst wurden. Als Vorbereitung für die Injektion wurden die Mäuse für ca. 5 min einer Wärmelampe ausgesetzt. Dies führte zu einer Gefäßerweiterung der Schwanzvene und begünstigte somit die i.v. Injektion.

3.4.2.2 Applikation von Chemotherapeutika

Die i.v. Injektion des Chemotherapeutikums Mitomycin C erfolgte analog der Vaccinia-Viren-Applikation, wobei darauf zu achten war, dass aufgrund der photoinstabilen Eigenschaft von

Mitomycin C die Lichtexposition minimal gehalten wurde. Für die Kombinationstherapie mit onkolytischen Viren wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, 4 Tage nach der Vaccinia-Virus-Injektion, Mitomycin C in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (4 mg/kg Körpergewicht an Tag 1 und 3 mg/kg Körpergewicht an Tag 2) i.v. appliziert. Die Verdünnungen wurden jeweils mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) hergestellt.

3.4.3 Narkose

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Inhalationsnarkose mit Isofluran eingesetzt. Bei Isofluran handelt es sich um ein leichtflüchtiges Anästhetikum mit hypnotischer und muskelrelaxierender Wirkung.

Dafür wurden die Tiere in eine Inhalationskammer gesetzt, wodurch das Narkosemittel in Gasform mit Sauerstoff bei jedem Atemzug inhaliert wurde.

Da Isofluran einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten hat, erfolgt eine rasche Reaktion auf steigende oder sinkende Isofluran-Konzentrationen.

3.4.4 Visualisierung der viralen Replikation mittels Fluoreszenz-*Imaging*

Anhand der Expression des Markergens Ruc-GFP konnte die Tumor-spezifische Replikation von rekombinanten Vaccinia-Viren mittels Fluoreszenz-*Imaging* an lebenden Mäusen verfolgt und quantifiziert werden.

Bevor die Versuchstiere in das Maestro EX *Imaging* System gelegt wurden, musste zunächst eine Narkose mit Isofluran eingeleitet werden, welche über die komplette Messung aufrechterhalten wurde. Die anschließende Fluoreszenz-Detektion erfolgte unter verschiedenen UV-Filtern und die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der dazugehörigen Maestro Software v2.4 ausgewertet. Darstellungsformen sind zum einen *unmixed images*, welche aus der optimalen Belichtungszeit für jede Maus entstanden sind, sowie *compared images* oder auch skalierte GFP-Signale, bei welchen die GFP-Signale unterschiedlicher Gruppen miteinander verglichen und die Bilder gemessen an der stärksten Fluoreszenz dargestellt werden.

3.4.5 Tumor- und Organentnahme

Für weitere Untersuchungen war es notwendig, den Versuchstieren sowohl den Tumor als auch, je nach Aufgabenstellung, andere Organe zu entnehmen. Dafür wurden zu definierten

Zeitpunkten nach der Infektion die Tiere mit Hilfe von CO₂ getötet. Bei der Präparation des Tumors wurde darauf geachtet, dass umgebendes Binde- oder Muskelgewebe, Knochen und Haut möglichst vollständig entfernt wurden, da diese bei der späteren Herstellung von Homogenisaten oder Gewebeschnitten stören. Die Gewinnung von Serumproben erfolgte zunächst durch eine Herzpunktion und einer anschließenden Serum-Separierung mit Hilfe von *Microtainer SST Tubes* (13000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Lagerung der Tumore, Organen oder Serumproben erfolgte bei -80 °C.

3.4.6 Retro-orbitale Blutentnahme

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Zahl wurden Blutproben retro-orbital entnommen. Diese Methode ermöglicht es zum einen, zeitliche Verlaufsuntersuchungen durchzuführen, da von ein und demselben Versuchstier mehrfach Blutproben genommen werden konnten und zum anderen wird bei dieser Methode eine Aktivierung der Thrombozyten durch Scherkräfte, wie sie beispielsweise bei einer Herzpunktion mit einer Spritze entstehen, verhindert.

Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert (3.4.3) und anschließend mit Hilfe einer heparinisierten 20 µl Glaskapillare 50-200 µl Vollblut aus dem retro-orbitalen Plexus entnommen. Für die anschließende Bestimmung der Thrombozyten-Zahl in einem Sysmex KX-21 *automatic micro-cell counter* wurden die Blutproben 1:1 mit ACD-Puffer vermischt, wodurch zum einen die Blutgerinnung unterbunden und zum anderen die Blutzellen stabilisiert wurden.

Das auf diese Weise entnommene Blut konnte ebenfalls für eine Quantifizierung der Hämoglobin-Konzentration eingesetzt werden. Dafür wurde der QuantiChrom™ *Hemoglobin Assay Kit* verwendet und die Konzentrationsbestimmung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4.7 Herstellung von Gewebe-Homogenisaten

Als Vorbereitung für spätere Protein-Expressionsanalysen sowie zur Bestimmung der Viruskonzentration wurden Homogenisate aus Tumoren oder Organen hergestellt. Diese mechanische Zerkleinerung erfolgte für Tumore und größere Organe (z.B. Leber) mit Hilfe eines *GentleMACS-Dissociator* und für kleinere Organe mit einem *FastPrep-Disrupter* unter Verwendung spezieller Reaktionsgefäßen mit Keramik-*Beads*. Als Vorbereitung wurde zunächst das Gewicht des jeweiligen Gewebes ermittelt, grob zerkleinert und anschließend, je nach späterer Verwendung der Lysate, mit dem doppelten Volumen Protein-Lysepuffer oder 1x PBS versetzt. Die Homogenisierung erfolgte im *GentleMACS-Dissociator* mit Hilfe

des RNA.02 Programms sowie im *FastPrep-Disrupter* für dreimal 40 sec. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurden im Anschluss die Reaktionsgefäße bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die so hergestellten Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C eingefroren.

3.5 Immunhistochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Agarose-Gewebeschnitten

Für die immunhistologische Untersuchung von Tumoren oder Schwanzläsionen wurden zunächst mikrometerdünne Gewebeschnitte hergestellt.

Dafür wurden die noch gefrorenen Gewebeproben in 4 % Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4 °C fixiert. Im Falle der Schwanzläsionen wurde der komplette Mausschwanz fixiert und erst anschließend die Läsionen abpräpariert. Dafür war es wichtig, die betroffene Hautstelle vorsichtig mit einem Skalpell vom Knochen zu lösen und die nicht-betroffene Haut, welche die Läsion umgibt, zu entfernen. Im Anschluss wurde das PFA durch einen fünfmaligen Waschschrift von je 15 min mit 1x PBS entfernt, bevor das Gewebe in Agarose eingebettet werden konnte. Hierfür wurde 5 % LMP-Agarose (*Low Melting Point*) eingesetzt, die im Wasserbad geschmolzen und anschließend in 6-Well-Platten gegossen wurde. Das jeweilige Präparat wurde dann mit der Schnittfläche nach unten eingebracht. Von den ausgehärteten Agarose-Blöcken wurden im Anschluss mit Hilfe eines Vibratoms 100 µm-dünne Gewebeschnitte hergestellt und in 48-Well-Platten überführt. Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurde je Well 500 µl 1x PBS in die Platten vorgelegt.

3.5.1.1 Immunfluoreszenzfärbung von Agarose-Gewebeschnitten

Je nach Ziel des Versuchs konnte mit diesen Schnitten eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt werden.

Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst in 48-Well-Platten mit je Well 500 µl Permeabilisierungs-Lösung (1x PBS, 0,2 % Triton-X 100, 5 % FKS) überführt und für 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur belassen. Dadurch wird das Gewebe zum einen durchlässig für den primären Antikörper und zum anderen kommt es durch den Zusatz von FKS zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen. Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper in derselben Lösung 1:100 verdünnt, auf die Schnitte gegeben und das Präparat über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für 10 min mit 1x PBS wurden im Anschluss alle Reste des primären Antikörpers entfernt, bevor

die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 4 h die Färbung vervollständigte. Die sekundären Antikörper wurden in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt und waren in diesem Fall mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Zusätzlich wurden die Schnitte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (1:400) behandelt, wodurch eine spätere Detektion der Zellkerne ermöglicht wurde. Im Anschluss an drei weitere Waschschritte wurden die Gewebeschnitte mit Moviol 4-88 auf Objektträgern eingebettet. Die Auswertung der Schnitte erfolgten mit Hilfe eines Stereo-Fluoreszenzmikroskops (MZ16 FA, Leica, Heerbrugg, Schweiz) ausgestattet mit einer Quecksilber-UV-Quelle und dem Programm Leica IM1000 4.0. Des Weiteren wurden die Immunfluoreszenz-gefärbten Gewebeschnitte mit Hilfe der konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskopie analysiert.

3.5.1.2 Konfokale *Laser-Scanning* Mikroskopie

Die erhaltenen Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop, ausgestattet mit einem Argon/Krypton-Laser, ausgewertet. Ein konfokales Mikroskop ist eine Variante des Fluoreszenzmikroskops, mit dem virtuelle optische Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden können. Dabei werden Fluoreszenzmoleküle angeregt, die sich im Lichtweg eines fokussierten Laserstrahles befinden. Mit Hilfe geeigneter Filterkombinationen konnten die vom Argon/Krypton-Laser emittierten Wellenlängen gesondert justiert werden. Somit konnten simultan GFP-markierte (Anregung bei 488 nm und Detektion zwischen 520 nm), Cy3-markierte (Anregung bei 550nm und Detektion zwischen 570 nm), Cy5-markierte (Anregung bei 635 nm und Detektion 670 nm) und Hoechst-markierte Strukturen (Anregung bei 347 nm und Detektion bei Wellenlängen > 480 nm) visualisiert werden.

Die Rohdaten wurden mit Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet und den empfangenen Lichtsignalen unterschiedliche Falschfarben zugeordnet (FITC *grün*, Cy3 *rot*, Cy5 blau und Hoechst *grau* bzw. blau wenn kein Cy5 vorhanden war).

3.5.2 Semi-Dünnschnitte von Knochenmark-Proben

Zur Analyse der Anzahl sowie der Größe (Polyploidie) von Megakaryozyten im Knochenmark wurden Semi-Dünnschnitte des Femurs hergestellt. Dafür wurde von den jeweiligen Mäusen zunächst der Femur-Knochen frei präpariert und anschließend mit einer Rasierklinge in ca. 0,5 cm-lange Stücke zerteilt. Diese wurden über Nacht bei 4 °C in Karnovsky-Lösung fixiert, bevor der Knochen unter einem Binokular mit Uhrmacher-Pinzetten vorsichtig entfernt wurde. Die so präparierten Knochenmark-Proben wurden im Anschluss dreimal 3 min mit 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7.2) gewaschen, bevor eine weitere Fixierung mit Osmium-

Tetroxid (2 % in 50 mM Cacodylatpuffer) für 2 h bei 4 °C durchgeführt wurde. Nach erneuten Waschschrinen (5 x 5 min) mit destilliertem Wasser (ddH₂O) wurden die Proben über Nacht mit 0,5 % wässrigem Uranylacetat gefärbt. Dies bewirkte eine Kontrastierung des Gewebes. Im Anschluss an eine Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Knochenmark-Proben in Epon 812 eingebettet.

Mit Hilfe eines Ultramikrotoms wurden von den ausgehärteten Epon-Blöcken 200 nm Semi-Dünnschnitte angefertigt, die direkt anschließend mit Methylenblau-Färbelösung gefärbt wurden.

Für die Quantifizierung der Megakaryozyten wurden zunächst Durchlicht-Bilder mit Hilfe eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss, Axiovert 200M) in 20-facher Vergrößerung hergestellt, anhand derer eine Auszählung der Megakaryozyten in einem definierten Ausschnitt von 22 x 20 cm erfolgte.

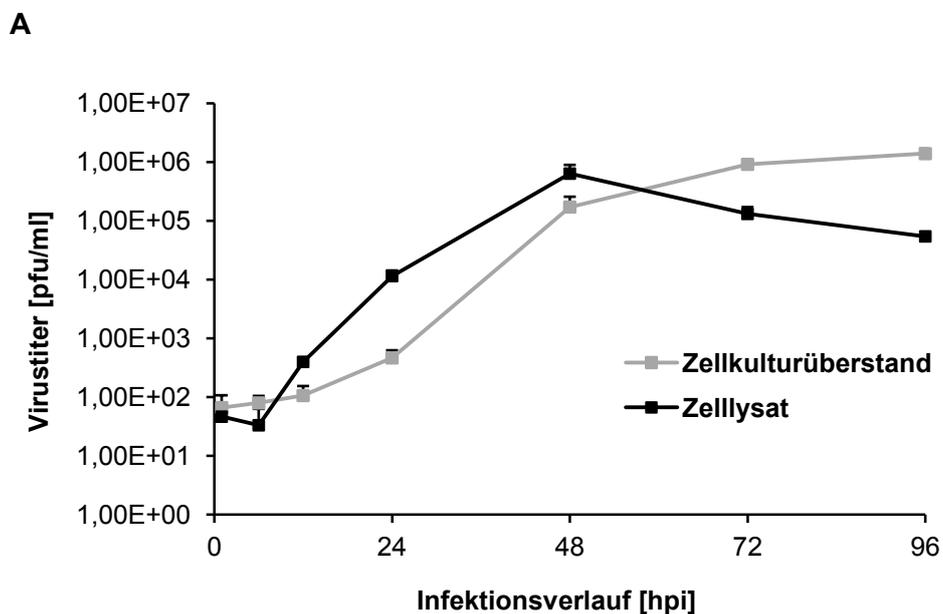
4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus-Konstrukts GLV-1h90 in Zellkultur

4.1.1 Vergleich der viralen Replikation von GLV-1h68 und GLV-1h90

Ein erster wichtiger Aspekt in der Charakterisierung von onkolytischen Viren stellt die Untersuchung des Replikationsverhaltens in Tumorzellen dar. Unterschiede in der Replikation können unter anderem durch die Insertion von Genen, die jeweilige Größe der inserierten Gen-Konstrukte sowie von unterschiedlich starken Promotoren verursacht werden. Diese Veränderungen der viralen Replikation, sowohl in Bezug auf die Effizienz als auch auf die Geschwindigkeit, können in Folge das *Virus-Spreading* sowie die Anzahl der amplifizierten Virus-Partikel beeinflussen. Dies kann sich wiederum in *in vivo* Modellen auf die Tumorregression auswirken.

In diesem Fall wurde untersucht, ob sich durch die Insertion des *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6 in GLV-1h90 Unterschiede in der viralen Replikation im Vergleich zu GLV-1h68 in DU-145-Zellen *in vitro* ergeben. Dafür wurden DU-145-Zellen zunächst mit beiden Virus-Konstrukten mit einer MOI von 0,1 infiziert und anschließend zu den Zeitpunkten 1, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 hpi die Zellkulturüberstände abgenommen sowie Zelllysate der infizierten Zellen hergestellt. Mit Hilfe von Plaque Assays wurden dann die jeweiligen Viruskonzentrationen der gesammelten Proben ermittelt (Abbildung 14).



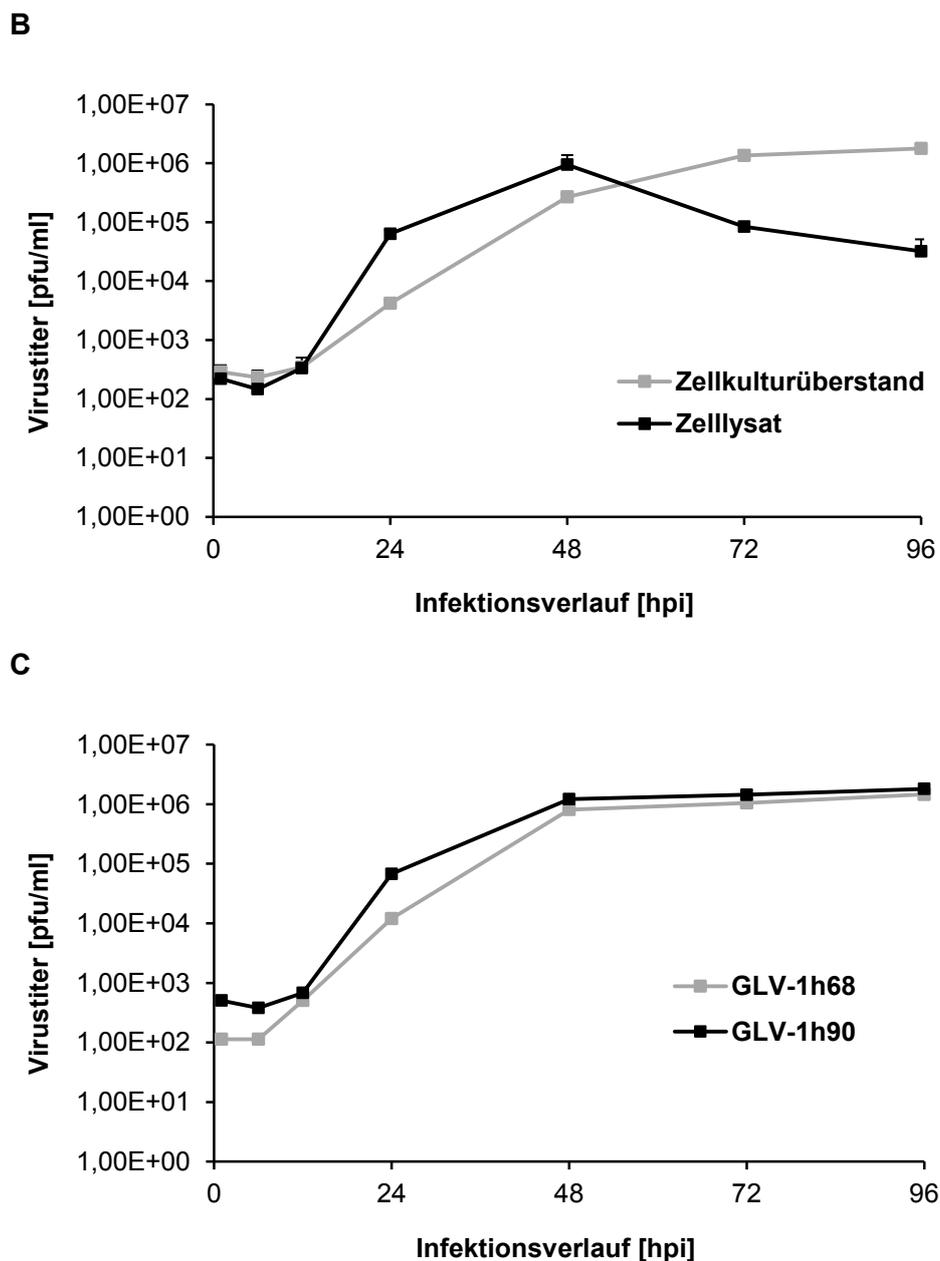


Abbildung 14: Replikationsverhalten von GLV-1h68 und GLV-1h90 in DU-145-Zellen in Zellkultur. Quantifizierung der Virus-Partikel in Zelllysaten und Zellkulturüberständen 1, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Infektion (hpi) von DU-145-Zellen mit GLV-1h68 (A) oder GLV-1h90 (B) mittels *Plaque Assay*. (C) Vergleich der Gesamtzahl der Virus Partikel berechnet aus Zelllysaten und Überständen von GLV-1h68- und GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten (n=3) berechnet.

Anhand des deutlichen Konzentrationsanstiegs der Virus-Partikel während des Infektionsverlaufs war ersichtlich, dass beide Virus-Konstrukte in der Lage waren, sich in der Prostatakarzinom Zelllinie DU-145 zu replizieren. Zwischen 12 und 48 hpi war der Virus-Titer sowohl von GLV-1h68 als auch von GLV-1h90 in den Zellen deutlich höher als in den jeweiligen Zellkulturüberständen. Ab 48 hpi konnte in beiden Fällen ein starker Abfall des Virus-Titers in den Zellen beobachtet werden, da ab diesem Zeitpunkt annähernd jede Zelle

infiziert war, die Replikation langsam eingestellt wurde und die infizierten Zellen schließlich der Zelllyse verfielen (Abbildung 14AB).

Zum direkten Vergleich der Replikation beider Virus-Konstrukte wurde eine andere Darstellung gewählt. Abbildung 14C zeigt jeweils die totalen Virus-Titer in Zelllysaten und Zellkulturüberständen von GLV-1h90- und GLV-1h68-infizierten DU-145-Zellen. Dabei war deutlich zu erkennen, dass beide Virus-Konstrukte ein annähernd identisches Replikationsverhalten aufwiesen, sowohl in Bezug auf den zeitlichen Verlauf als auch auf die produzierte Virusmenge. Bei beiden Viren blieb die Gesamtkonzentration ab 48 Stunden nach der Infektion auf einem konstanten Level, da von diesem Zeitpunkt an alle Zellen infiziert waren. Die Insertion des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 hatte somit keinen negativen Einfluss auf die virale Replikation in DU-145-Zellen in Zellkultur.

4.1.2 Detektion der Markergen-Expression sowie der Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 in Western Blots

In einem weiteren Schritt der Charakterisierung des Vaccinia-Virus GLV-1h90 wurde die Markergen-Expression sowie die Expression von Hyper-IL-6 mit Hilfe von Western Blots auf Proteinebene untersucht (Abbildung 15).

Dafür wurden zunächst DU-145-Zellen sowohl mit GLV-1h90 als auch mit GLV-1h68 (MOI 0.5) infiziert und zu den Zeitpunkten 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 hpi Lysate aus den infizierten Zellen hergestellt. Da es sich bei Hyper-IL-6 um ein Zytokin handelt, das nach der Expression von der Zelle sezerniert wird, wurden zudem die entsprechenden Zellkulturüberstände zu jedem Zeitpunkt gesammelt. In einer anschließenden SDS-PAGE und einer Western Blot-Analyse wurden die Proben auf die Expression der Markergene Ruc-GFP und β -Galaktosidase sowie des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 hin untersucht. Da es sich bei Hyper-IL-6 um ein Fusionsprotein von humanem Interleukin-6 (IL-6) mit dem entsprechenden IL-6-Rezeptor (IL-6-R) handelt, konnte das komplette Fusionsprotein mit einem Antikörper gegen humanes IL-6 detektiert werden.

Jede Membran wurde zusätzlich mit einem β -Aktin-Antikörper inkubiert, da dieses intrazelluläre Protein in jeder Zelle in gleichen Mengen vorhanden ist und deshalb als Lade-Kontrolle eingesetzt werden kann.

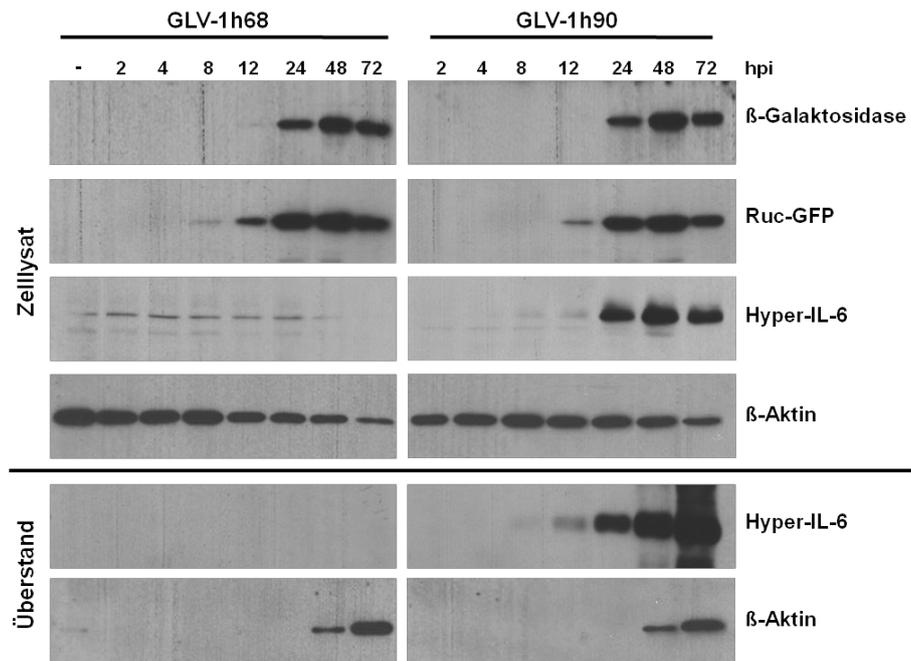


Abbildung 15: Western Blot-Analyse der Markergen- und der Hyper-IL-6-Expression in Zelllysaten sowie Überständen von GLV-1h68- bzw. GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen. 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 hpi nach der Infektion mit GLV-1h68 oder GLV-1h90 wurden Zellkulturüberstände gesammelt und Zelllysate hergestellt. Von jeder Probe wurden 10 µg Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Detektion der Markerproteine Ruc-GFP und β -Galaktosidase (β -Gal) erfolgte jeweils mit einem GFP- (1:500) und einem β -Gal-Antikörper (1:200), die Hyper-IL-6-Detektion mit einem IL-6-Antikörper (1:200). β -Aktin (Antikörperverdünnung 1:10000) diente als interne Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge. Überstand und Zelllysate von uninfizierten DU-145-Zellen (-) wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

Die beginnende Expression des Markergens β -Galaktosidase konnte bei beiden Virus-Konstrukten 12-24 hpi durch die der durchschnittlichen Proteingröße entsprechenden Bande bei ca. 166 kDa in Zelllysate-Proben detektiert werden. Dagegen konnte die Expression des Markergens Ruc-GFP mit einer Bande bei ca. 67 kDa bereits etwas früher, 8-12 hpi, nachgewiesen werden. Aufgrund der fortschreitenden Virus-Amplifikation stiegen die Konzentrationen beider Markerproteine im weiteren Infektionsverlauf leicht an.

Des Weiteren wurde die Hyper-IL-6-Expression im Verlauf der Infektion von DU-145-Zellen mit GLV-1h90 untersucht. Sowohl in Zelllysaten als auch in Überständen konnte bereits 12 Stunden nach der Infektion (12 hpi) ein erstes Signal bei 57 kDa detektiert werden. Erwartungsgemäß befanden sich weitaus größere Mengen des Proteins im Zellkulturüberstand, da Hyper-IL-6 sofort nach der Expression in das umgebende Medium sezerniert wird. Dafür spricht zusätzlich, dass die Menge an Hyper-IL-6 im Zellkulturüberstand während des Infektionsverlaufs kontinuierlich anstieg, wohingegen die Konzentration in den Zellen konstant blieb.

Ab 48 hpi konnte außerdem β -Aktin in den Zellkulturüberständen detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass es von diesem Zeitpunkt an zur Lyse der infizierten Zellen kam,

wodurch das intrazelluläre Protein freigesetzt wurde. Wie zu erwarten war, konnte weder in uninfizierten noch in GLV-1h68-infizierten DU-145-Zellen eine Hyper-IL-6-Expression nachgewiesen werden. Bei den schwach sichtbaren Banden in den Zelllysate-Proben handelt es sich wahrscheinlich um endogen vorhandenes IL-6 oder ein kreuzreagierendes Antigen.

4.1.3 Detektion und Quantifizierung der Hyper-IL-6-Expression mittels Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Eine weitere Methode, das von GLV-1h90 exprimierte Hyper-IL-6 nachzuweisen, ist der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Dieser Assay ermöglicht neben der Detektion auch die Quantifizierung des entsprechenden Proteins.

Wie bei den Western Blot-Analysen wurden hierbei Lysate von GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen sowie deren Überstände 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 hpi untersucht. Als Negativ-Kontrolle wurde der Versuch parallel mit GLV-1h68-infizierten Zellen durchgeführt. Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in den einzelnen Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe des rekombinanten Proteins IL-6 von 31,25 bis 2000 pg/ml eingesetzt.

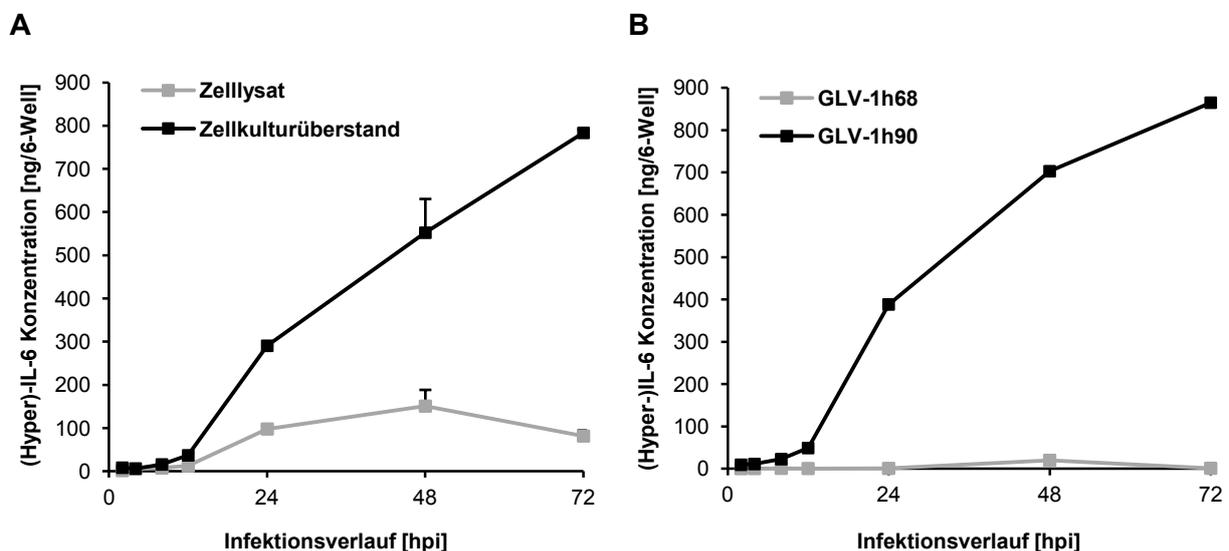


Abbildung 16: Quantifizierung von (Hyper-)IL-6 in Zelllysaten und Überständen von GLV-1h68- oder GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen. 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 72 hpi nach der Infektion mit GLV-1h90 oder GLV-1h68 wurden Zellkulturüberstände gesammelt und Zelllysate hergestellt. Anhand einer IL-6 Standard-Kurve konnte die (Hyper-)IL-6 Konzentration in jeder Probe ermittelt werden. (A) Vergleich der Hyper-IL-6 Konzentration in Zelllysaten und Überständen von GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen. (B) (Hyper-)IL-6 Gesamtkonzentrationen, addiert aus Zelllysaten und Überständen, in GLV-1h68- und GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen. Alle Konzentrationen sind angegeben in ng pro einem Well einer 6-Well-Platte (ng/6-Well).

Abbildung 16A zeigt sowohl die Expression von Hyper-IL-6 in DU-145-Zellen als auch dessen Sekretions-Kinetik in den entsprechenden Zellkulturüberständen nach der Infektion mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h90. Analog zu den Ergebnissen der Western Blot Analysen konnte ein erstes Hyper-IL-6-Signal 12-24 hpi sowohl im Zelllysate als auch im Überstand detektiert werden. Während des kompletten Infektionsverlaufs kam es zu einem drastischen Anstieg der Hyper-IL-6-Menge, wobei diese in den Zellkulturüberständen deutlich über der Konzentration in den Zelllysaten lag und 72 hpi ein Maximum von 783 ng/6-Well erreichte. In den Zelllysaten wurde das Expressions-Maximum dagegen bereits 48 hpi erreicht, welches zu diesem Zeitpunkt 151 ng/6-Well betrug. Die anschließende Reduktion der Hyper-IL-6-Mengen lässt sich auf die Lyse infizierter Zellen zurückführen, wodurch intrazellulär produziertes Hyper-IL-6 in das umgebende Medium gelangte. Dieses freigesetzte Protein wurde demnach gemeinsam mit dem sezernierten Hyper-IL-6 erfasst, wodurch teilweise der in Abbildung 16A zu erkennende weitere Konzentrations-Anstieg ab 48 hpi zu erklären ist.

Erwartungsgemäß konnte ausschließlich nach GLV-1h90 und nicht nach GLV-1h68 Infektion von Zellen eine Hyper-IL-6-Expression detektiert werden. Bei den minimal detektierten Mengen in GLV-1h68-infizierten DU-145-Zellen handelt es sich, wie zuvor in den Western Blot-Analysen, wahrscheinlich um endogen vorhandenes IL-6.

4.2 Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6 in Zellkultur

IL-6 führt über den *JAK/STAT*-Signalweg unter anderem zur Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin-Rest 705 (Tyr705) und zu dessen Translokation in den Zellkern¹³⁰. Um zu überprüfen, ob das von GLV-1h90-kodierte Hyper-IL-6 in Krebszellen dieselbe Signalkaskade in Gang setzt, wurde das Vorhandensein von Phospho-STAT3 sowie dessen Lokalisation im Zellkern untersucht. Dafür wurden zwei Test-Systeme entwickelt. Zum einen die Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Lysaten von Hyper-IL-6-behandelten Zellen durch Western Blot-Analysen und zum anderen die Lokalisation des aktivierten Transkriptionsfaktors mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen in Hyper-IL-6-behandelten Zellen.

4.2.1 Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten mittels Western Blot

Dieses Test-System beruht auf der Stimulierung von Krebszellen mit Hyper-IL-6, welches sich im konditionierten Medium von GLV-1h90-infizierten DU-145-Zellen befindet. Hierbei war es wichtig, 24 Stunden vor der Stimulierung die DU-145-Zellen mit zellspezifischem Medium zu versetzen, welches nur 1 % FKS enthielt (Mangelmedium). Dieses „Aushungern“ der Zellen führte zu einer verringerten natürlichen Phosphorylierung von STAT3 in den Zellen. Daraufhin wurden die Zellen mit konditioniertem Medium von GLV-1h90-, GLV-1h68- und uninfizierten DU-145-Zellen sowie mit der Positiv-Kontrolle Onkostatin M (OSM) und der Negativ-Kontrolle (konditioniertes Medium von GLV1h90-infizierten Zellen versetzt mit rekombinantem humanen gp130/Fc Chimera) behandelt. Aus dem konditionierten Medium wurden durch Sterilfiltration (Porengröße des Filters 0,1 µm) die im Medium vorhandenen Virus-Partikel entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden Zelllysate aus den behandelten Zellen hergestellt und mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert.

Von allen Proben wurden zwei Gele und somit zwei Western Blots angefertigt, um die Proben sowohl bezüglich des Vorhandenseins von STAT3 als auch von Phospho-STAT3 zu untersuchen (Abbildung 17).

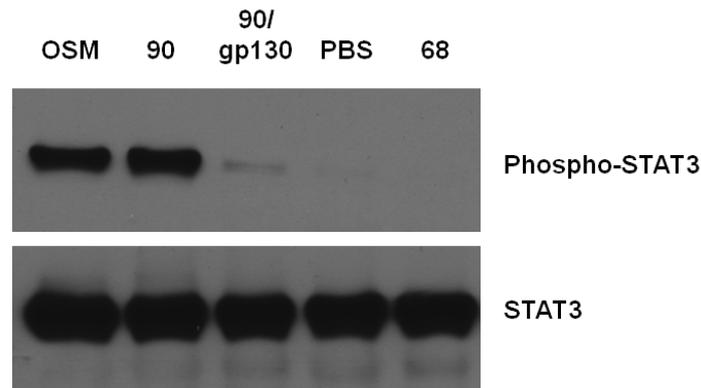


Abbildung 17: Detektion von STAT3 und Phospho-STAT3 in Zelllysaten von aktivierten DU-145-Zellen. Von den mit unterschiedlich konditionierten Medien behandelten DU-145-Zellen wurden Zelllysate (250 μ l RIPA-Puffer) hergestellt und mit 100 μ l 5x SDS-Probenpuffer je Ansatz bei 95 $^{\circ}$ C für 5 min inkubiert. Von den denaturierten Proben wurden jeweils 20 μ l auf zwei 10%ige SDS-Gele aufgetragen, wobei in einem anschließenden Western Blot eine Membran mit einem STAT3-Antikörper (1:1000) und der andere mit einem Phospho-STAT3-Antikörper (1:1000) inkubiert wurde. OSM Onkostatine M, 90 GLV-1h90, 68 GLV-1h68.

Abbildung 17 zeigt die Western Blot-Analyse von DU-145-Zellen, behandelt mit den konditionierten Medien von uninfizierten, GLV-1h68- und GLV-1h90-infizierten Zellen sowie mit der Negativ-Kontrolle gp130/Fc und der Positiv-Kontrolle Onkostatine M. Der Transkriptionsfaktor STAT3 (88 kDa) konnte in allen Ansätzen detektiert werden, da dieses Protein unabhängig von Stimulierungs-Signalen in jeder Zelle in annähernd gleichen Konzentrationen exprimiert wird. Aus diesem Grund konnte STAT3 außerdem als Kontrolle dafür eingesetzt werden, ob jeweils gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen wurden. Im Gegensatz dazu konnte der aktivierte Transkriptionsfaktor Phospho-STAT3 nur in den Zellen detektiert werden, welche mit Onkostatine M oder dem Hyper-IL-6-haltigen Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen behandelt wurden. Dies zeigt, dass das von GLV-1h90-exprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 *in vitro* die *JAK/STAT*-Signalkaskade in Gang setzte und demnach funktionell aktiv war.

4.2.2 Lokalisation von STAT3 und Phospho-STAT3 in Tumorzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung war es möglich STAT3 bzw. Phospho-STAT3 in Hyper-IL-6-stimulierten Zellen nicht nur zu detektieren, sondern darüber hinaus auch die Lokalisation dieser Proteine in der Zelle aufzuklären.

Hierfür wurden DU-145-Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die Behandlung mit den konditionierten Medien, sowie Positiv- und Negativ-Kontrolle erfolgte analog zu 4.2.1.

Im Anschluss wurden die Zellen immunhistologisch auf das Vorhandensein von STAT3- bzw. Phospho-STAT3 hin analysiert. Zusätzlich wurden die stimulierten Zellen zur Darstellung der Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (Hoechst) behandelt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung wurde an einem Axiovert 200M Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt.

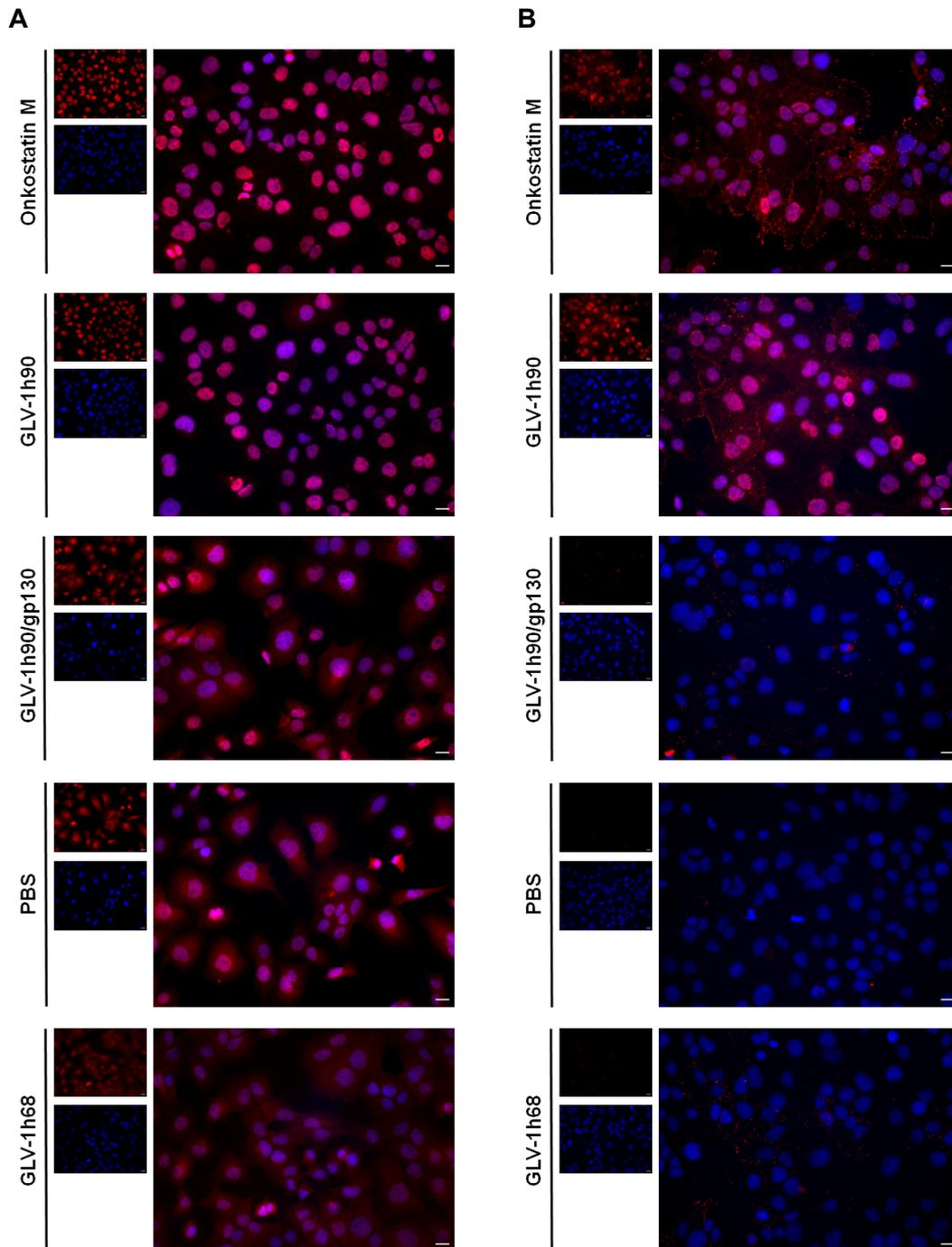


Abbildung 18: Lokalisation von STAT3 und Phospho-STAT3 in aktivierten DU-145-Zellen mittels Fluoreszenz-Färbung.

Die mit unterschiedlichen konditionierten Medium stimulierten DU-145-Zellen wurden fixiert, mit den primären Antikörpern gegen STAT3 (1:100) (A) oder Phospho-STAT3 (1:100) (B) behandelt und anschließend mit einem Cy3-konjugierten (rot) sekundären Antikörper (1:200) detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400; blau) angefärbt. Die Größenbalken repräsentieren 8,6 µm.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 kommt natürlicherweise in jeder Zelle vor und ist in der ganzen Zelle sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma verteilt⁵⁹. Erst durch eine Stimulation, wie beispielsweise durch Hyper-IL-6, werden STAT3-Proteine phosphoryliert und in den Zellkern transportiert. Diese Translokation von phosphorylierten STAT3-Proteinen ist in Abbildung 18A deutlich zu erkennen, allerdings nur in Zellen, welche mit Onkostatin M und dem Hyper-IL-6-haltigen Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen behandelt wurden. Die Tatsache, dass der STAT3-Antikörper nicht nur unphosphorylierte STAT3-Faktoren, sondern auch die phosphorylierte Form erkennen kann, ermöglichte in diesem Versuch die Visualisierung der Translokation.

Die Immunfluoreszenz-Färbung von Phospho-STAT3 in DU-145-Zellen, welche mit den unterschiedlich konditionierten Medien behandelt wurden, ist in Abbildung 18B dargestellt. Der Phospho-STAT3 Antikörper erkennt ausschließlich die Phosphorylierung an Aminosäure Tyr705 von STAT3 und ist somit hoch spezifisch. Erwartungsgemäß konnten in Zellen, welche mit Onkostatin M und Hyper-IL-6-haltigem Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen behandelt wurden, phosphorylierte STAT3-Proteine im Zellkern detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren in DU-145-Zellen, die mit den konditionierten Medien von uninfizierten und GLV-1h68-infizierten Zellen sowie mit der Negativ-Kontrolle gp130/Fc behandelt wurden, keine Phospho-STAT3-Proteine nachweisbar.

Diese Ergebnisse bestätigten die Western Blot-Daten (Abbildung 17), wobei es ausschließlich in DU-145-Zellen, welche mit Hyper-IL-6-haltigem Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen sowie mit der Positiv-Kontrolle Onkostatin M behandelt wurden, zu einer Phosphorylierung von STAT3 kam. Diese Aktivierung der *JAK/STAT*-Signalkaskade belegt die funktionelle Aktivität des GLV-1h90-exprimierten *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6.

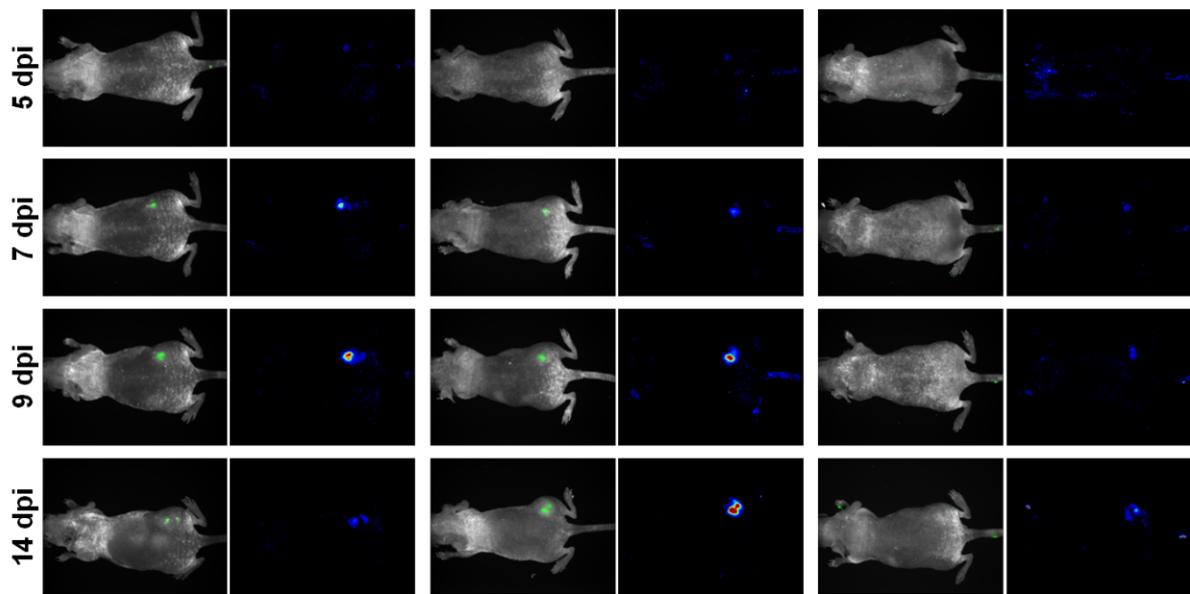
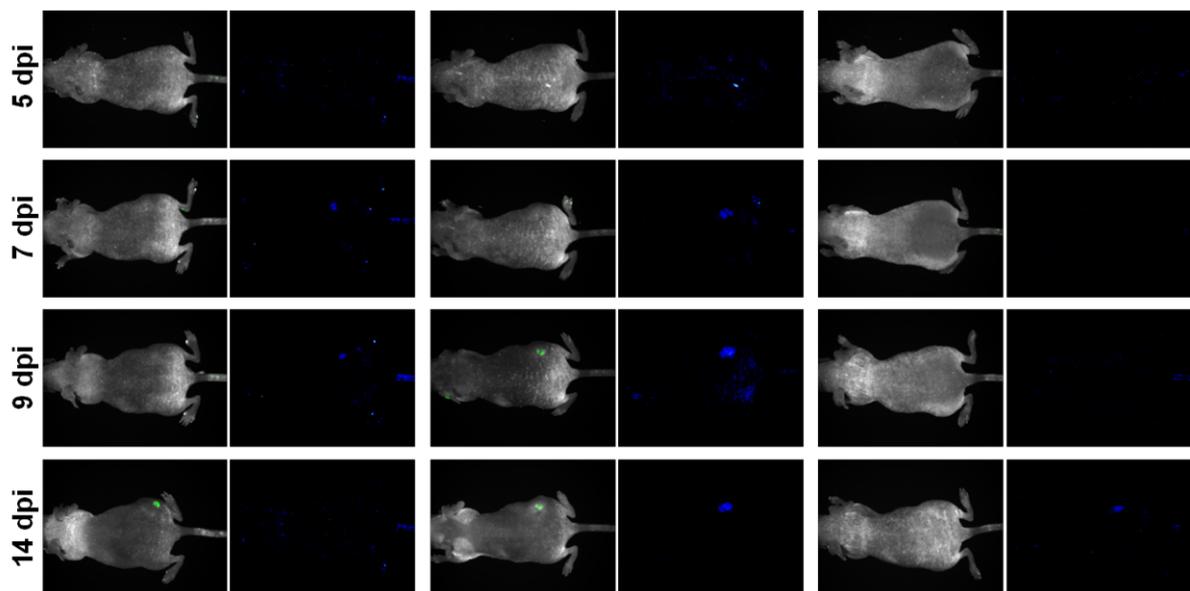
4.3 Charakterisierung des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus-Konstrukts GLV-1h90 in einem DU-145 Xenograft Maus Modell

4.3.1 Replikation von GLV-1h68 und GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach i.v. Injektion

Ein erster wichtiger Schritt in der Charakterisierung von onkolytischen Viren *in vivo* ist die Untersuchung der viralen Replikation. Grundvoraussetzung für eine gezielte Krebstherapie mit onkolytischen Viren ist eine hohe Tumorspezifität der Viren, wodurch nicht nur eine effiziente Tumor Bekämpfung sondern auch eine Verringerung der Nebenwirkungen erzielt werden kann. Während zu Beginn der Forschung mit onkolytischen Viren diese Tumorspezifität nicht vollständig erreicht werden konnte, zielt die heutige Forschung immer mehr darauf ab die onkolytische Virus-Therapy noch zielgerichteter und effektiver zu gestalten¹³¹. Bei dem rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h68 handelt es sich um einen in dieser Weise optimierten onkolytischen Virus, dessen tumorspezifische Replikation bereits für eine Reihe von Tumor-Modellen gezeigt werden konnte^{126,132-135}. Die Amplifikation der Viren im Tumor stellt darüber hinaus die Grundvoraussetzung dafür dar, dass rekombinant in das Virus-Genom integrierte Proteine, wie z.B. Hyper-IL-6 in großen Mengen produziert werden können, welche nur dann im Organismus ihre Wirkung entfalten können. In den folgenden Experimenten wurde das Replikationsverhalten von GLV-1h90 und GLV-1h68 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen untersucht und analysiert, ob und in welchem Maße sich Unterschiede durch das rekombinant integrierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 ergeben.

4.3.1.1 Detektion der viralen Replikation in Tumoren mittels Fluoreszenz-*Imaging*

Eine Möglichkeit, die virale Replikation *in vivo* über einen gewissen Zeitraum *live* zu verfolgen, stellt das Fluoreszenz-*Imaging* dar. Dabei dient die Virus-vermittelte Expression des Markergens Ruc-GFP als Indikator für die Menge der amplifizierten Virus-Partikel. Für die Untersuchung wurden DU-145-Tumor-tragende *Nude*-Mäuse i.v. mit 5×10^6 pfu GLV-1h90 oder GLV-1h68 injiziert und die virale Replikation 5, 7, 9 und 14 Tage nach der Injektion (dpi) mit Hilfe eines Maestro EX *Imaging* Systems verfolgt und quantifiziert.

A**B**

C

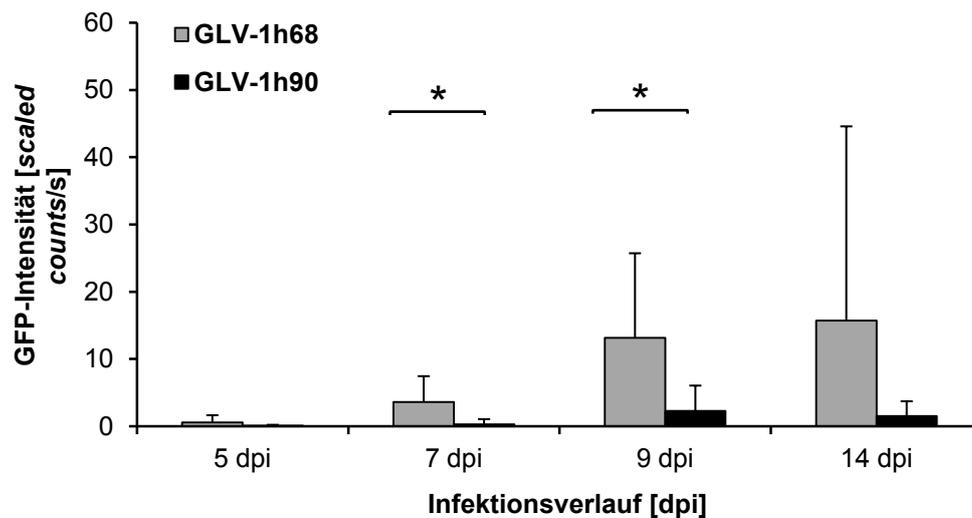


Abbildung 19: Detektion des Infektionsverlaufs von GLV-1h68 und GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen mittels Fluoreszenz-Imaging. DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden i.v. mit GLV-1h68 (A) bzw. GLV-1h90 (B) injiziert. Zu den Zeitpunkten 5, 7, 9 und 12 dpi wurde die virale Replikation anhand der GFP-Expression dokumentiert. Dargestellt sind jeweils die *unmixed images* (links), sowie die skalierten GFP-Signale (rechts). (C) Intensität der GFP-Fluoreszenz in Tumoren von GLV-1h68- oder GLV-1h90-injizierten Mäusen. Dargestellt ist die durchschnittliche Signalstärke in *scaled counts/s* mit entsprechenden Standardabweichungen (n=4). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$.

Bereits 7 Tage nach der Injektion (7 dpi) von GLV-1h68 und ebenso GLV-1h90 konnte eine beginnende GFP-Expression im Tumor detektiert werden (Abbildung 19AB). Im weiteren Infektionsverlauf nahm die GFP-Expression bei GLV-1h68-injizierten Mäusen stark zu, während GLV-1h90-injizierte Mäuse ein konstantes GFP-Signal aufwiesen. Dasselbe Ergebnis lieferte die Auswertung der GFP-Signalintensität (Abbildung 19C) bezogen auf den kompletten Tumor. Die Intensität des im Tumor lokalisierten GFP-Signals in GLV-1h68-injizierten Mäusen stieg während des Infektionsverlaufes stetig an während die GFP-Intensität in GLV-1h90-injizierten Mäusen über den kompletten Zeitraum konstant blieb und 7 und 9 dpi signifikant unter dem Level der GLV-1h68-Gruppe lag.

4.3.1.2 Bestimmung der Virustiter in Tumoren von GLV-1h68- und GLV-1h90-injizierten Mäusen mit Hilfe von *Plaque Assays*

Eine genauere Methode, um den Verlauf der Virus-Replikation in Tumorgewebe zu verfolgen, ist die Bestimmung der Virus-Konzentration mit Hilfe von *Plaque Assays*. Hierfür wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder GLV-1h90 injiziert. Zu den Zeitpunkten 2, 5, 9 und 14 dpi wurde der Tumor entnommen und Gewebe-Homogenisate hergestellt, in welchen anschließend die Konzentration der Virus-Partikel mit Hilfe von *Plaque Assays* bestimmt wurde.

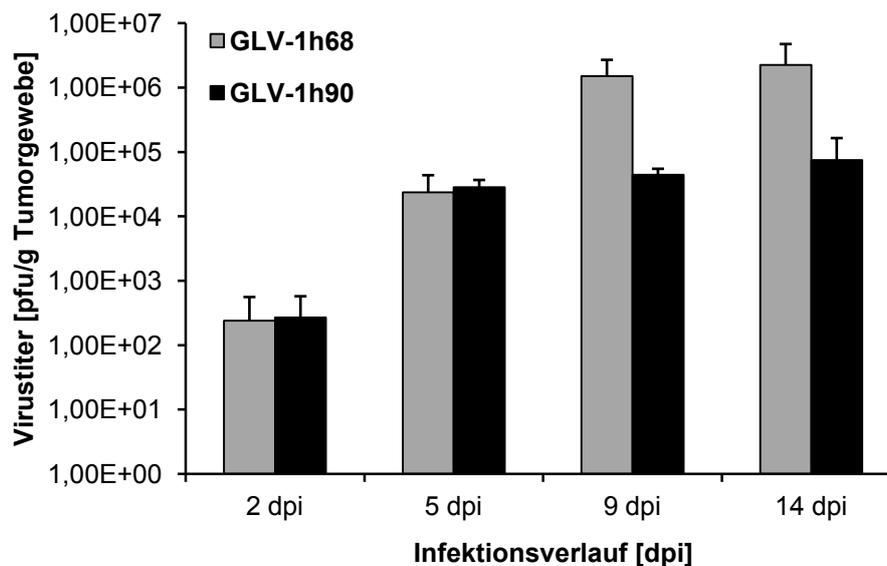


Abbildung 20: Virustiter in Tumoren nach i.v. Injektion von GLV-1h68 oder GLV-1h90. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde 2, 5, 9 und 14 Tage nach Injektion von GLV-1h68 oder GLV-1h90 der Tumor entnommen und dieser homogenisiert. Virustiter wurden mittels *Plaque Assay* bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Konzentration viraler Plaque formender Einheiten pro Gramm Tumorgewebe (pfu/g Tumorgewebe) mit entsprechender Standardabweichung (n=4) in logarithmischer Skalierung.

Anhand der Bestimmung der Virustiter mittels *Plaque Assay* (Abbildung 20) konnte gezeigt werden, dass bereits zwei Tage nach der Virus-Injektion (2 dpi), ohne Unterschied zwischen den Konstrukten GLV-1h68 und GLV-1h90, Virus-Konzentrationen im Bereich von 3×10^2 pfu/g im Tumor detektiert werden konnten. Über den weiteren Infektionsverlauf stiegen die Virustiter in GLV-1h68-injizierten Mäusen drastisch an und erreichten 14 dpi ein Maximum mit Konzentrationen im Bereich $2,5 \times 10^6$ pfu/g Tumorgewebe. Auch die GLV-1h90-Virustiter stiegen im Infektionsverlauf an, allerdings nicht in dem Maße wie die Titer von GLV-1h68. Während 5 dpi die Virustiter beider Konstrukte mit durchschnittlich $2,5 \times 10^4$ pfu/g noch auf dem selben Level lagen, erreichten die Konzentrationen in Tumoren von GLV-1h90-injizierten Mäusen zum Zeitpunkt 14 dpi nur Bereiche von $7,5 \times 10^4$ pfu/g Tumorgewebe. Allerdings erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz, da die intratumoralen Virustiter der Mäuse einer Gruppe (n=4) zu divergent waren.

4.3.1.3 Bestimmung der Virustiter in Organen von GLV-1h68- oder GLV-1h90-injizierten Mäusen mit Hilfe von *Plaque Assays*

Trotz enormer Optimierung ist die Replikation von onkolytischen Viren noch immer nicht ausschließlich auf den Tumor beschränkt. Im Verhältnis zu Wildtypstämmen, wie beispielsweise dem LVP-Stamm, welcher sich nach systemischer Applikation neben dem Tumor auch in Organen wie Leber, Milz und Lunge festsetzt¹²⁶, stellen attenuierte Vaccinia-

Viren wie GLV-1h68 bereits eine große Verbesserung dar. Zur Untersuchung der Tumorspezifität von GLV-1h90 im Vergleich zu GLV-1h68 wurden den Mäusen aus 4.3.1.2 zusätzlich zu dem Tumor auch die Leber und die Lunge entnommen und homogenisiert. Auch hier erfolgte die anschließende Bestimmung der Virus-Konzentration mit Hilfe von *Plaque Assays*.

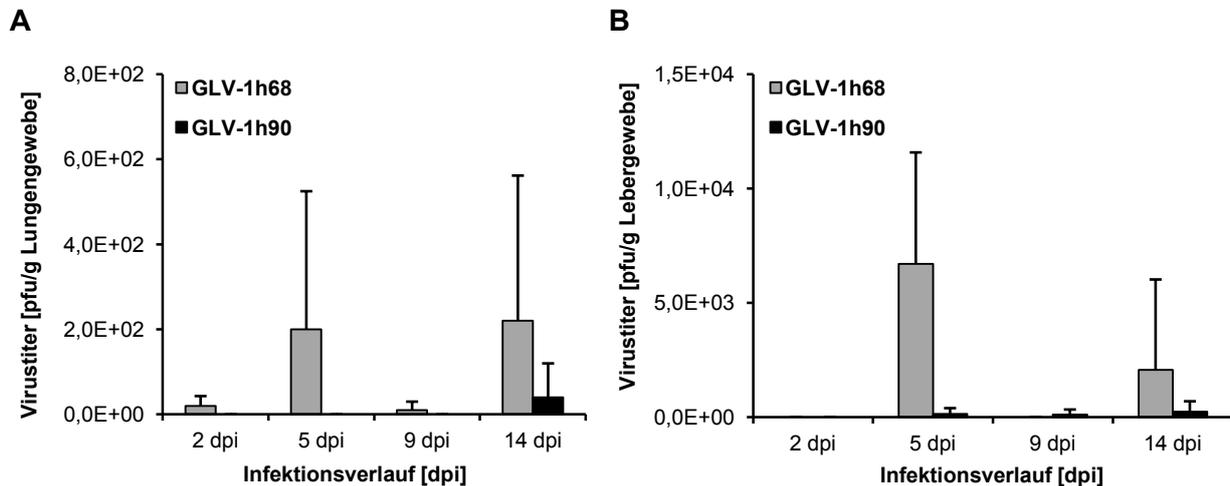


Abbildung 21: Virustiter in Lungen- (A) und Lebergewebe (B) aus Tumor-tragenden Mäusen nach i.v. Injektion von GLV-1h68 oder GLV-1h90. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde 2, 5, 9 und 14 Tage nach Injektion von GLV-1h68 oder GLV-1h90 sowohl die Lunge (A) als auch die Leber (B) entnommen und homogenisiert. Virustiter wurden mittels *Plaque Assay* bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Konzentration viraler Partikel pro Gramm Gewebe mit entsprechender Standardabweichung (n=4) in logarithmischer Skalierung.

In den Lungen von GLV-1h68-injizierten Mäusen konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine geringe Konzentration viraler Partikel detektiert werden, welche sich hier in einem Bereich von 10-220 infektiösen Partikeln pro Gramm Lungengewebe (pfu/g Lungengewebe) befanden. Im Gegensatz dazu konnten bei der Analyse der Lungen von GLV-1h90-injizierten Mäusen ausschließlich 14 dpi virale Partikel detektiert werden, wobei auch hier die Konzentration mit 40 pfu/g Lungengewebe deutlich unter den Werten der GLV-1h68 Gruppe lag (Abbildung 21A).

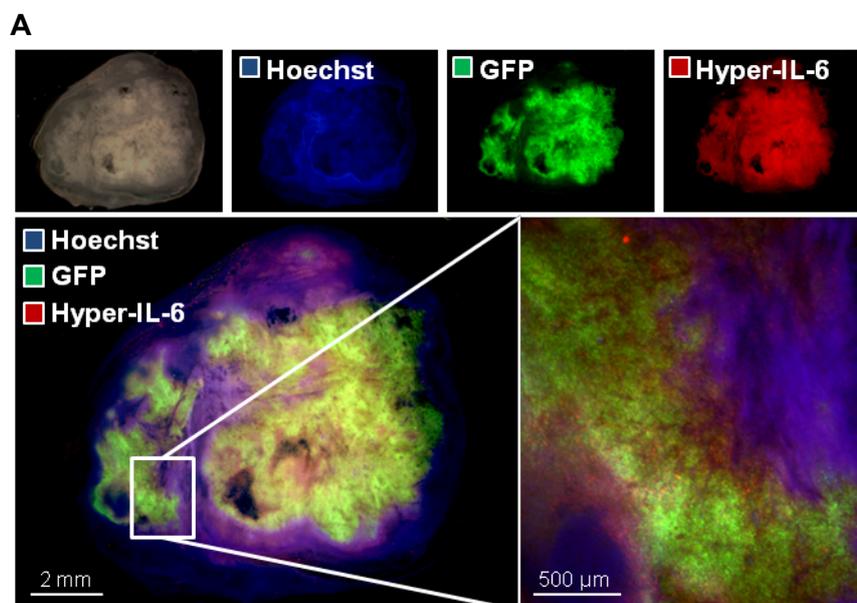
Bei der Untersuchung der Lebern auf infektiöse Partikel war zu beobachten, dass auch hier die Konzentrationen in den GLV-1h68-injizierten Mäusen deutlich höher lagen als in GLV-1h90-injizierten Mäusen, obwohl nur an Tag 5 und 14 dpi GLV-1h68-Partikel detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten in GLV-1h90-injizierten Mäusen zu den Zeitpunkten 5, 9 und 14 dpi Virus Partikel nachgewiesen werden, wobei sich die jeweiligen Konzentrationen mit 130-230 pfu/g Lebergewebe auf ein Minimum beschränkten (Abbildung 21B).

4.3.2 Expression von Hyper-IL-6 in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach i.v. Injektion von GLV-1h90

Basierend auf der Beobachtung, dass sowohl GLV-1h68 als auch GLV-1h90 spezifisch im Tumorgewebe replizieren, wurde im Folgenden näher untersucht, ob es durch diese virale Amplifikation zur Expression des integrierten *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6 kam. Die funktionelle Expression des rekombinanten Hyper-IL-6 bildet die Grundvoraussetzung, um therapeutische Effekte sowohl auf den Tumor als auch systemisch auf den Organismus zu erzielen.

4.3.2.1 Immunhistologische Detektion der Hyper-IL-6-Expression in GLV-1h90-infizierten Tumoren

Eine Möglichkeit die Expression von Proteinen nachzuweisen, ist die immunhistologische Detektion in Tumorschnitten. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das gesuchte Protein gleichzeitig im dreidimensionalen heterogenen Tumorgewebe lokalisiert werden kann. Hierfür wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, sowie als Kontrolle mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS injiziert. Elf Tage nach der Virus-Injektion (11 dpi) wurden die Tumore entnommen und 100 μm dünne Agarose-Schnitte angefertigt. Diese wurden im Anschluss mit einem IL-6-spezifischen primären Antikörper (1:100) behandelt, welcher mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (1:200) detektiert wurde. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Schnitte zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (1:400) behandelt. Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop.



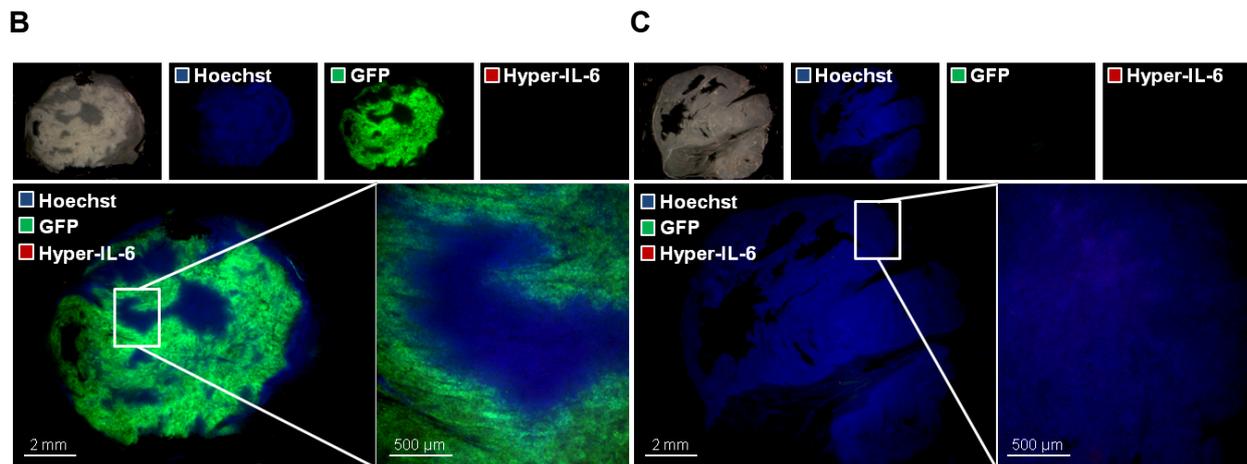


Abbildung 22: Immunhistologische Detektion der Hyper-IL-6-Expression in DU-145-Tumoren 11 dpi. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde 11 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90 (A), GLV-1h68 (B) oder PBS (C) der Tumor entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. In diesen Schnitten wurde Hyper-IL-6 mit einem IL-6-spezifischen primären Antikörper sowie mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (rot) detektiert. Vaccinia-Viren konnten anhand des GFP-Signals (grün) nachgewiesen werden. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (blau) visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Ausschließlich in GLV-1h90-infizierten Tumorschnitten (Abbildung 22A) konnte eine Expression von (Hyper-)IL-6 detektiert werden. Die Lokalisation des *Designer*-Zytokins überlagerte sich direkt mit Infektionsbereichen des Virus, welche durch die Expression des grün-fluoreszierenden Markergens Ruc-GFP identifiziert werden konnten. Weder die Gewebeschnitte GLV-1h68-infizierter (B) noch uninfizierter (C) DU-145-Tumore zeigten eine Expression von IL-6 oder Hyper-IL-6.

4.3.2.2 Quantifizierung des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 in Tumoren und Blutseren von GLV-1h90-injizierten Mäusen mittels ELISA

Um die Hyper-IL-6-Expression im Tumor näher zu untersuchen, wurde ein ELISA durchgeführt. Damit war es möglich das intratumoral-produzierte *Designer*-Zytokin zu quantifizieren und somit die Expressions-Kinetik zu verfolgen. Hierfür wurden DU-145-Tumor-tragenden Mäusen 5×10^6 pfu GLV-1h90 sowie als Kontrolle GLV-1h68 oder PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert. Zur Untersuchung der Hyper-IL-6-Expression im Infektionsverlauf wurden 2, 5, 9 und 14 dpi Tumore (n=4) entnommen und homogenisiert. Mit Hilfe eines ELISAs konnte die jeweilige (Hyper-)IL-6 Konzentration in den Tumorproben bestimmt werden (Abbildung 23).

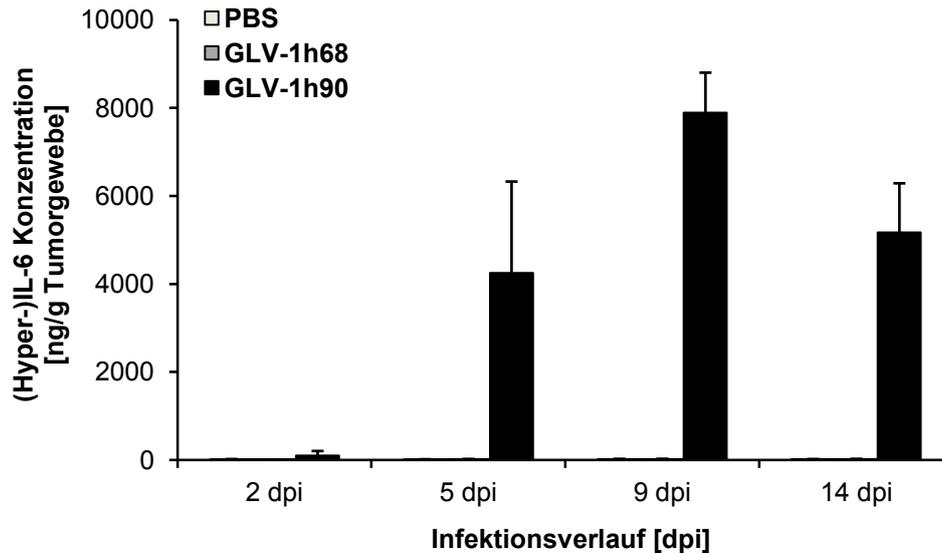


Abbildung 23: (Hyper-)IL-6 Konzentration in DU-145-Tumoren nach intravenöser Virus-Injektion. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurden 2, 5, 9, und 14 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS der Tumor entnommen und homogenisiert. In einem ELISA-Assay wurden die Hyper-IL-6 Konzentrationen jeder Proben (Duplikate) anhand einer IL-6-Standard-Verdünnungsreihe bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche intratumorale (Hyper-)IL-6 Konzentration in ng pro Gramm Tumorgewebe (ng/g Tumorgewebe) mit Standardabweichung (n=4).

Bereits 2 Tage nach der Injektion (2 dpi) von GLV-1h90 konnte eine beginnende Hyper-IL-6-Expression detektiert werden, welche zu diesem Zeitpunkt zu einer Konzentration von 105 ng/g Tumorgewebe führte. Während des weiteren Infektionsverlaufes stiegen die intratumoralen Hyper-IL-6 Konzentrationen drastisch an und erreichten 9 dpi ein Maximum mit Werten um 7900 ng/g Tumorgewebe. Nach diesem Zeitpunkt allerdings reduzierten sich die Werte wieder und waren 14 dpi bei durchschnittlich 5200 ng/g Tumorgewebe. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits der Großteil des Tumorgewebes infiziert war und es zur Onkolyse der infizierten Tumorzellen kam.

Weder in Tumoren von GLV-1h68- noch PBS-injizierten Mäusen konnte eine erhöhte (Hyper-)IL-6-Expression detektiert werden. Alle gemessenen Werte lagen zwischen 12-25 ng/g Tumorgewebe, wobei es sich hierbei vermutlich um endogen vorkommendes IL-6 handelte.

Neben der intratumoral vorherrschenden Hyper-IL-6-Expression wurde die Sekretion des *Designer-Zytokins* von infizierten Tumorzellen untersucht. Dieser Vorgang ist von großer Bedeutung, da Hyper-IL-6 erst nach dessen aktiver Sekretion in der Lage ist, an den kognaten Rezeptor gp130 zu binden und auf diesem Weg seine funktionelle Aktivität auszuüben. Darüber hinaus bildet der Transport in die Blutbahn die Voraussetzung für systemisch-vermittelte Hyper-IL-6-Effekte. Dafür wurden den DU-145-Tumor-tragenden Mäusen 2, 5, 9 und 14 dpi nach der Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS zusätzlich zu dem Tumor auch Blutproben aus dem Herzen entnommen. Mit Hilfe von

Microtainer Tubes wurde das Serum abgetrennt, von welchem im Anschluss mit Hilfe eines ELISAs die (Hyper-)IL-6-Mengen bestimmt wurden.

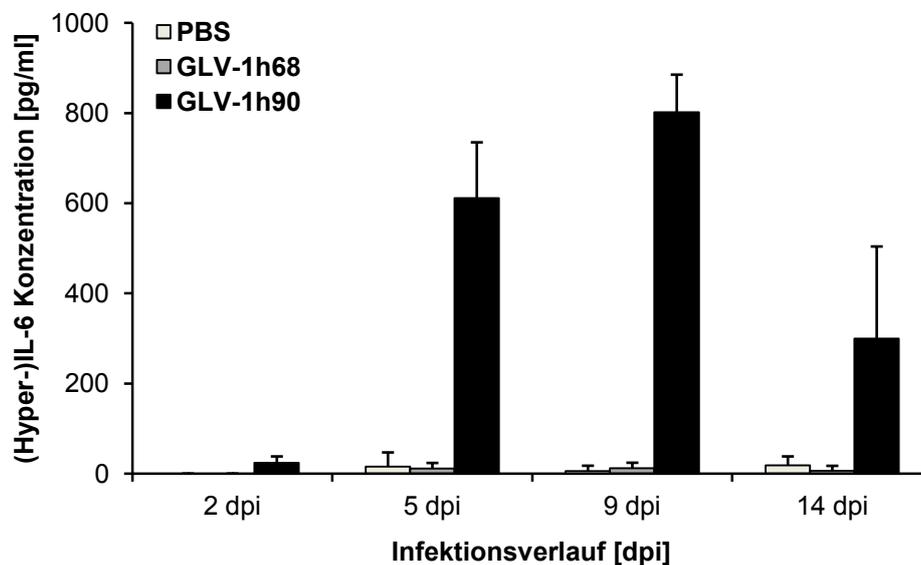


Abbildung 24: Hyper-IL-6-Mengen in Blutseren von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Virus-Injektion. Von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurden 2, 5, 9 und 14 Tage nach Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS Blutproben aus dem Herz entnommen. Die (Hyper-)IL-6-Mengen der Blutseren wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt ist die durchschnittliche Konzentration in pg/ml mit Standardabweichung (n=4).

Die Kinetik der Hyper-IL-6 Sekretion während des Infektionsverlaufs (Abbildung 24) verhielt sich analog zu der Kinetik der intratumoralen Expression des *Designer-Zytokins* (Abbildung 23). Bereits 2 dpi konnten geringe Mengen Hyper-IL-6 (24 pg/ml) im Blutserum von GLV-1h90-injizierten Mäusen detektiert werden. Im weiteren Infektionsverlauf kam es zu einem starken Anstieg der Hyper-IL-6-Menge, welche 9 dpi ihr Maximum mit 802 pg/ml erreichte, bevor sie 14 dpi wieder bis auf durchschnittlich 300 pg/ml abfiel.

In Serumproben von GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen konnten, genau wie in den Tumorlysaten, konstant geringe Mengen (Hyper-)IL-6 nachgewiesen werden, welche sich im Bereich von 5-18 pg/ml befanden.

4.3.3 Effekte des GLV-1h90-exprimierten Hyper-IL-6 auf die Tumorregression des humanen Prostatakarzinoms DU-145

Bei IL-6 handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin mit multifunktionellen Eigenschaften, welche sämtliche Organe eines Organismus betreffen können¹³⁶. Darüber hinaus werden Interleukin-6 von vielen Gruppen sowohl Tumor-fördernde¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ als auch Tumor-inhibierende^{108,110} Wirkungen zugeschrieben, wobei Tumor-inhibierende Effekte oft in

Zusammenhang mit dem löslichen IL-6-Rezeptor (IL-6-R) gesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass GLV-1h90 das Gen für das *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 trägt, nämlich das Fusionsprotein aus humanem IL-6 und seinem IL-6-R, wurde hier untersucht, ob sich durch die Überexpression dieses Proteins im Tumor zusätzlich zu den onkolytischen Eigenschaften des Vaccinia-Virus anti-Tumor-Effekte ergeben. Dafür wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse mit 5×10^6 pfu GLV-1h90 sowie als Kontrolle mit GLV-1h68 oder PBS intravenös injiziert. Über einen Zeitraum von 31 Tagen wurde zweimal wöchentlich der Tumor mit einer digitalen Schiebelehre gemessen und das Tumolvolumen berechnet.

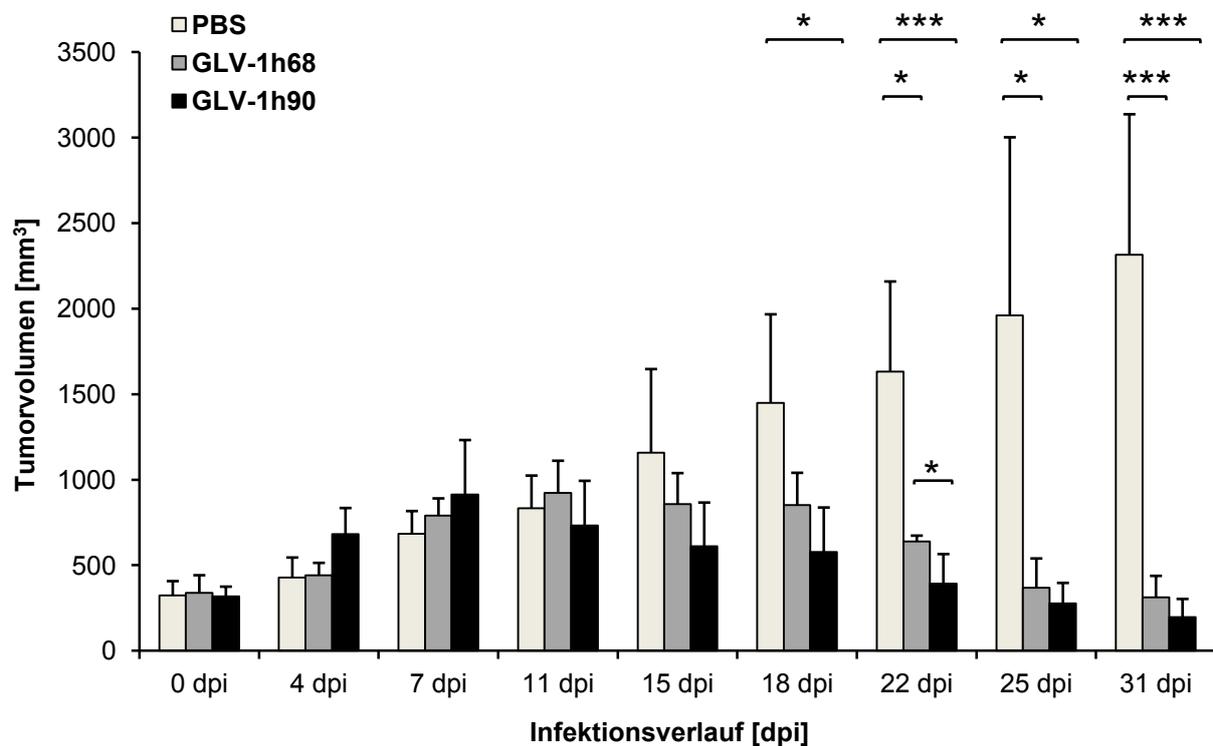


Abbildung 25: DU-145-Tumorprogression nach intravenöser Virus-Injektion. DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 oder mit PBS injiziert. Über einen Infektionsverlauf von 31 Tagen wurde das Tumolvolumen zweimal wöchentlich bestimmt ($0,52 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$). Dargestellt ist das durchschnittliche Tumolvolumen in mm^3 mit entsprechender Standardabweichung ($n=5$). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

Nach systemischer Applikation beider Virus-Konstrukte in DU-145-Tumor-tragende Mäuse kam es zunächst ab 4 dpi zu einem „Anschwellen“ des Tumors. Dieses Phänomen wurde 2007 von Zhang et al.¹²⁶ als „*Growth Phase*“ beschrieben, welche möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass eine akute Immunantwort im Tumor gegen die eindringenden Virus-Partikel zu einem enormen Einströmen von Immunzellen in den Tumor führt. Zwischen 11 und 18 dpi konnte eine Plateau-Phase beobachtet werden, auch „*Inhibitory Phase*“ genannt, in der das Tumorstadium der Virus-injizierten Mäuse langsam stagnierte. Eine

erste Tumorregression konnte 18 dpi bei GLV-1h90-injizierten Mäusen im Vergleich zu PBS-injizierten beobachtet werden. Ab 22 dpi konnten dann mit beiden Virus-Konstrukten signifikante Tumorregressionen verzeichnet werden („*Regression Phase*“). Bei vergleichender Betrachtung beider Virus-Konstrukte konnte bei GLV-1h90-injizierten Mäusen eine tendenziell beschleunigte Tumorroingerung beobachtet werden, wobei ausschließlich zu dem Zeitpunkt 22 dpi eine statistische Signifikanz vorlag.

4.3.4 Systemisch-vermittelte Hyper-IL-6 Effekte

Aufgrund der Tatsache, dass Hyper-IL-6 nach GLV-1h90-vermittelter Überexpression im Tumor keine signifikanten Effekte auf die Tumorregression ausüben konnte, jedoch Hyper-IL-6 in der Blutzirkulation nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieses *Designer*-Zytokin darüber hinaus in der Lage ist, systemische Effekte im Organismus auszulösen.

4.3.4.1 Phänotypische Unterschiede von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90

Systemische Applikation des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus GLV-1h90 in Tumor-tragende Mäuse führte zu einer Reihe von phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu GLV-1h68-injizierten Mäusen. Diese Beobachtungen werden im Folgenden beschrieben.

4.3.4.1.1 Hautfarbe

DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90 sowie als Kontrolle mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS injiziert. Während der ersten 21 Tage nach Injektion von GLV-1h90 konnte bei den Mäusen im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen eine Rotfärbung der Haut beobachtet werden, welche mit Hilfe eines Maestro EX *Imaging* Systems erfasst werden konnte.

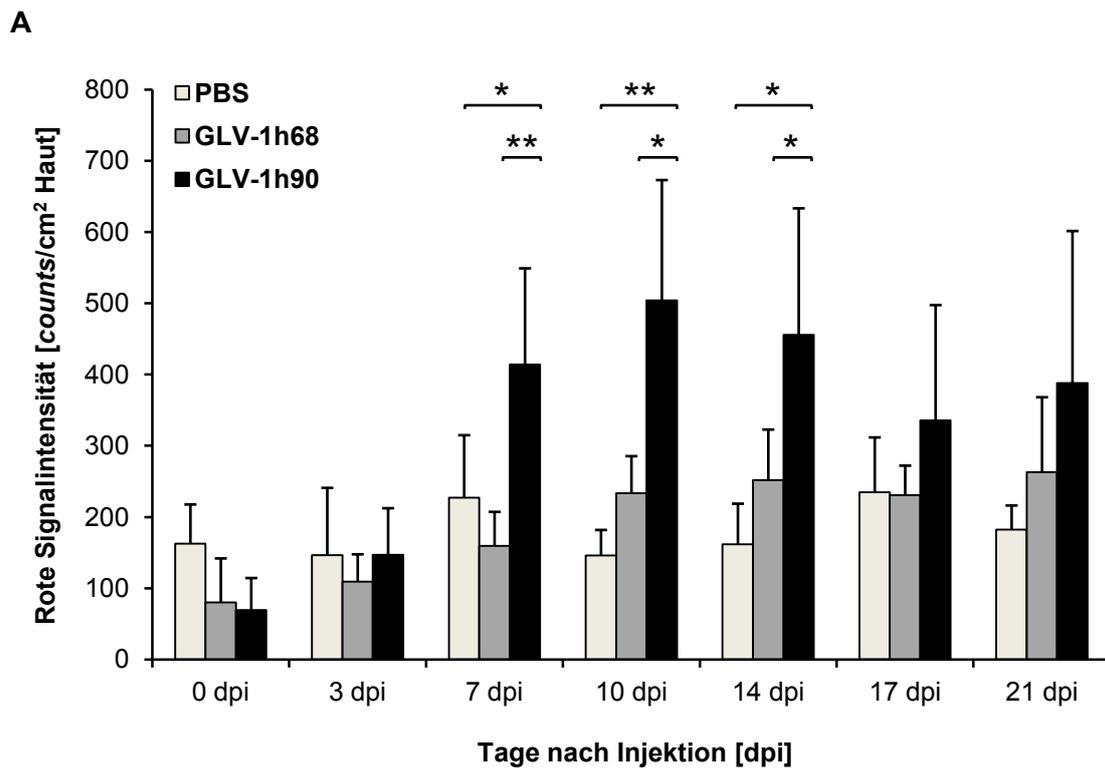


Abbildung 26: Rotfärbung der Haut von Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90. (A) DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden i.v. mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS injiziert. Über einen Infektionsverlauf von 21 Tagen wurde das Rot-Signal der Haut mit Hilfe eines Maestro EX *Imaging Systems* gemessen. Dargestellt ist die durchschnittliche Rote Signalintensität in *counts/cm² Haut* mit entsprechenden Standardabweichungen ($n=5$). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. (B) Photographische Darstellung der unterschiedlichen Rotfärbung Virus-injizierter Tumor-tragender Mäuse als repräsentatives Beispiel.

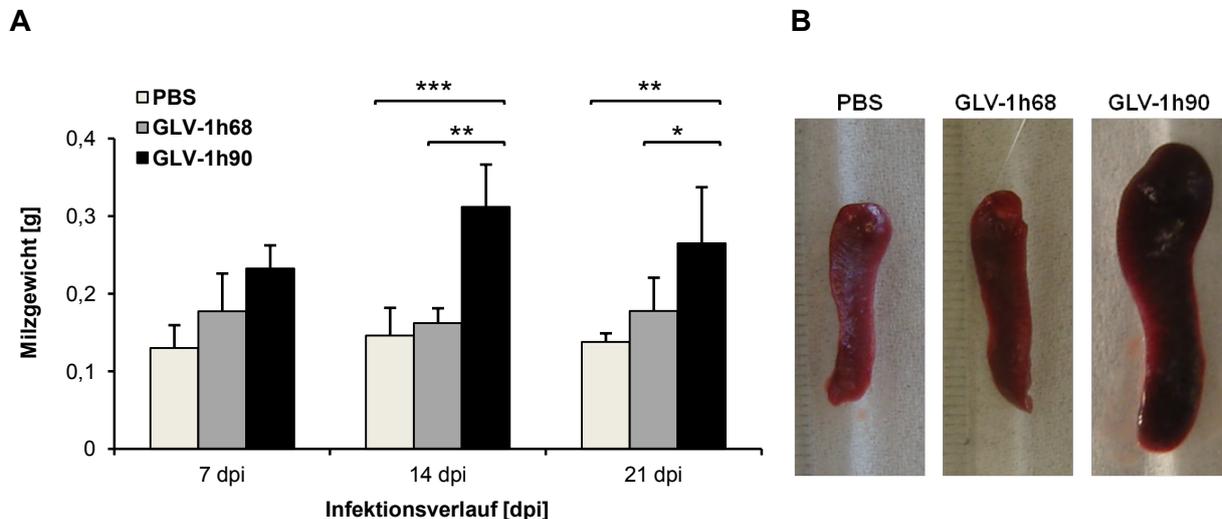
DU-145-Tumor-tragende Mäuse zeigten 7 Tage nach intravenöser Injektion (7 dpi) von GLV-1h90 eine beginnende Rotfärbung der Haut (Abbildung 26A), welche sowohl zu der

Gruppe der uninfizierten als auch der GLV-1h68-injizierten Mäuse eine statistische Signifikanz aufwies. Im weiteren Infektionsverlauf erreichte die Rotfärbung 10 dpi ein Maximum und war im Vergleich zu GLV-1h68-injizierte Mäusen um das 2,16-fache und im Vergleich zu uninfizierten Mäusen um das 3,45-fache erhöht. Von diesem Zeitpunkt der Infektion an reduzierte sich das Rot-Signal wieder und die Hautfarbe normalisierte sich. Bereits 17 dpi waren die beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen nicht mehr statistisch signifikant.

Diese unterschiedliche Rotfärbung ist in der photographischen Darstellung veranschaulicht (Abbildung 26B).

4.3.4.1.2 Organvergrößerung

Eine weitere phänotypische Veränderung konnte bei der Untersuchung der Organe Virusinjizierter Mäuse beobachtet werden. Bei GLV-1h90-injizierten DU-145-Tumor-tragenden Mäusen kam es sowohl zu einer Vergrößerung der Milz (Abbildung 27AB) als auch der Leber (Abbildung 27C). Zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tage nach intravenöser Injektion von 5×10^6 pfu GLV-1h90, sowie als Kontrolle von 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS, wurden den Mäusen sowohl die Milz als auch die Leber entnommen und das jeweilige Gewicht bestimmt.



C

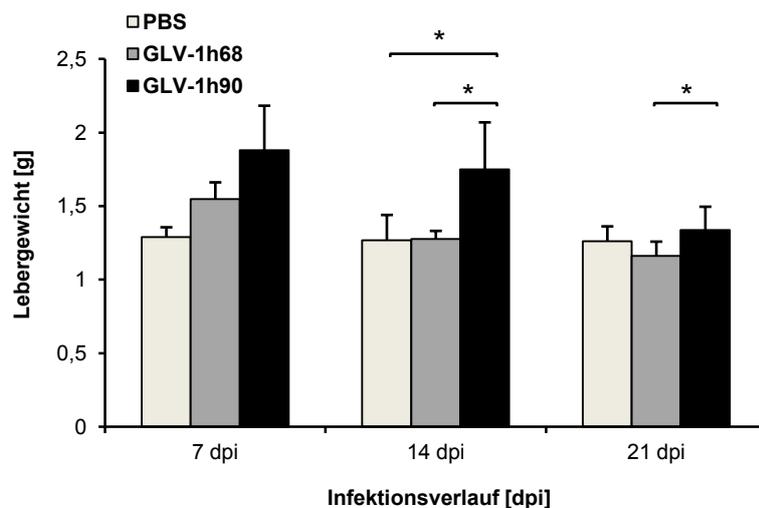


Abbildung 27: Hyper-IL-6-vermittelte Milz- (AB) und Lebervergrößerung (C) von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurden 7, 14 und 21 dpi sowohl die Milz als auch die Leber entnommen und das Gewicht bestimmt. Dargestellt ist das durchschnittliche Milz- (A) sowie Lebergewicht (C) in Gramm (g) mit den entsprechenden Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. (B) Photographische Darstellung der Milz-Größenunterschiede als repräsentatives Beispiel.

Während des Infektionsverlaufes kam es zu einer starken Vergrößerung der Milz von GLV-1h90-injizierten Mäusen im Vergleich zu GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen (Abbildung 27B). Der Gewichtsvergleich (Abbildung 27A) zeigte, dass die Milz von GLV-1h90-injizierten Mäusen 14 dpi ein maximales Gewicht von durchschnittlich 0,3 g erreichten. Dies bedeutete hier eine 1,9-fache Erhöhung im Vergleich zu der GLV-1h68-Gruppe sowie eine 2,1-fache Erhöhung im Vergleich zu uninfizierten Mäusen und war in beiden Fällen statistisch signifikant. Obwohl dieser Gewichtsunterschied 21 dpi ebenfalls noch zu verzeichnen war, kam es dabei bereits zu einer Verringerung um durchschnittlich 0,26 g pro Milz.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte der Gewichtsvergleich der Lebern aus den drei Gruppen (Abbildung 27C). Ebenfalls 14 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90 konnte eine signifikante Gewichtszunahme und damit Vergrößerung der Lebern im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich in beiden Fällen um eine 1,5-fache Gewichtszunahme. Analog zur Milzvergrößerung konnte 21 dpi bereits eine starke Verringerung der Leber-Gewichte von GLV-1h90-injizierten Mäusen beobachtet werden. Diese betragen durchschnittlich 1,3 g.

4.3.4.2 Hyper-IL-6-vermittelte Aktivierung der Akute-Phase-Antwort in der Leber von GLV-1h90-injizierten Mäusen

Neben einer Vielzahl von anderen Funktionen stellt Interleukin-6 eines der wichtigsten Zytokine in der Regulation der Akute-Phase-Antwort in der Leber dar⁹³. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die GLV-1h90-vermittelte Überexpression des Fusionsproteins Hyper-IL-6 in einem DU-145-Xenograft-Maus-Modell die Akute-Phase-Antwort in der Leber verstärkt. Die zuvor beschriebene Vergrößerung der Leber von GLV-1h90-injizierten Mäusen weist zusätzlich darauf hin. Für diese Untersuchung wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, sowie als Kontrolle mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS injiziert. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurde den Mäusen die Leber entnommen und homogenisiert. In Western Blot-Analysen wurden diese Lysate auf das Vorhandensein sowie die Hochregulierung des Akute-Phase-Proteins CRP (C-reaktives Protein) hin getestet, bei dem es sich um einen wichtigen Entzündungsparameter und Indikator für eine Akute-Phase-Reaktion handelt.

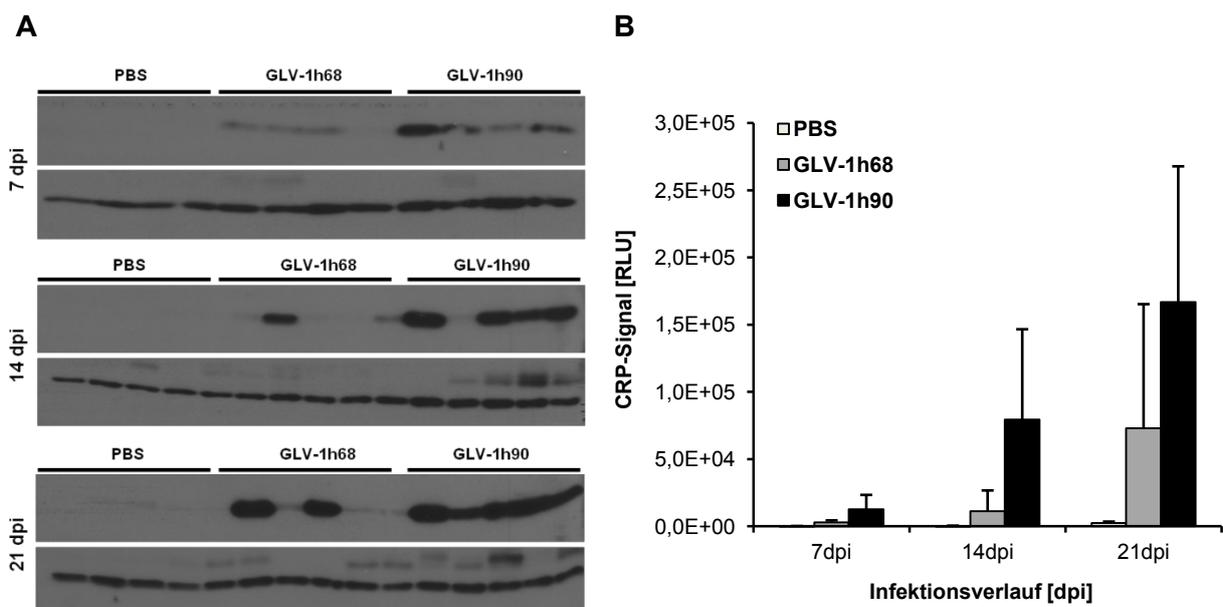


Abbildung 28: Bestimmung des CRP-Gehalts in der Leber von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Virus-Injektion. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde 7, 14 und 21 Tage nach Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS die Leber entnommen und homogenisiert. Von jeder Probe wurden 10 µg Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Detektion des C-reaktiven Proteins erfolgte mit einem CRP-Antikörper (1:5000) (A, obere Spur). β -Aktin (1:10000) diente als interne Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge (A, untere Spur). (B) Quantifizierung des CRP-Signals anhand des ECL-Signals des Western Blots angegeben in Relativen Lumineszenz Units (RLU) mit Standardabweichung (n=5).

Im Gegensatz zu uninfizierten DU-145-Tumor-tragenden Mäusen, kam es in beiden Virus-infizierten Gruppen bereits 7 dpi zu einer minimal erhöhten CRP-Expression in der Leber. Während des Infektionsverlauf konnte anhand der Banden (26 kDa) des Western Blots eine

drastische Erhöhung von CRP in Lebern von Virus-injizierten Mäusen nachgewiesen werden, wobei die CRP-Expression im Vergleich zu GLV-1h68-injizierten Mäusen in der GLV-1h90-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt war (Abbildung 28A). Da die Unterschiede zwischen den einzelnen Proben einer Gruppe zu stark differenzierten, konnte bei der Quantifizierung des CRP-Signals anhand des ECL-Signals der einzelnen Banden des Western Blots keine statistische Signifikanz erreicht werden (Abbildung 28B). Trotz allem deutet die Tendenz dieses Experiments darauf hin, dass das von GLV-1h90-exprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 zu einer erhöhten Akute-Phase-Reaktion in der Leber führt.

4.3.4.3 Verbesserter Gesundheitszustand von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90

Neben den bereits beschriebenen Hyper-IL-6-vermittelten Unterschieden zwischen GLV-1h90- und GLV-1h68-injizierten Mäusen konnte ein verbesserter Gesundheitszustand von GLV-1h90-injizierten Mäusen beobachtet werden.

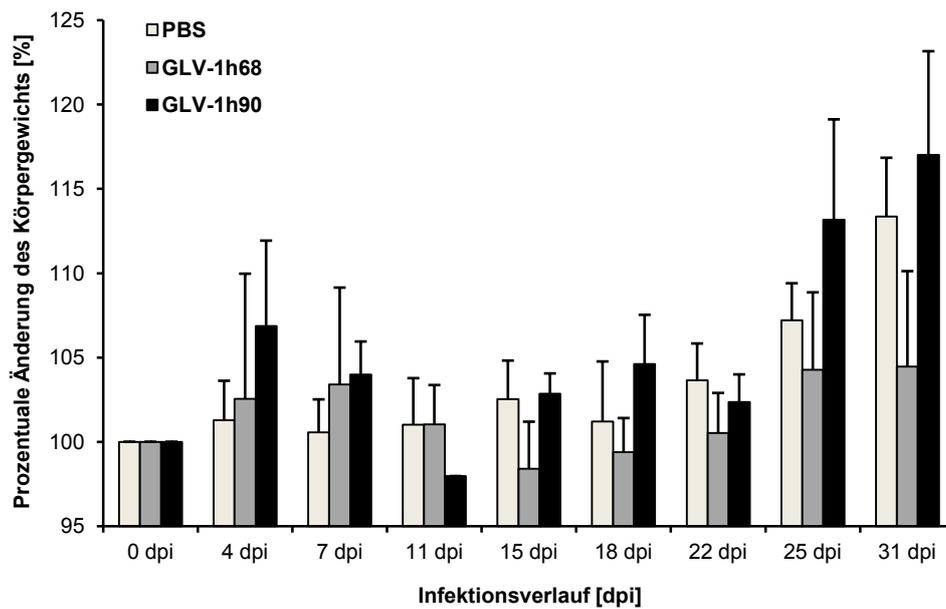
4.3.4.3.1 Gewichtszunahme

Nach intravenöser Applikation von 5×10^6 pfu GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurde über einen Infektionsverlauf von 31 Tagen eine starke Netto-Gewichtszunahme im Vergleich zu GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen gemessen (Abbildung 29B). Hierbei wird das Netto-Gewicht der Versuchstiere ermittelt, d.h. Körpergewicht ohne das Gewicht des Tumors. Da sich das Tumorgewicht während des Infektionsverlaufs aufgrund der Tumorregression stark ändert und somit das Ergebnis verfälschen würde, wurde das Tumorgewicht nicht mit berücksichtigt. Hierfür wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Körpergewicht [g]} - (\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} \times \text{Dichte des Tumors [g/mm}^3\text{]})$$

Bei dieser Berechnung wurde aus Erfahrungswerten die Dichte eines Tumors als $0,001 \text{ g/mm}^3$ angenommen. Zur Verdeutlichung der Unterschiede sind in Abbildung 29 sowohl die prozentualen Änderungen des gesamten Körpergewichts (Abbildung 29A) als auch die des Netto-Körpergewichts (Abbildung 29B) dargestellt.

A



B

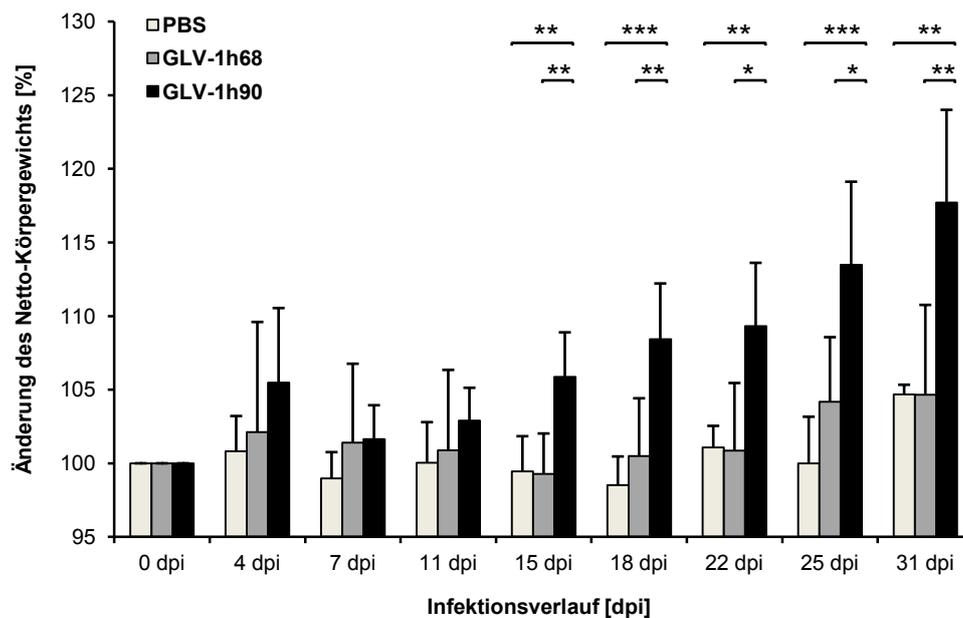


Abbildung 29: Änderung des Körpergewichts von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Virus-Injektion.

Von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde über einen Zeitraum von 31 Tagen nach der Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS sowohl das Körpergewicht als auch das Tumolvolumen bestimmt. (A) Durchschnittliche prozentuale Änderung des Körpergewichts in % mit entsprechenden Standardabweichungen (n=5). (B) Berechnetes Netto-Körpergewicht, d.h. Körpergewicht ohne das Gewicht des Tumors, ebenfalls als prozentuale Änderungsangaben mit Standardabweichungen. $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

Bereits 15 dpi war das Netto-Körpergewicht von GLV-1h90-injizierten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen. Diese Tendenz verstärkte sich mit fortschreitendem Infektionsverlauf, bis 31 dpi die Zunahme des Netto-

Körpergewichts von GLV-1h90-injizierten Mäusen durchschnittlich 118 % betrug im Vergleich zu 104 % in beiden Kontrollgruppen.

4.3.4.3.2 Beschleunigte Wundheilung von Virus-induzierten Schwanzläsionen

Intravenöse Injektion von Vaccinia-Viren in die laterale Schwanzvene kann zu Läsionen an der Einstichstelle führen, welche sich außerdem, ausgehend von der Einstichstelle, im Laufe der Infektion vermehren können. Darüber hinaus sind diese Läsionen Virus-induziert, d. h. Vaccinia-Viren sind in der Lage sich in diesen Läsionen zu replizieren. Dies lässt sich anhand der Virus-vermittelten GFP-Expression deutlich nachweisen.

Bei der Untersuchung GLV-1h90-induzierter Schwanzläsion konnte beobachtet werden, dass der Wundverschluss während des Infektionsverlaufs im Vergleich zu GLV-1h68-induzierten Läsionen stark beschleunigt war, wodurch eine Vielzahl der Läsionen aufgrund kompletter Wundheilung nicht mehr sichtbar waren. Aus diesem Grund konnte, anhand der Bestimmung sichtbarer Schwanzläsionen, die durch Hyper-IL-6 beschleunigte Wundheilung quantifiziert werden (Abbildung 30).

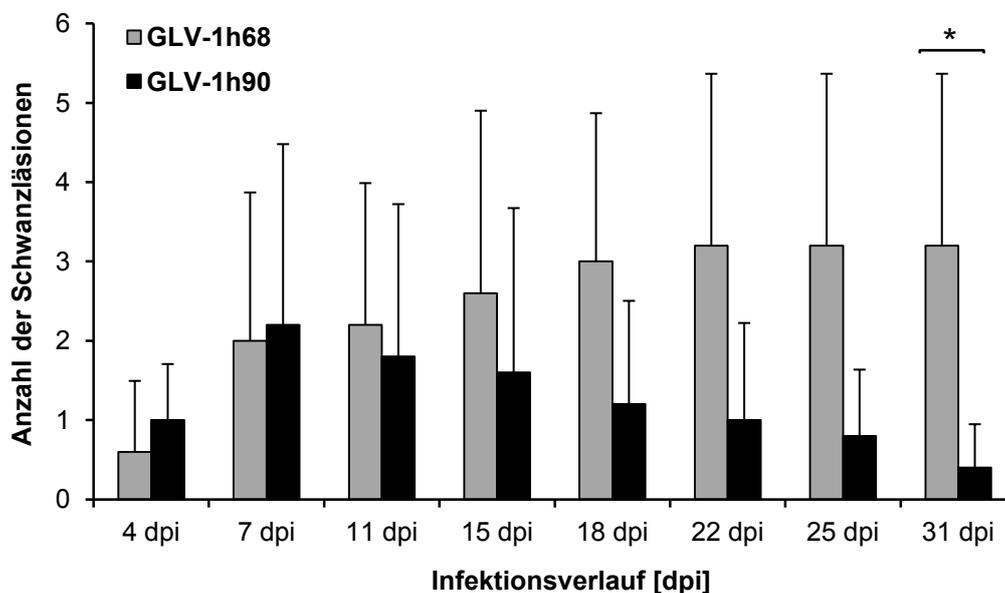


Abbildung 30: Anzahl der Virus-induzierten Schwanzläsionen von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Virus-Injektion. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde intravenös GLV-1h90 oder GLV-1h68 in die laterale Schwanzvene injiziert und in einem Infektionsverlauf von 31 Tagen die Anzahl der entstehenden Schwanzläsionen bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$.

Die ersten Schwanzläsionen konnten bereits 4 Tage nach Injektion beider Virus-Konstrukte detektiert werden, wobei sich die Anzahl bis 7 dpi auf durchschnittlich 2,2 Läsionen pro Maus weiter erhöhte. 11 dpi konnte dann eine erste Reduktion der Anzahl an Schwanzläsionen in

der GLV-1h90-Gruppe beobachtet werden, welche sich über den kompletten Infektionsverlauf verstärkte und schließlich 31 dpi mit durchschnittlich 0,4 Läsionen pro Maus im Vergleich zu 3,2 Läsionen in der GLV-1h68-Gruppe statistische Signifikanz erreichte. Im Gegensatz dazu blieb die Anzahl der bis 18 dpi gebildeten Läsionen von GLV-1h68-injizierten Mäusen über den restlichen Infektionsverlauf konstant und es konnten bis 31 dpi keine Anzeichen von Wundheilung beobachtet werden. Verdeutlicht wurde dies durch die Analyse der GFP-Expression in den Virus-induzierten Schwanzläsionen 31 dpi mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Abbildung 31).

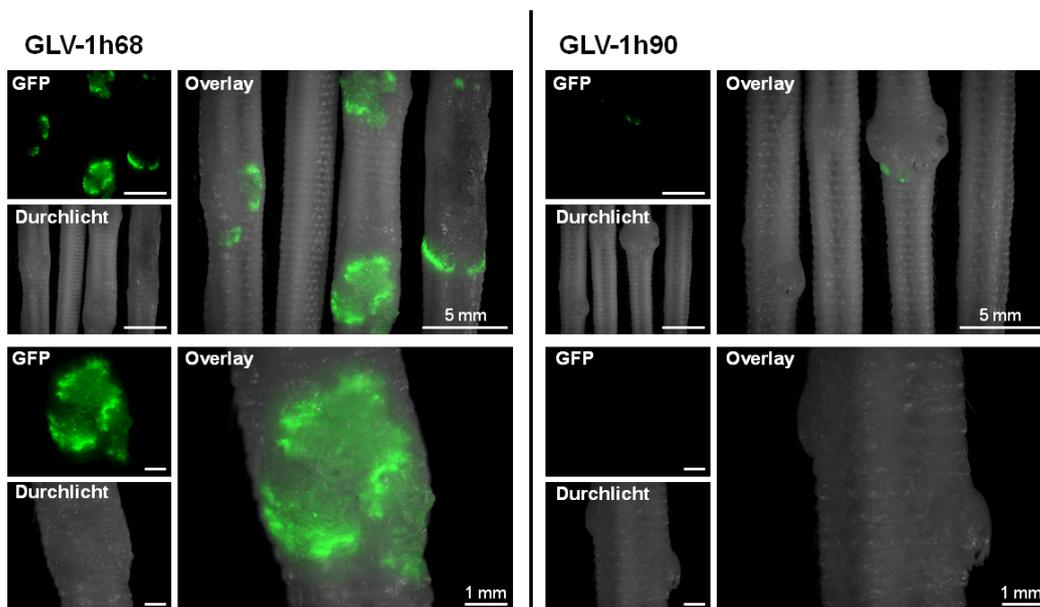


Abbildung 31: Detektion des Wundverschlusses von Virus-bedingten Schwanzläsionen anhand der GFP-Expression. DU-145-Tumor-tragende Mäuse 31 Tage nach Injektion von GLV-1h90 oder GLV-1h68. Dargestellt sind repräsentative Beispiele.

Anhand der GFP-Expression war deutlich zu erkennen, dass 31 dpi Schwanzläsionen von GLV-1h68-injizierten Mäusen weitaus stärker infiziert waren als die der GLV-1h90-Gruppe. Außerdem wiesen beide Gruppen unterschiedliche Läsions-Morphologien auf. Während GLV-1h68-induzierte Läsionen Ähnlichkeit zu offenen Wunden hatten, konnte bei Läsionen von GLV-1h90-injizierten Mäusen der Wundverschluss anhand einer dicken Epithelschicht beobachtet werden (Abbildung 31).

Für die Aufdeckung möglicher Gründe für die beschleunigte Wundheilung wurden die Schwanzläsionen in einem weiteren Schritte auf histologischer Ebene untersucht. Neben systemisch-vermittelten Effekten könnten außerdem lokal ausgelöste Effekte von Hyper-IL-6 eine Rolle spielen. Dafür war es notwendig, die Expression des *Designer*-Zytokins nicht nur im Tumor, sondern auch in den beobachteten Schwanzläsionen nachzuweisen.

Hierfür wurden DU-145-Tumor-tragenden Mäusen 7 Tage nach der Injektion von 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 bzw. PBS die Schwänze abgetrennt und über Nacht in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die betroffenen Hautregionen vorsichtig vom Knochen abgelöst und in Agarose eingebettet. In vertikaler Ausrichtung wurden anschließend mit einem Vibratom 100 μm dünne Schnitte angefertigt. Zusätzlich zu Hyper-IL-6, welches mit ein IL-6 Antikörper (1:100) detektiert wurde, wurden zusätzlich Blutgefäße mit einem CD31-Antikörper (1:100) angefärbt. Damit konnte überprüft werden, ob Hyper-IL-6 lokal von infizierten Zellen exprimiert oder mit der Blutzirkulation in die Läsionen transportiert wird.

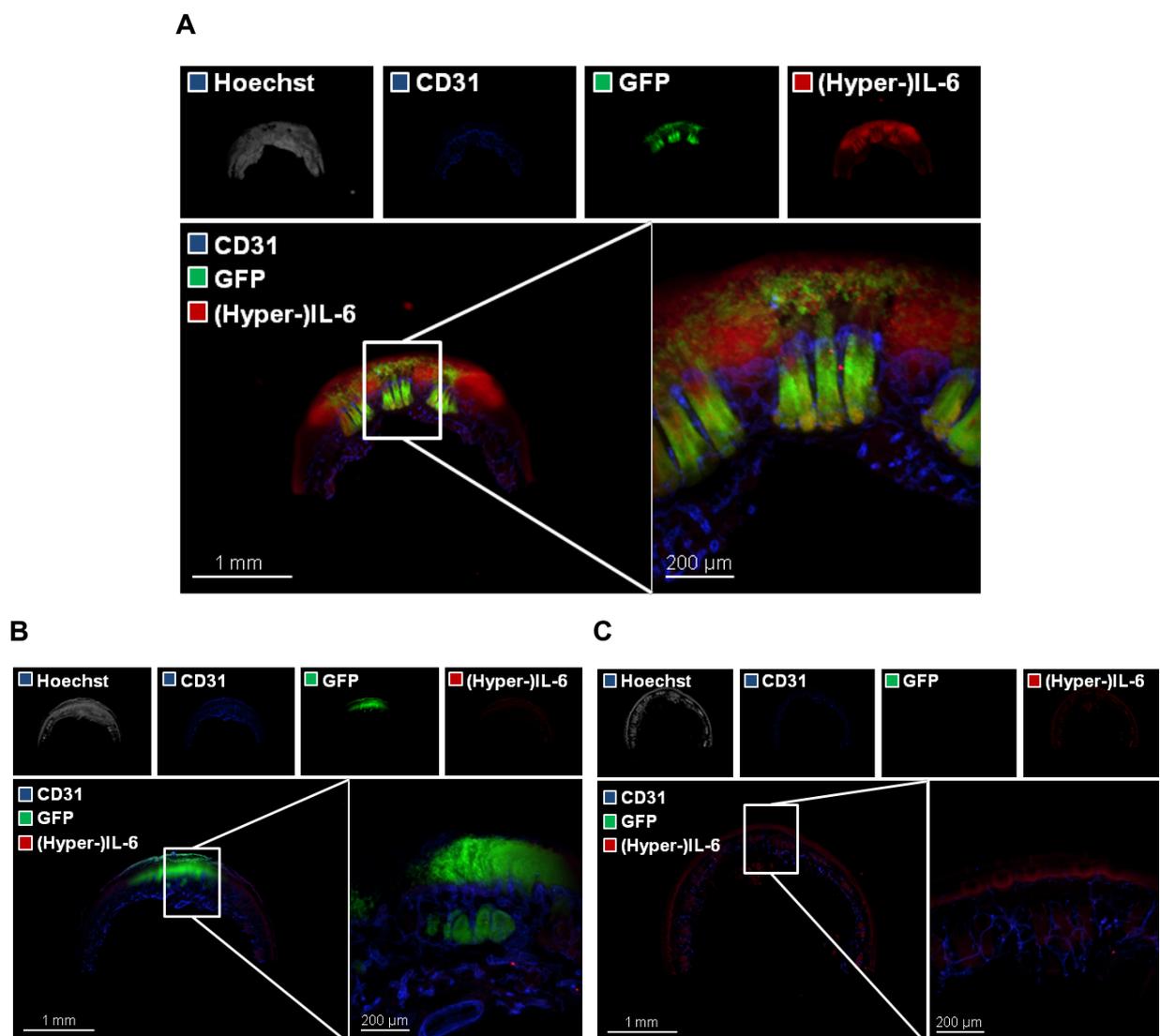


Abbildung 32: Immunhistologische Untersuchung der Hyper-IL-6-Expression in Virus-bedingten Schwanzläsionen von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen. Schwanzläsionen von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurden 7 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90 (A), GLV-1h68 (B) oder PBS (C) abgelöst und Gewebeschnitte hergestellt. Zur Detektion von (Hyper-)IL-6 wurde ein IL-6-spezifischer Antikörper (1:100, rot), sowie zur Detektion von Blutgefäßen ein CD31-spezifischer Antikörper (1:100, blau) eingesetzt. Vaccinia-Viren konnte anhand des GFP-Signals (grün) nachgewiesen werden. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Schnitte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (1:400, grau) behandelt. Alle Bilder stellen repräsentative Beispiele dar.

Anhand der immunhistologischen Untersuchung der Schwanzläsionen (Abbildung 32) konnte 7 dpi ausschließlich in GLV-1h90-injizierten Mäusen eine Hyper-IL-6-Expression nachgewiesen werden. Weder in GLV-1h68- noch in PBS-injizierten Mäusen kam es zur Expression des *Designer*-Zytokins. Anhand der Visualisierung der Blutgefäße konnte eine präzise Abgrenzung zwischen Dermis und Epidermis der Haut (Abbildung 32) festgestellt werden. Zusätzlich fiel auf, dass eine Virus-Replikation, ohne Unterschied zwischen beiden Konstrukten, hauptsächlich in den Haarfollikeln der Haut auftrat. Diese charakterisieren sich durch eine wiederkehrende Anordnung von drei aufeinander folgenden runden bzw. länglichen Strukturen (Abbildung 33). Im Vergleich zu GLV-1h90- induzierten Läsionen befanden sich bei GLV-1h68-induzierten zusätzlich ein Großteil der viralen Partikel in der Epidermis (Abbildung 32B). Die Lokalisation des exprimierten Hyper-IL-6 beschränkte sich dagegen ausschließlich auf die Epidermis GLV-1h90-induzierter Schwanzläsionen (Abbildung 32A) und konnte weder in Blutgefäßen noch in umgebenden Regionen beobachtet werden.

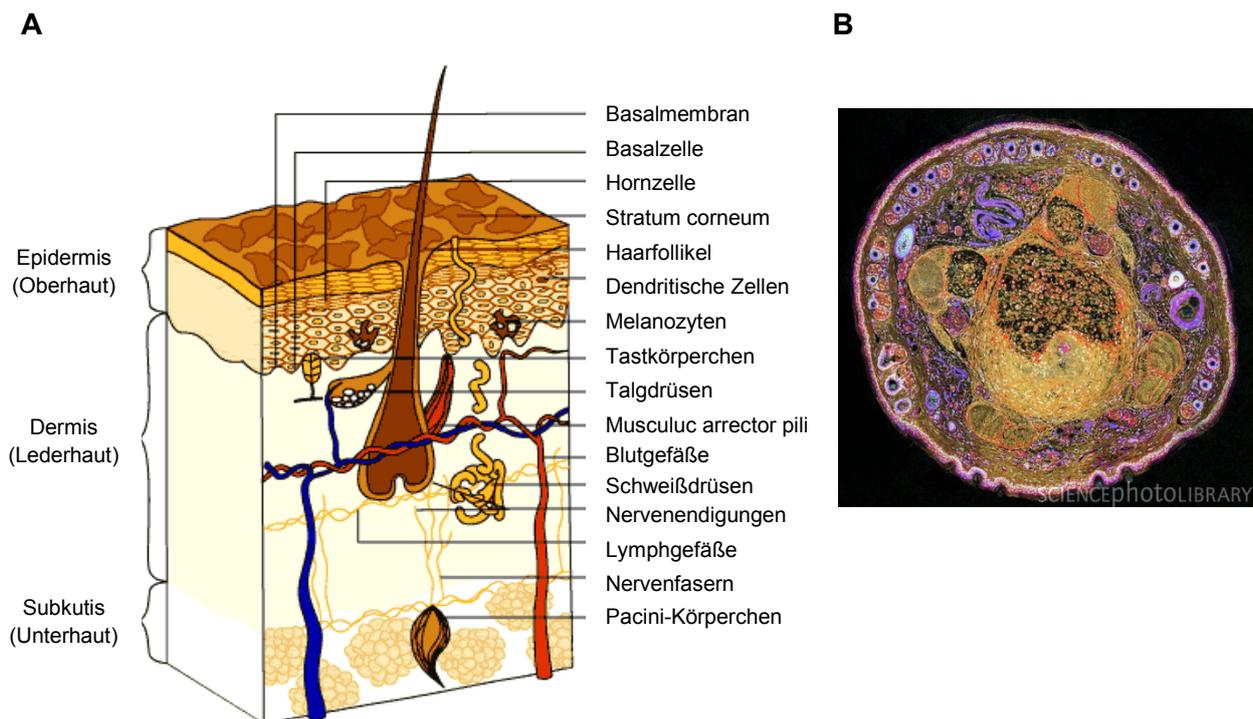


Abbildung 33: (A) Schematischer Aufbau der Haut (<http://skincare.dermis.net>); (B) Schwanzquerschnitt einer Maus (www.sciencephoto.com)

4.3.4.4 Hyper-IL-6-vermittelte Beeinflussung der Hämostase in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90

4.3.4.4.1 Erhöhung der Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf

Eine weitere beschriebene Funktion von Interleukin-6 betrifft die Regulation der Hämostase. Beispielsweise ist IL-6 in der Lage, die Megakaryozyten-Reifung im Knochenmark ohne den Zusatz anderer Wachstumsfaktoren zu stimulieren und auf diesem Weg eine vermehrte Produktion von Thrombozyten in Gang zu setzen^{98,100}.

Um zu untersuchen, ob dies auch für das von GLV-1h90-exprimierte Hyper-IL-6 gilt, wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90 sowie als Kontrolle mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS injiziert. Über einen Infektionsverlauf von 25 Tagen wurde den Mäusen zweimal wöchentlich retro-orbital 50 μ l Blut abgenommen und mit Hilfe eines Sysmex KX-21 *automatic micro-cell counters* die Thrombozyten-Zahl bestimmt.

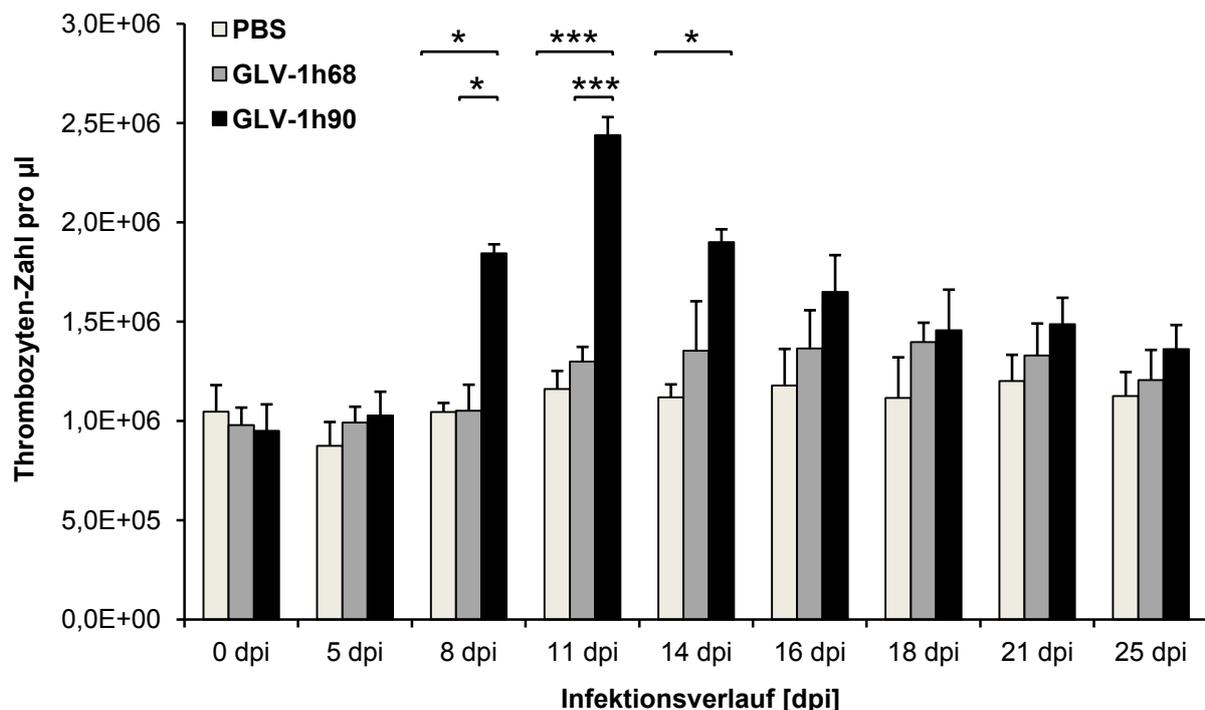
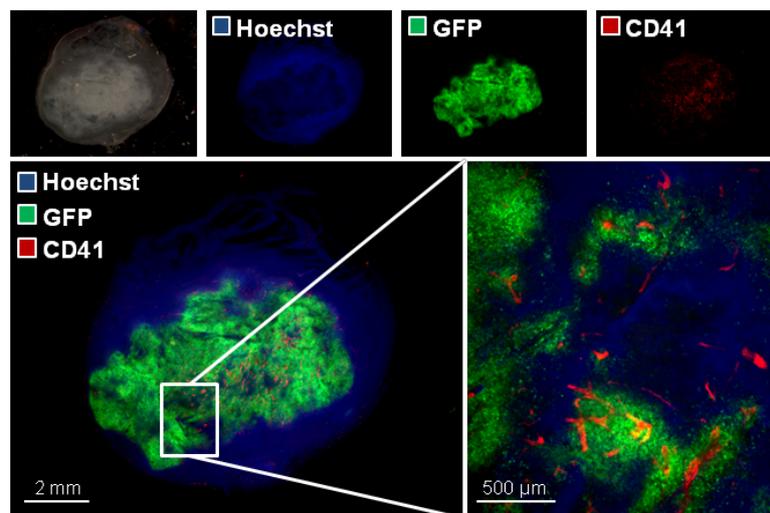


Abbildung 34: Bestimmung der Thrombozyten-Zahl in Blut-Proben von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Virus-Injektion. In Vollblut-Proben von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen nach Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS die Thrombozyten-Zahl bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Thrombozyten-Zahl pro μ l Vollblut mit Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$.

Im Gegensatz zu GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen konnte in Vollblut-Proben von GLV-1h90-injizierten Mäusen bereits 8 dpi eine signifikante Erhöhung der Thrombozyten-Zahl beobachtet werden. Diese Erhöhung erreichte ihr Maximum 11 dpi und war zu diesem Zeitpunkt mit einer Konzentration von $2,44 \times 10^6$ pro μ l etwa um das doppelte erhöht im

Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Bereits drei Tage später (14 dpi) konnte eine Reduktion der Thrombozyten-Zahl verzeichnet werden, welche ab 16 dpi weiter abfiel und mit durchschnittlich $1,4 \times 10^6$ Thrombozyten pro μl Vollblut Normalwerte im Bereich der Kontroll-Gruppen GLV-1h68 und PBS erreichte (Abbildung 34).

Um mögliche Implikationen der erhöhten Thrombozyten-Zahl im Tumor zu analysieren, wurden die Thrombozyten immunhistologisch sowohl in Tumorschnitten lokalisiert als auch quantifiziert. Dafür wurden DU-145-Tumor-tragenden Mäusen 11 Tage nach intravenöser Applikation von 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS der Tumor entfernt und $100 \mu\text{m}$ dünne Gewebeschnitte angefertigt. Die Visualisierung der Thrombozyten erfolgte über einen CD41-Antikörper (1:100) mit anschließender Detektion des primären Antikörpers mit einem Cy3-gekoppeltem sekundären Antikörper (1:200). Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Schnitte zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (1:400) behandelt. Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop.

A

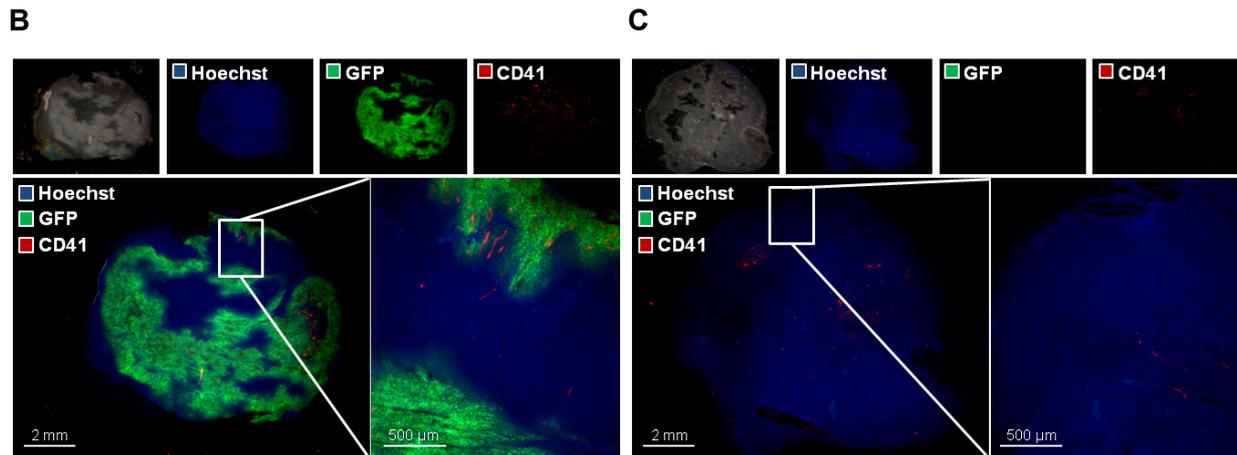


Abbildung 35: Immunhistologische Färbung von Thrombozyten (CD41) in DU-145-Tumoren 11 Tage nach intravenöser Virus-Injektion. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurden 11 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90 (A), GLV-1h68 (B) oder PBS (C) die Tumore entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. In diesen Schnitten wurden Thrombozyten mit einem CD41-spezifischen primären Antikörper sowie mit einem Cy3-gekoppelten (rot) sekundären Antikörper detektiert. Vaccinia-Viren konnten anhand des GFP-Signals (grün) nachgewiesen werden. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst (blau) visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Anhand der immunhistologischen Färbung von Thrombozyten im Tumorgewebe (Abbildung 35) war deutlich zu erkennen, dass ausschließlich in infizierten und folglich GFP-markierten Bereichen des Tumors größere Mengen an Thrombozyten detektiert werden konnten. Darüber hinaus war das CD41-Signal ausschließlich auf gefäßartige Strukturen beschränkt, die bei gleichzeitiger Färbung mit einem CD31-Antikörper (1:100) als Blutgefäße identifiziert werden konnten (Abbildung 36).

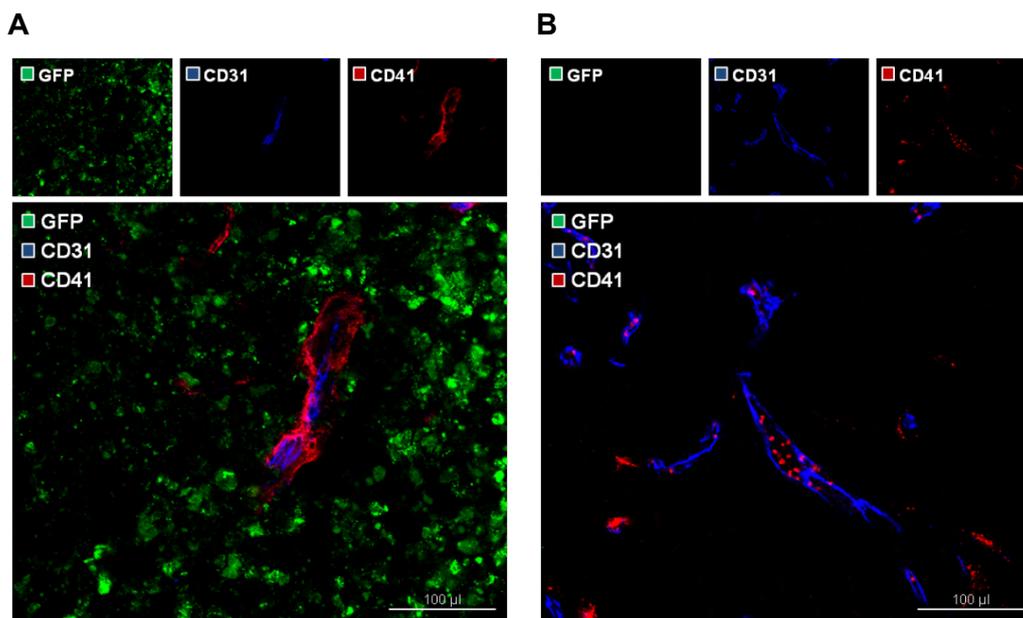


Abbildung 36: Lokalisierung von Thrombozyten in infizierten (A) und uninfizierten (B) Regionen von DU-145-Tumoren 11 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h90. In Gewebeschnitten von DU-145-Tumoren 11 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h90 wurden Thrombozyten mit einem CD41- (rot) und Blutgefäße mit einem CD31-Antikörper (blau) angefärbt. Dargestellt sind repräsentative Beispiele von infizierten (A) und uninfizierten (B) Tumor-Regionen.

Bei näherer Betrachtung der gefäßartigen Strukturen mit einem konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop fiel zusätzlich auf, dass sich große Mengen an CD41-positive Zellen in infizierten Tumor-Regionen hauptsächlich außerhalb des Blutgefäßes befanden (Abbildung 36A), während in uninfizierten Regionen geringe Mengen ausschließlich im Innern der Blutgefäße detektiert werden konnten (Abbildung 36B). Dies konnte sowohl in GLV-1h90- als auch in GLV-1h68-infizierten Tumoren beobachtet werden, wobei in GLV-1h90-injizierten Mäusen weitaus größere Mengen an Thrombozyten im Tumor nachweisbar waren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich zu diesem Zeitpunkt (11 dpi) möglicherweise größere Mengen an Thrombozyten im Blut befanden, die aufgrund der Durchlässigkeit der Blutgefäße in deren Peripherie gelangten. Demnach konnte die Quantifizierung der immunhistologischen CD41-Expression in Tumorschnitten als weitere Methode dafür eingesetzt werden, die Hyper-IL-6-bedingte Erhöhung der Thrombozyten-Zahl im Blut zu bestätigen. Hierbei wurden je 4 Tumore von GLV-1h90-, GLV-1h68- und PBS-injizierten Mäusen untersucht, wobei je Tumor zwei Schnitte aus unterschiedlichen Ebenen für die immunhistologische Analyse eingesetzt wurden. Anschließend wurden von jedem Schnitt mit Hilfe eines Stereo-Fluoreszenz-Mikroskops Bilder von je vier Arealen ausschließlich aus infizierten Bereichen unter identischen Bedingungen aufgenommen. Diese wurden mit Hilfe von Photoshop 7.0 zu Bildern in Graustufen (Intensitätsbereich 0-255) umgewandelt und die Fläche der CD41-positiven Zellen mit Hilfe der Image J Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) ermittelt.

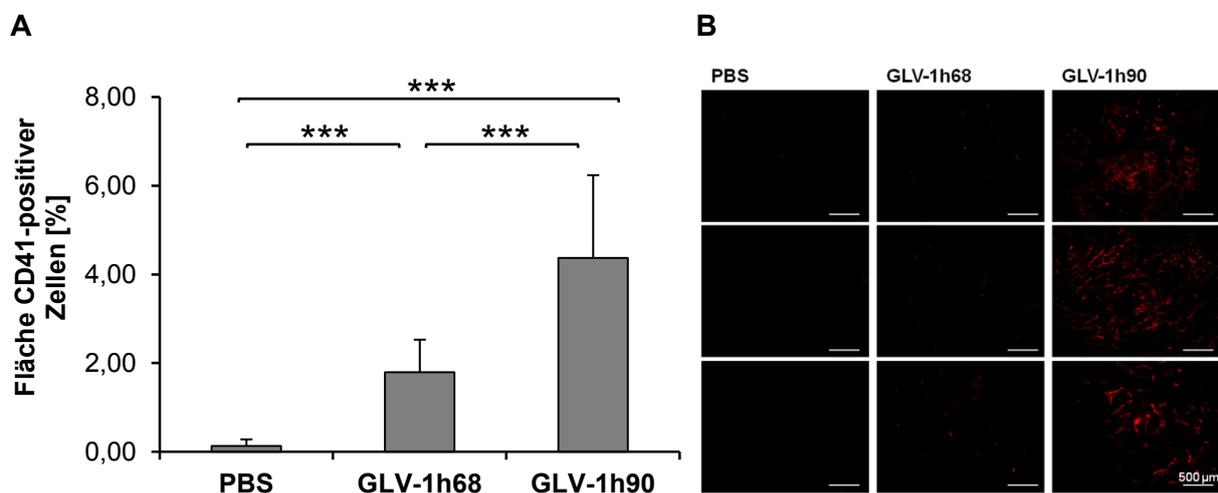


Abbildung 37: Quantifizierung von Thrombozyten (CD41) in infizierten Bereichen von DU-145-Tumoren 11 Tage nach intravenöser Virus-Injektion. (A) Unterschiede der Fläche mit CD41-positiven Zellen in Tumoren von GLV-1h90-, GLV-1h68- und PBS-injizierten Mäusen 11 dpi. Angegeben ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der Fläche CD41-positiver Zellen mit Standardabweichungen (n=8). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. $*** p \leq 0,005$. (B) Mikroskopische Aufnahmen der CD41-Färbung als repräsentative Beispiele, anhand welcher die Quantifizierung durchgeführt wurde.

Die Bestimmung der Fläche mit CD41-positiven Zellen in Tumorschnitten konnte als Methode zur Quantifizierung der Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf eingesetzt werden und

bestätigte die Ergebnisse aus der Blutuntersuchung mit Hilfe eines Sysmex KX-21 *automatic micro-cell counters* (Abbildung 34). 11 Tage nach systemischer GLV-1h90-Injektion konnte eine signifikant größere Fläche CD41-positiver Zellen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen detektiert werden (Abbildung 37). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Blutuntersuchung konnte hierbei allerdings auch in GLV-1h68-infizierten Tumor-Arealen eine signifikant größere Fläche mit CD41-positiven Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe beobachtet werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass ausschließlich in infizierten Regionen des Tumors die Durchlässigkeit der Blutgefäße stark zunahm, wodurch Thrombozyten aus Blutgefäßen austreten konnten. Die in der Peripherie angelagerten Thrombozyten waren somit frei zugänglich und konnten immunhistologisch detektiert werden.

4.3.4.4.2 Mögliche Ursache für die erhöhte Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf

Die Megakaryopoese beschreibt die Reifung der Megakaryozyten im Knochenmark bis zur Abschnürung der Thrombozyten in den Blutkreislauf. Neben Thrombopoetin, dem wichtigsten Regulator der Megakaryopoese, sind zusätzlich eine Reihe anderer Zytokine an der Bildung und Differenzierung von Megakaryozyten beteiligt. Während Interleukin-3 (IL-3) für die frühe Megakaryopoese entscheidend ist, werden Interleukin-6 (IL-6) hauptsächlich spätere Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum von Megakaryozyten zugesprochen⁹⁹.

Um zu untersuchen, ob die vermehrte Produktion von Thrombozyten in GLV-1h90-injizierten Mäusen auf eine direkte Stimulation der Megakaryopoese durch das überexprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 zurückzuführen ist, wurden unterschiedliche Reifungsstadien der Megakaryozyten im Knochenmark quantifiziert. Dafür wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse mit 5×10^6 pfu GLV-1h90 sowie als Kontrolle mit 5×10^6 pfu GLV-1h68 oder PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert. Sieben Tage nach der Injektion wurde den Mäusen das Knochenmark aus dem Femur-Knochen entfernt und Semi-Dünnschnitte angefertigt. Von jeder Gruppe wurden 4 Mäuse untersucht und je Maus 5-8 Knochenmark-Schnitte aus unterschiedlichen Ebenen hergestellt. Nach Behandlung mit einer Methylenblau-Färbelösung wurde von jedem Schnitt Bilder von zwei unterschiedlichen Arealen mit Hilfe eines Axiovert 200M Mikroskops aufgenommen. In diesen Bildern wurde anschließend in einem definierten Ausschnitt die Anzahl der Megakaryozyten bestimmt, wobei zwischen großen, d.h. Megakaryozyten in einem fortgeschrittenen Reifungsstadium, und kleinen unterschieden wurde.

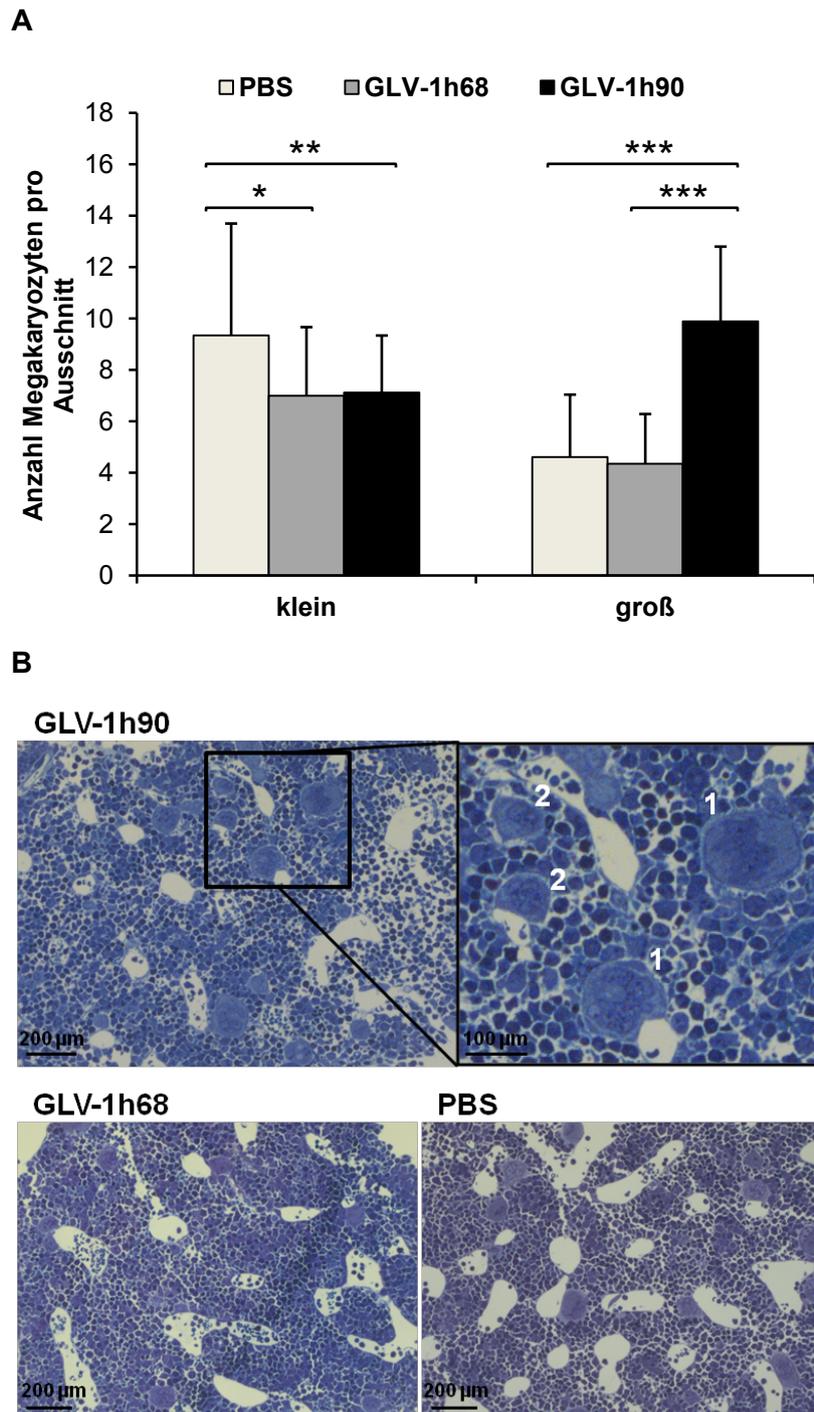


Abbildung 38: Quantifizierung von Megakaryozyten im Knochenmark von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen 7 Tage nach intravenöser Virus-Injektion. Von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde 7 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS das Knochenmark isoliert und Semi-Dünnschnitte angefertigt. (A) Quantifizierung unterschiedlicher Reifungsstadien von Megakaryozyten in Knochenmark-Schnitten von PBS- (n=20), GLV-1h68- (n=28) und GLV-1h90-injizierten Mäusen (n=32). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. (B) Mikroskopische Aufnahmen der Methylenblau-gefärbten Semi-Dünnschnitte als repräsentative Beispiele, anhand welcher die großen (1) und kleinen (2) Megakaryozyten quantifiziert wurden.

Anhand der Quantifizierung unterschiedlicher Reifungsstadien von Megakaryozyten im Knochenmark (Abbildung 38) konnte gezeigt werden, dass sich 7 Tage nach intravenöser

Injektion von GLV-1h90 signifikant größere Mengen an großen Megakaryozyten in einem fortgeschrittenen Reifungszustand befanden im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Gleichzeitig konnten signifikant weniger kleine Megakaryozyten nach GLV-1h90-Behandlung im Vergleich zur PBS-Gruppe in Anfangsstadien detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass GLV-1h90-exprimiertes Hyper-IL-6 in der Lage ist, die Megakaryopoese im Knochenmark bereits 7 dpi zu stimulieren und dass dies 2-4 Tage später zu einer erhöhten Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf führt (Abbildung 34).

4.4 Mögliche klinische Anwendung von GLV-1h90 – Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika am Beispiel von Mitomycin C

4.4.1 Untersuchung von onkolytischen Vaccinia-Viren in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C in Zellkultur

Bei Mitomycin C handelt es sich um ein zytotoxisches Antibiotikum, welches außerdem als Chemotherapeutikum Einsatz findet. Sein Wirkmechanismus besteht in der kovalenten Verknüpfung von DNA-Strängen, wodurch Prozesse wie Replikation oder Transkription inhibiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Vaccinia-Viren um DNA-Viren handelt, ist es von großer Bedeutung bei einem kombinierten Einsatz den direkten Einfluss des Chemotherapeutikums auf die Virus-Replikation und demnach auf die Virus-bedingten anti-Tumor-Effekte zu untersuchen. Diese Untersuchungen werden hauptsächlich *in vitro* durchgeführt, obwohl bei einer Kombinationstherapie *in vivo* oft andere Mechanismen bei der Tumor-Bekämpfung eine Rolle spielen.

4.4.1.1 Einfluss von Mitomycin C auf die virale Replikation in Zellkultur

Zunächst wurde der Einfluss von Mitomycin C auf die virale Replikation von GLV-1h90 im Vergleich zu GLV-1h68 in DU-145-Zellen untersucht. Dafür wurden DU-145-Zellen zunächst mit beiden Virus-Konstrukten (MOI 0,05) infiziert und nach einer Stunde 0,4 µg/ml Mitomycin C in frischem Medium dazugegeben. Als Kontrolle wurden infizierte DU-145-Zellen nur mit frischem Medium ohne Mitomycin C versetzt. 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 und 72 hpi wurden die Überstände der infizierten Zellen abgenommen sowie Lysate von den behandelten Zellen hergestellt. Mit Hilfe von Plaque Assays wurden anschließend die jeweiligen Viruskonzentrationen der gesammelten Proben ermittelt.

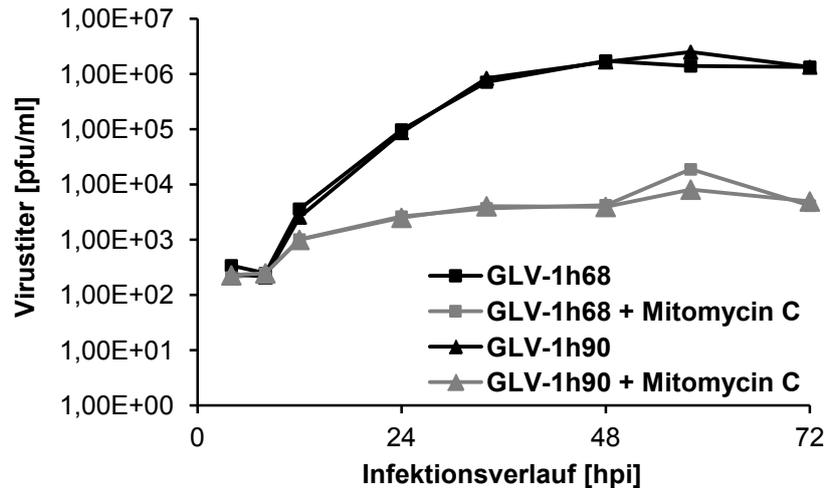


Abbildung 39: Einfluss von Mitomycin C auf das Replikationsverhalten von GLV-1h68 und GLV-1h90 in DU-145-Zellen. Quantifizierung der Virus-Partikel in Zelllysaten und Zellkulturüberständen 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 und 72 Stunden nach der Infektion von DU-145-Zellen mit GLV-1h68 oder GLV-1h90 und anschließender Behandlung mit Mitomycin C mittels *Plaque Assay*. Dargestellt sind die totalen Virus-Konzentrationen jeweils aus Zelllysaten und Überständen in pfu/ml. Die Werte wurden aus Triplikaten (n=3) ermittelt.

Die Untersuchung der viralen Replikation unter Einfluss von Mitomycin C ergab, dass sowohl die Replikation von GLV-1h90 als auch von GLV-1h68 durch das Chemotherapeutikum stark eingeschränkt wurde (Abbildung 39). Bereits 12 hpi konnte in beiden Mitomycin C-behandelten Gruppen eine starke Verlangsamung der Virus-Amplifikation detektiert werden, welche über den kompletten Infektionsverlauf von 72 Stunden zu beobachten war. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Mitomycin C-behandelten Zellen, ohne Unterschied zwischen beiden Virus-Konstrukten, durchschnittlich $4,5 \times 10^3$ pfu/ml auf, wobei sich in den unbehandelten Ansätzen mit durchschnittlich $1,3 \times 10^6$ pfu/ml weitaus größere Mengen an Virus-Partikeln befanden.

4.4.1.2 Einfluss von Mitomycin C auf Vaccinia-Virus-vermittelte anti-Tumor-Effekte in Zellkultur

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob und in welchem Maß die Mitomycin C-bedingte Einschränkung der viralen Replikation Auswirkungen auf die onkolytische Aktivität der Vaccinia-Viren in DU-145-Zellen *in vitro* hat. Hierfür wurde ein MTT-Proliferations-Assay eingesetzt. Zu Beginn des Experiments wurden DU-145-Zellen zunächst mit den jeweiligen Virus-Konstrukten (GLV-1h90, GLV-1h68) mit einer MOI von 0,05 infiziert und nach einer Stunde $0,4 \mu\text{g/ml}$ Mitomycin C in frischem Medium appliziert. Als Kontrolle wurden uninfizierte Zellen ebenfalls mit Mitomycin C behandelt sowie infizierte und uninfizierte DU-145-Zellen nur mit frischem Medium ohne Mitomycin C versetzt. 12, 24, 34, 48, 58 und 72 hpi wurden die Überstände abgenommen und durch Färbung mit einer MTT-Lösung der

Anteil lebender Zellen, im Vergleich zu PBS-behandelten Zellen, in jeder Probe ermittelt. Die kolorimetrische Auswertung erfolgte bei 570 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers

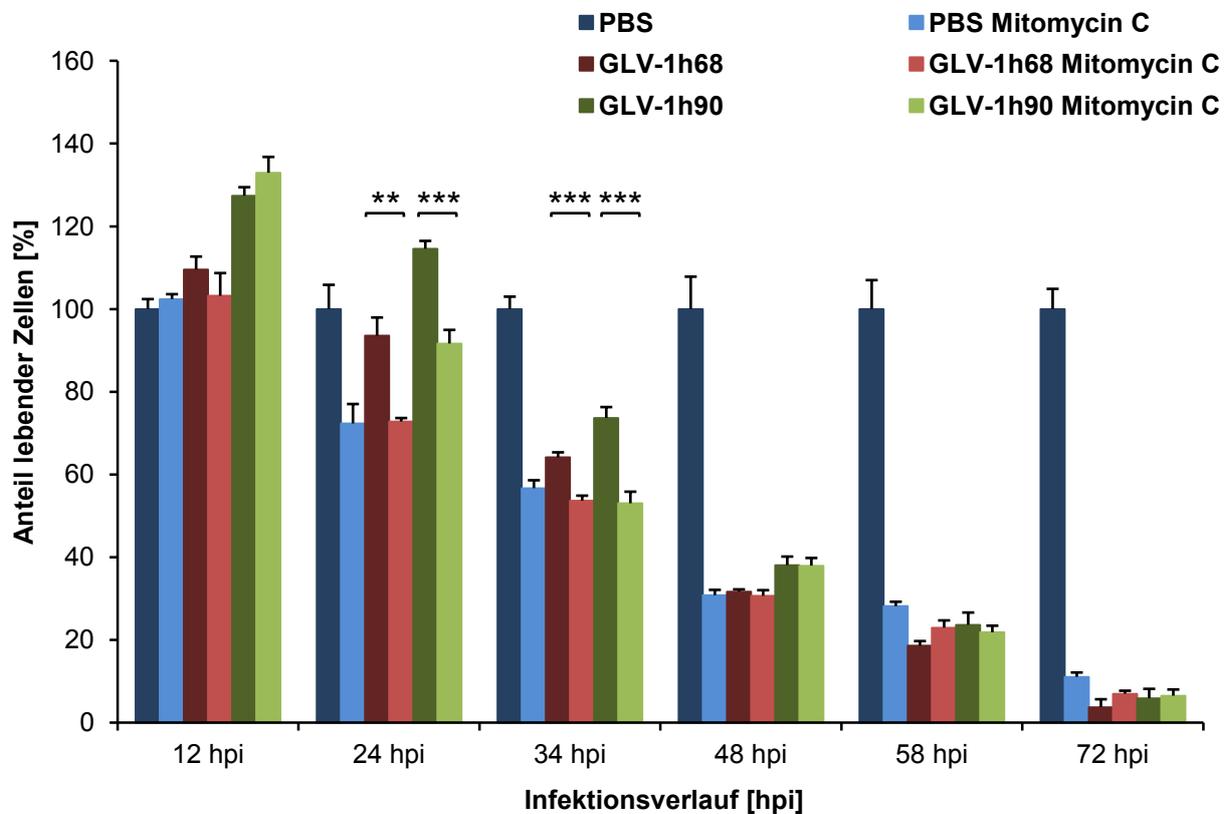


Abbildung 40: Analyse der anti-Tumorzell-Effekte von Vaccinia-Viren in Kombination mit Mitomycin C in DU-145-Zellen. Quantifizierung lebender DU-145-Zellen 12, 24, 34, 48, 58 und 72 Stunden nach der Infektion mit GLV-1h68 oder GLV-1h90 und anschließender Behandlung mit Mitomycin C mittels MTT-Proliferations-Assay. Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil lebender Zellen bezogen auf die PBS-Kontrolle mit entsprechenden Standardabweichungen (n=3). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$.

Trotz einer Beeinträchtigung der viralen Replikation zeigte der kombinatorische Einsatz von rekombinanten Vaccinia-Viren mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C keine negativen Einflüsse auf die anti-Tumor Wirkung (Abbildung 40). Während 24 Stunden nach Infektion mit beiden Virus-Konstrukten keine signifikante Zunahme toter Zellen im Vergleich zu PBS-behandelten Zellen detektiert werden konnte, reduzierte sich der Anteil an infizierten Zellen, welche zusätzlich mit Mitomycin C behandelt wurden, zu diesem Zeitpunkt bereits drastisch. GLV-1h68 plus Mitomycin C-behandelte Zellen erreichten hierbei dasselbe Level wie ausschließlich mit Mitomycin C-behandelte Zellen, wohingegen beide Ansätze mit GLV-1h90, allein und in Kombination mit Mitomycin C, deutlich höher lagen. Auch hierbei zeigte sich im Falle der kombinierten Applikation von GLV-1h90 und Mitomycin C eine signifikant höhere Zelltod-Rate. Diese Mitomycin C-bedingte signifikant erhöhte anti-Tumor-Wirkung konnte auch 34 hpi beobachtet werden, wobei hierbei kein Unterschied zwischen

GLV-1h68 und GLV-1h90 festgestellt wurde. Von 34 dpi an konnte sowohl in den jeweiligen Monotherapien, d.h. ausschließlich Mitomycin C- oder Virus-Behandlung als auch in den entsprechenden Virus plus Mitomycin C Kombinationsbehandlungen eine höhere Sterberate der DU-145-Tumorzellen als bei unbehandelten Zellen beobachtet werden. Wobei ab 48 dpi aufgrund zunehmender Virus-bedingter Zellyse keine Unterschiede zwischen Mitomycin C-behandelten oder unbehandelten infizierten Zellen mehr beobachtet wurden. Der bis 48 hpi detektierte tendenziell höhere Anteil an lebenden Zellen in GLV-1h90-infizierten im Vergleich zu PBS- oder GLV-1h68-behandelten Gruppen, sowohl mit und ohne Mitomycin C-Behandlung, verringerte sich anschließend ebenfalls aufgrund rapider Zellyse.

4.4.2 Kombinatorische Effekte von GLV-1h90 und Mitomycin C im Tierversuch

4.4.2.1 Kombinatorische Wirkung von onkolytischen Vaccinia-Viren und Mitomycin C auf die Tumorregression beim humanen Prostatakarzinoms DU-145

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Kombination von onkolytischer Virustherapie mit Chemotherapie zu Interaktionen führen kann, welche einen positiven Synergismus der therapeutischen Effekte zur Folge hat^{134,137}. Ob und in welchem Maße dies auch für onkolytische Vaccinia-Viren und Mitomycin C zutrifft, wurde im Falle der Tumorregression beim humanen Prostatakarzinom DU-145 untersucht. Auch sollte hierbei untersucht werden, ob die Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 in GLV-1h90 einen zusätzlichen Einfluss auf die Tumorregression hat. Hierbei könnten sich Unterschiede zu GLV-1h68 ergeben. DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden zunächst mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS (n=10) intravenös injiziert. Nach 4 Tagen wurde die Hälfte der Tiere je Gruppe (n=5) intravenös mit Mitomycin C injiziert. Die Verabreichung des Chemotherapeutikums fand an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt, wobei an Tag eins 4 mg/kg Körpergewicht Mitomycin C und an Tag zwei 3 mg/kg Körpergewicht injiziert wurde. Über einen Zeitraum von 31 Tagen wurde zweimal wöchentlich der Tumor mit einer digitalen Schiebelehre gemessen und das Tumolvolumen berechnet.

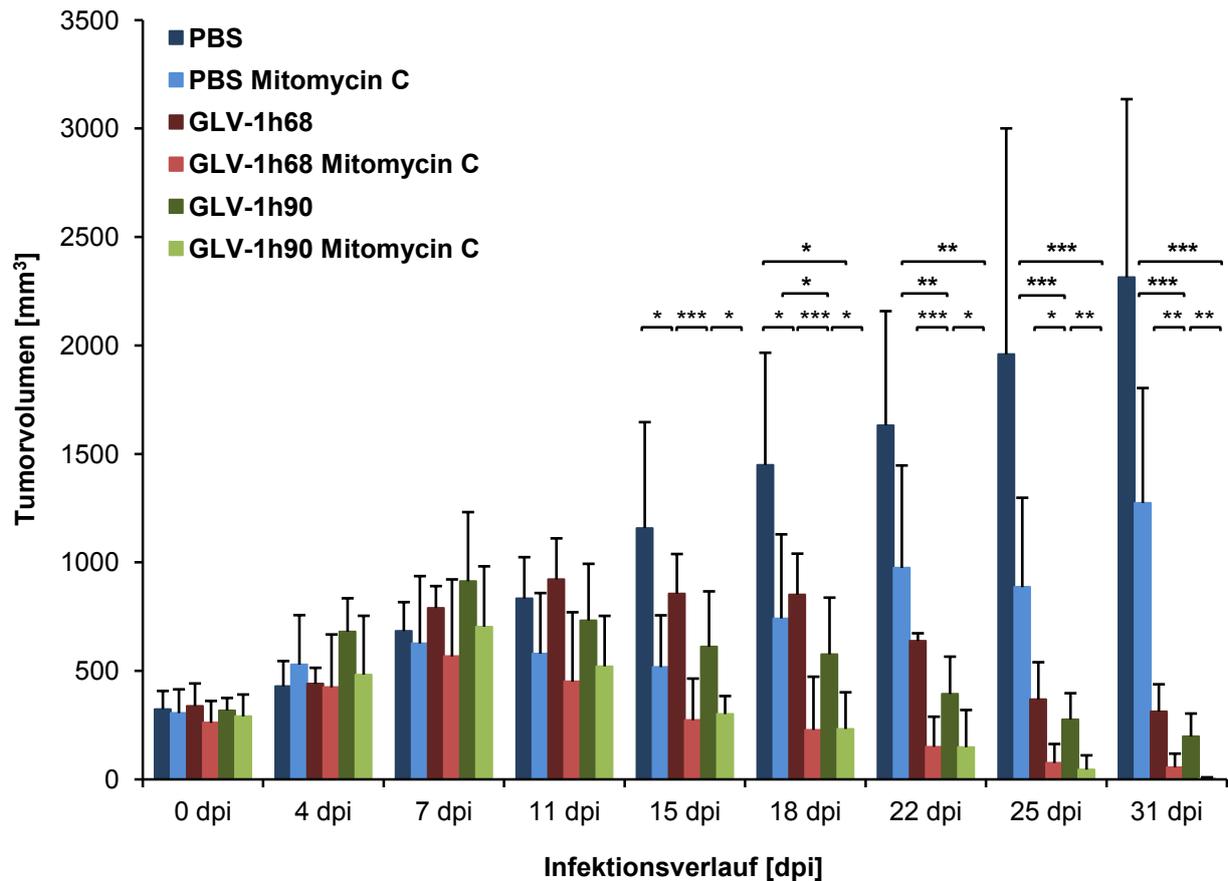


Abbildung 41: DU-145-Tumorprogression nach Kombinationstherapie mit Vaccinia-Viren und Mitomycin C. DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden intravenös mit 5×10^6 pfu GLV-1h90, GLV-1h68 oder mit PBS sowie 4 Tage später mit Mitomycin C injiziert. Über einen Infektionsverlauf von 31 Tagen wurde das Tumorstadium zweimal wöchentlich bestimmt ($0,52 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$). Dargestellt ist das durchschnittliche Tumorstadium in mm^3 mit entsprechender Standardabweichung ($n=5$). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$. Hervorgehoben sind ausschließlich signifikante Unterschiede, welche durch eine zusätzliche Behandlung mit Mitomycin C entstanden sind.

Die Kombinationstherapie mit onkolytischen Vaccinia-Viren und Mitomycin C führte zu einer signifikant verbesserten Tumorregression im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien (Abbildung 41). Bereits 15 Tage nach der Virus-Injektion (15 dpi) konnten signifikante Unterschiede zwischen ausschließlich Virus-injizierten Mäusen und Mäusen, welche die Kombinationstherapie erhielten, festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumore aus den Kombinationsgruppen bereits annähernd das Ausgangsvolumen von durchschnittlich 280 mm^3 erreicht. Im Gegensatz dazu, dauerte dies in GLV-1h90-injizierten Mäusen ~ 22 Tage und in GLV-1h68-injizierten ~ 25 Tage. Die Therapie mit Mitomycin C allein führte ausschließlich 15 und 18 dpi zu einer signifikanten Tumorregression. Im weiteren experimentellen Verlauf konnte hingegen eine erneute Volumenzunahme beobachtet werden.

Bei vergleichender Betrachtung beider Virus-Konstrukte konnte in GLV-1h90-injizierten Mäusen eine tendenziell beschleunigte Tumorverringerng beobachtet werden, wobei diese

allerdings auch hier keine statistische Signifikanz erreichte. Dasselbe traf für die Kombination mit Mitomycin C zu. Obwohl die jeweilige Kombinationstherapie zu einer signifikant verbesserten Tumorregression führte, konnte auch hier kein Unterschied zwischen beiden Virus-Konstrukten nachgewiesen werden.

4.4.2.2 Einfluss von Mitomycin C auf systemisch-vermittelte Hyper-IL-6 Effekte

Es konnte gezeigt werden, dass das von GLV-1h90-kodierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 nach intratumoraler Überexpression aktiv in die Blutzirkulation sezerniert wird und auf diesem Weg eine Reihe systemisch-vermittelter Effekte auslösen kann. Zu diesen Effekten zählten unter anderem solche, die zu einem verbesserten Gesundheitszustand der behandelten Mäuse beitragen können. Aufgrund der Tatsache, dass eine Chemotherapie oft erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringt, die den Gesundheitszustand der Patienten massiv verschlechtern, wurde deshalb untersucht, ob in einer Kombinationstherapie mit GLV-1h90, neben dem beschleunigten therapeutischen Effekt, zusätzlich eine Verringerung der Mitomycin C-versursachten Nebenwirkungen durch Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 erreicht werden kann.

4.4.2.2.1 Körpergewicht von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von Vaccinia-Viren und Mitomycin C

In Vorversuchen mit Mitomycin C wurde bereits 3 Tage nach intravenöser Mitomycin C-Injektion ein signifikanter Gewichtsverlust im Vergleich zu unbehandelten Mäusen beobachtet (Abbildung 42). Erst 8 Tage später (11 dpi) normalisierte sich das Netto-Körpergewicht langsam wieder und erreichte 18 dpi annähernd das Gewicht von unbehandelten Mäusen.

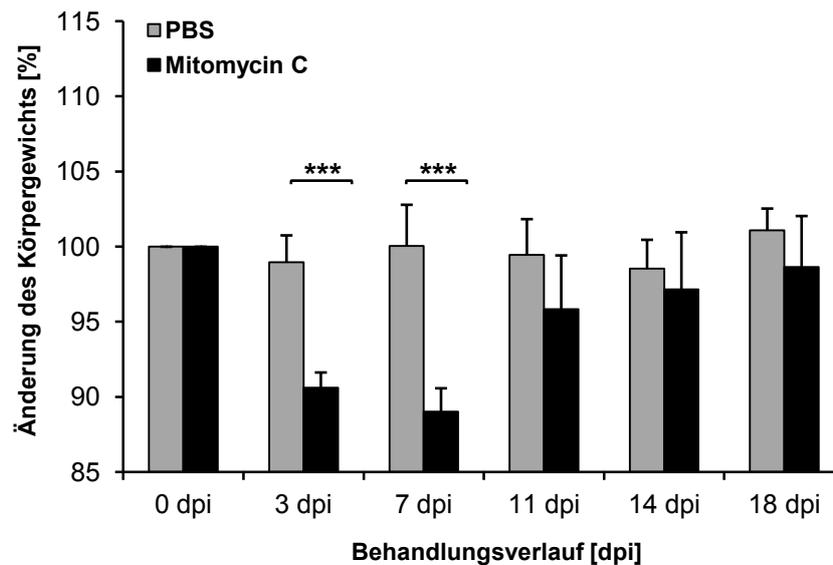


Abbildung 42: Änderung des Körpergewichts von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach Behandlung mit Mitomycin C. DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde intravenös an zwei aufeinanderfolgenden Tagen Mitomycin C sowie als Kontrolle PBS injiziert. Über einen Zeitraum von 18 Tagen nach der Injektion wurde sowohl das Körpergewicht als auch das Tumolvolumen bestimmt. Dargestellt ist das berechnete Netto-Körpergewicht, d.h. Körpergewicht ohne das Gewicht des Tumors, als prozentuale Änderungsangaben mit Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; *** $p \leq 0,005$.

Zusätzlich konnte in vorangehenden Experimenten gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem Hyper-IL-6-exprimierende Vaccinia-Virus GLV-1h90 während des Infektionsverlaufs zu einer massiven Zunahme des Netto-Körpergewichts von injizierten Mäusen führt (Abbildung 29B). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob in einer Kombinationstherapie von Mitomycin C und GLV-1h90 das exprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 in der Lage ist, den von Mitomycin C-ausgelösten Gewichtsverlust der behandelten Mäuse zu reduzieren. Der Versuchsablauf erfolgte analog zu 4.4.2.1, nur, dass hierbei zusätzlich zu dem Tumolvolumen auch das Körpergewicht der unterschiedlich behandelten Mäuse gemessen wurde, woraus sich anschließend das Netto-Körpergewicht berechnen ließ.

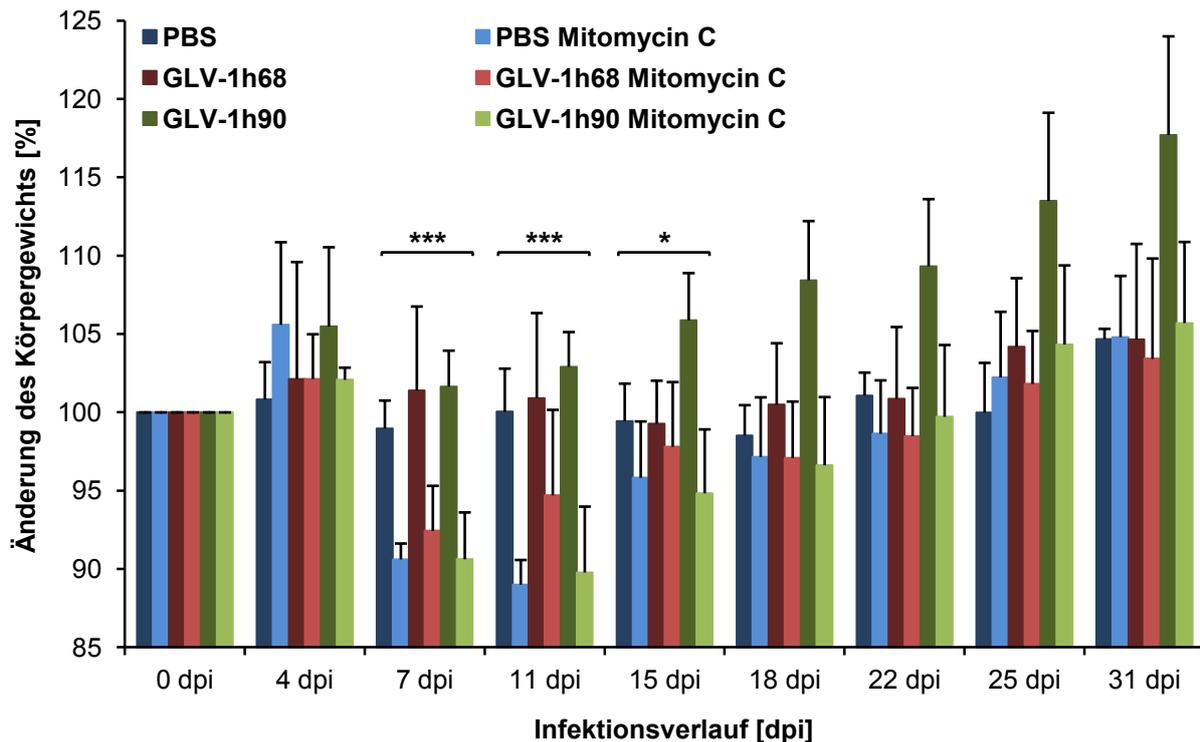


Abbildung 43: Körpergewicht von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von Vaccinia-Viren und Mitomycin C. Von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde über einen Zeitraum von 31 Tagen nach der Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS sowie 4 Tage später mit Mitomycin C sowohl das Körpergewicht als auch das Tumolvolumen bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Änderung des Netto-Körpergewichts mit Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,005$.

Wie bereits der Vorversuch zeigte, konnte auch hierbei 7 dpi, d.h. 3 Tage nach der intravenösen Injektion von Mitomycin C ein signifikanter Gewichtsverlust im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen beobachtet werden (Abbildung 43). Diese Gewichtsabnahme trat allerdings in allen drei Kombinationsgruppen gleich stark auf, ohne Unterschied zwischen GLV-1h90-, GLV-1h68- oder PBS-Injektion. Auch die Regenerationsphase verlief in allen drei Kombinationsgruppen identisch. Während zwischen 7 und 15 dpi eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen nachweisbar war, normalisierte sich das Körpergewicht der Kombinationsgruppen ab 18 dpi wieder und erreichten dieselben Level wie PBS- oder GLV-1h68-injizierte Mäuse. Auch in diesem Versuch war die starke Zunahme des Netto-Körpergewichts von GLV-1h90-injizierten Mäusen zu beobachten. Allerdings konnte durch zusätzliche Expression von Hyper-IL-6 im Kombinationsmodell von GLV-1h90 und Mitomycin C kein Ausgleich des Chemotherapie-bedingten Gewichtsverlustes erreicht werden.

4.4.2.2 Einfluss von Mitomycin C auf die Hyper-IL-6-vermittelte Wundheilung bei Virus-induzierten Schwanzläsionen

Im selben Versuchsansatz wurde zusätzlich die Hyper-IL-6-bedingte Wundheilung von Virus-induzierten Schwanzläsionen untersucht. Die Quantifizierung sichtbarer Läsionen über den Infektionsverlauf von 31 Tagen sowohl von GLV-1h68- und GLV-1h90-injizierten Mäusen als auch von den jeweiligen Kombinationsgruppen mit Mitomycin C ergab keine Beeinträchtigung der Wundheilung durch das Chemotherapeutikum (Abbildung 44). Bei vergleichender Betrachtung beider Virus-Konstrukte ohne Mitomycin C konnte auch hierbei bis 7 dpi eine mengenmäßig identische Bildung von Schwanzläsionen nachgewiesen werden, wobei im weiteren Infektionsverlauf die Anzahl der GLV-1h90-induzierten Läsionen stark abnahm und 31 dpi statistische Signifikanz erreichte. Die Anzahl der GLV-1h68-induzierten Läsionen, welche keine Anzeichen von Wundheilung aufwiesen, nahm hingegen leicht zu. In den entsprechenden Kombinationsgruppen mit Mitomycin C konnte ein annähernd identischer Verlauf beobachtet werden. Die Anzahl der Schwanzläsionen von GLV-1h68- und Mitomycin C-injizierten Mäusen stieg während des Infektionsverlaufs ebenfalls an und erreichte 15 dpi mit durchschnittlich 2,5 Läsionen pro Maus ein Maximum, welches dann über den weiteren zeitlichen Verlauf hin konstant blieb. Dagegen entwickelten GLV-1h90- und Mitomycin C-injizierte Mäuse zu Beginn des Infektionsverlaufs mit maximal einer Läsion pro Maus (7 dpi) im Vergleich zu GLV-1h90-injizierten Mäusen (2,2 Läsionen pro Maus) eine geringere Anzahl an Schwanzläsionen. Im weiteren Infektionsverlauf wurden diese zusätzlich aufgrund von Wundheilungsprozessen reduziert und erreichten 31 dpi mit durchschnittlich 0,5 Läsionen pro Maus im Vergleich zu 3,1 GLV-1h68-induzierte Läsionen pro Maus statistische Signifikanz.

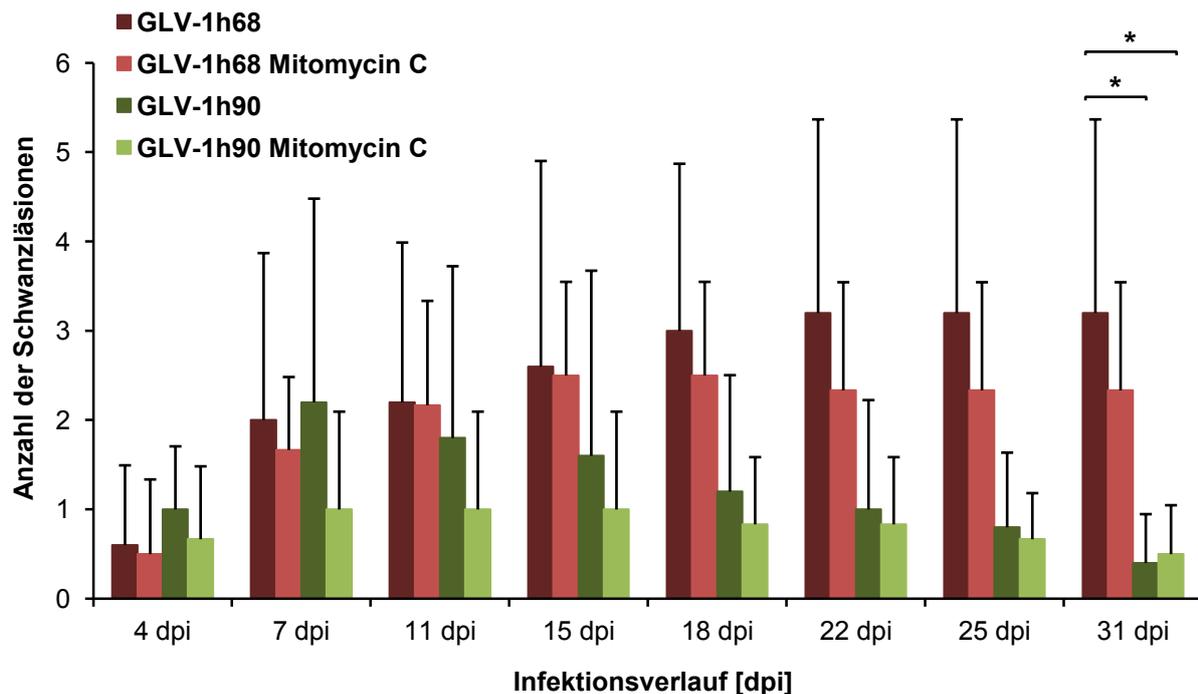


Abbildung 44: Anzahl der Virus-induzierten Schwanzläsionen von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von Vaccinia-Viren und Mitomycin C. DU-145-Tumor-tragende Mäuse wurden intravenös mit GLV-1h90 oder GLV-1h68 sowie 4 Tage später mit Mitomycin C in die laterale Schwanzvene injiziert und in einem Infektionsverlauf von 31 Tagen die Anzahl der entstehenden Schwanzläsionen bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen (n=5). $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$.

Bei näherer Betrachtung der GFP-Expression in diesen Schwanzläsionen war deutlich zu erkennen, dass 31 dpi sowohl Läsionen von GLV-1h68-injizierten als auch von GLV-1h68 plus Mitomycin C-injizierten Mäusen weitaus stärker infiziert waren als die der GLV-1h90-Gruppen. Auch hier konnten unterschiedliche Morphologien der Läsionen beobachtet werden. Während Läsionen beider GLV-1h68-Gruppen Ähnlichkeit zu offenen Wunden hatten, konnte bei Läsionen von GLV-1h90- oder GLV-1h90 plus Mitomycin C-injizierten Mäusen der beschleunigte Wundverschluss anhand einer dicken Epithelschicht detektiert werden (Abbildung 45). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Chemotherapeutikum Mitomycin C keinen Einfluss auf die Hyper-IL-6-vermittelte beschleunigte Wundheilung ausübt.

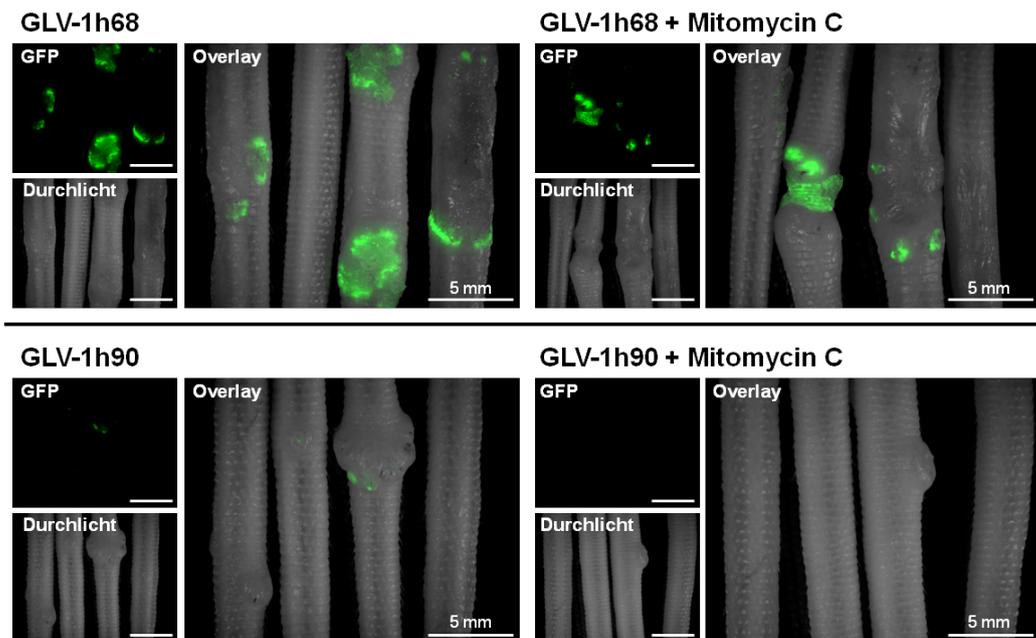


Abbildung 45: Wundverschluss von Virus-bedingten Schwanzläsionen mit Mitomycin C. DU-145-Tumor-tragende Mäuse 31 Tage nach i.v. Injektion von GLV-1h90 oder GLV-1h68, jeweils mit und ohne Injektion von Mitomycin C. GFP-Expression (grün). Dargestellt sind repräsentative Beispiele.

4.4.2.2.3 Einfluss von Hyper-IL-6 auf die Mitomycin C-induzierte Thrombozytopenie

Die häufigsten Nebenwirkungen von Chemotherapien werden dadurch verursacht, dass alle schnell proliferierenden Zellen des Körpers an der Zellteilung gehemmt werden. Betrifft diese Hemmung das blutbildende System, spricht man von einer Myelosuppression⁵. In Krebspatienten nach einer Chemotherapie ist Thrombozytopenie die am häufigsten auftretende Form der Myelosuppression, bei der es zu einer massiven Reduktion der Thrombozyten-Zahl im Blut kommt⁶. In vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass es nach systemischer Applikation des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse zu einem starken Anstieg der Thrombozyten-Zahl im Blut kam. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob in einer Kombinationstherapie von Mitomycin C und GLV-1h90 das exprimierte *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 in der Lage ist, durch Stimulierung der Megakaryopoese der Mitomycin C-induzierten Thrombozytopenie entgegenzuwirken. Hierfür wurden DU-145-Tumor-tragende Mäuse analog zu 4.4.2.1 mit Vaccinia-Viren und Mitomycin C behandelt. Als Kontrolle dienten hierbei ausschließlich PBS-injizierte Mäuse. 8, 11, 14, 18, 21 und 25 dpi wurde den Mäusen 50 µl Blut aus dem retro-orbitalen Plexus entnommen und mit Hilfe eines Sysmex KX-21 *automatic micro-cell counters* die Thrombozyten-Zahl bestimmt.

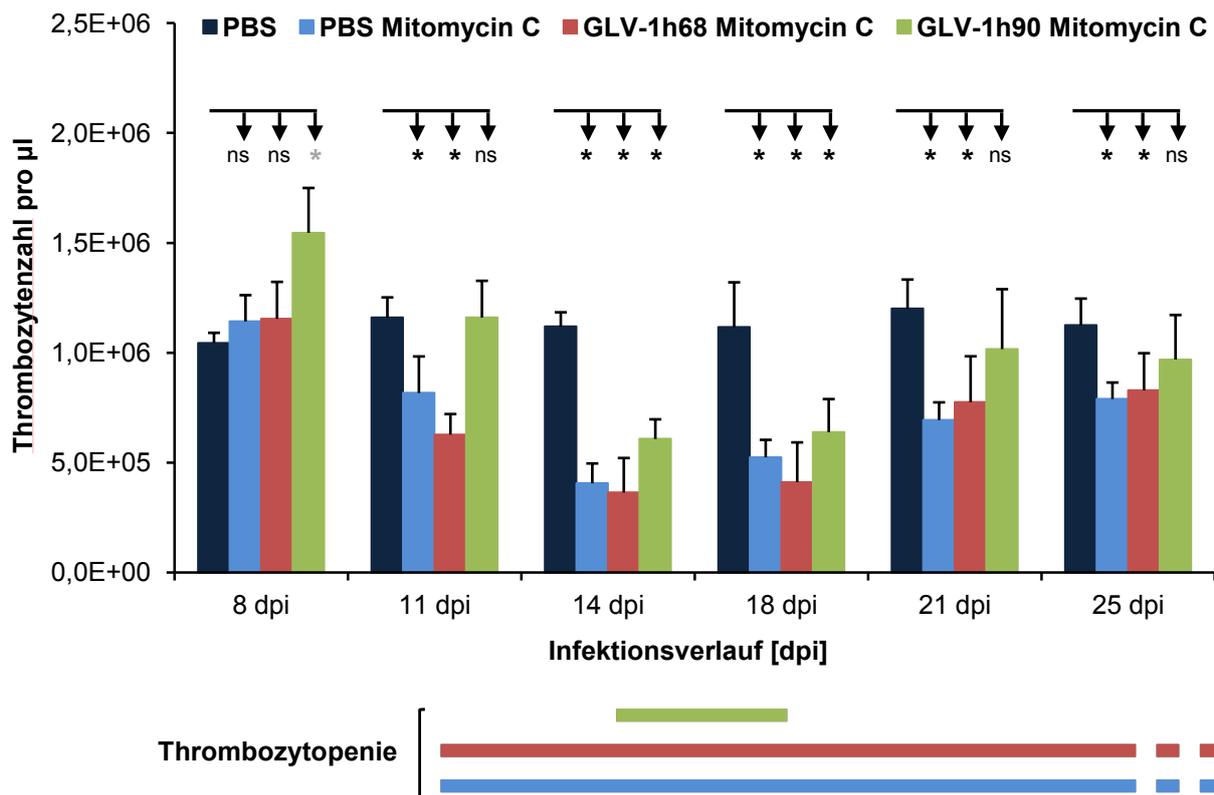


Abbildung 46: Bestimmung der Thrombozyten-Zahl in Blut-Proben von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von Vaccinia-Viren und Mitomycin C. In Vollblut-Proben von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen nach Injektion von GLV-1h90, GLV-1h68 oder PBS jeweils in Kombination mit Mitomycin C die Thrombozyten-Zahl bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Thrombozyten-Zahl pro µl Vollblut mit entsprechenden Standardabweichungen (n=5). Thrombozytopenie wurde definiert als signifikante Verringerung der Thrombozyten-Zahl im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen. $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen; * $p \leq 0,05$. * signifikante Erhöhung der Thrombozyten-Zahl. ns nicht signifikant. Die waagerechten Balken unterhalb des Diagramms kennzeichnen die Dauer der jeweiligen Thrombozytopenie.

Anhand der Untersuchung der Thrombozyten-Zahl (Abbildung 46) konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu PBS-injizierten Mäusen eine Behandlung mit Mitomycin C sowohl in der PBS plus Mitomycin C- als auch in der GLV-1h68 plus Mitomycin C-Gruppe bereits 11 dpi zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozyten-Zahl im Blut führte. Diese Thrombozytopenie überdauerte in beiden Gruppen mindestens 14 Tage (11-25 dpi). Im Gegensatz dazu konnte bei einer Kombinationstherapie von Mitomycin C und GLV-1h90 eine signifikant verkürzte Dauer der Thrombozytopenie beobachtet werden. Sowohl ein verzögertes Eintreten als auch eine beschleunigte Regenerierung verkürzten die Zeitspanne, in welcher eine signifikant reduzierte Thrombozyten-Zahl zu beobachten war, auf weniger als eine Woche. Demnach ist GLV-1h90-produziertes Hyper-IL-6 in einer Kombinationstherapie von onkolytischen Vaccinia-Viren und dem Chemotherapeutikum Mitomycin C in der Lage der Chemotherapie-induzierten Thrombozytopenie entgegenzuwirken.

5 Diskussion

Die heute vorherrschenden konventionellen Therapiemethoden zur Behandlung von Krebserkrankungen unterliegen trotz kontinuierlicher Optimierung immer noch deutlichen Defiziten bezüglich Effektivität und Verträglichkeit. Aus diesem Grund wird intensiv über neuartige Therapieansätze geforscht. Die Bekämpfung von Krebserkrankungen mit onkolytischen Viren gilt dabei als vielversprechend¹³⁸. Aufgrund ihrer teils originären oder durch gentechnische Veränderung hervorgerufene Tumorspezifität sind onkolytische Viren in der Lage, nach systemischer Applikation spezifisch in Tumorgewebe einzudringen, sich darin zu replizieren und auf diesem Weg eine effiziente Tumorregression hervorzurufen. Während erste rekombinante onkolytische Viren bereits in klinischen Studien ausführlich getestet werden¹³⁹⁻¹⁴⁰, beschäftigt sich die aktuelle Forschung bereits mit der Verbesserung und Weiterentwicklung dieser Viren. Besonders erfolgsversprechend erscheint dabei die Möglichkeit, onkolytische Viren als Vektorsysteme einzusetzen und auf diesem Weg sowohl therapeutische als auch diagnostische Reportergene im Tumor zu exprimieren²⁵. Therapeutische Proteine sind dabei in der Lage, über Strategien, wie die Blockierung der Angiogenese²⁶, die Aktivierung von sogenannten *Prodrugs*³¹⁻³⁴ oder Stimulierung einer Immunantwort gegen den Tumor²⁷⁻³⁰, die Virus-vermittelte Tumor-Bekämpfung zu unterstützen. Darüber hinaus kann dieses Expressionssystem auch genutzt werden, um therapeutische Proteine im Tumor zu exprimieren, welche nicht nur auf die Tumorregression abzielen, sondern zusätzlich zielgerichtet positive systemische Effekte auslösen können. In dieser Arbeit wurde ein onkolytisches Vaccinia-Virus untersucht, welches zur Produktion des multifunktionellen *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 führt (GLV-1h90), um sowohl additive Effekte auf die Tumorregression als auch mögliche systemisch-vermittelte Hyper-IL-6-Effekte zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde das Replikationsverhalten des rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h90 im Vergleich zum Parentalvirus GLV-1h68 in DU-145-Zellen mittels Plaque-Assay analysiert. Sowohl in GLV-1h90- als auch in GLV-1h68-infizierten Zellen lag der virale Titer zwischen 12-48 hpi in den Zellen deutlich über der Viruskonzentration in den jeweiligen Zellkulturüberständen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Vaccinia-Viren in unterschiedlichen infektiösen Formen vorliegen, welche sich durch ihre Lokalisation unterscheiden. In der Zelle kommen die Viren als IMVs (*intracellular mature virions*) vor, wohingegen das Vaccinia-Virus als EEV-Form (*extracellular enveloped virus*) in das umgebende Medium freigesetzt wird. Aufgrund der Tatsache, dass EEVs selbst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion noch membrangebunden vorliegen¹⁴¹, bleiben diese nach Entfernen des Mediums an den infizierten Zellen haften. In diesem Stadium werden sie als

CEVs (*cell-associated virions*) bezeichnet und wurden demnach bei der späteren Konzentrationsbestimmung zu den intrazellulären IMVs gezählt.

In den Versuchsansätzen beider Virus-Konstrukte war ab 48 hpi ein starker Abfall der intrazellulären Viruskonzentration zu verzeichnen, während die Konzentrationen in den Zellkulturüberständen weiter anstiegen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass von diesem Zeitpunkt an annähernd jede Zelle infiziert war und die virale Replikation allmählich eingestellt wurde. Zusätzlich kam es zunehmend zur Zellyse von infizierten Zellen, wodurch intrazelluläre IMV-Partikel in den Überstand austreten und so die Werte bei der Konzentrationsbestimmung verfälschen können.

Zusammenfassend war deutlich zu erkennen, dass beide Virus-Konstrukte ein annähernd identisches Replikationsverhalten aufwiesen, sowohl in Bezug auf den zeitlichen Verlauf als auch auf die produzierte Virusmenge. Die Insertion des *Designer-Zytokins Hyper-IL-6* hatte somit keinen negativen Einfluss auf die virale Replikation in DU-145-Zellen in Zellkultur.

Die vergleichende Untersuchung der Markergenexpression β -Galaktosidase sowie *Ruc-GFP* beider Virus-Konstrukte in DU-145-Zellen mittels Western Blot ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen GLV-1h90 und GLV-1h68. Der Beginn der Expression des Markerproteins β -Galaktosidase konnte in Zellysat-Proben von infizierten Zellen beider Virus-Konstrukte 12-24 hpi beobachtet werden. Dagegen konnte die Expression des Markerproteins *Ruc-GFP* bereits 8-12 hpi, demnach etwas früher, nachgewiesen werden. Da diese zeitliche Verschiebung bei beiden Virus-Konstrukten zu verzeichnen war, könnte eine mögliche Erklärung die unterschiedlichen Promotoren beider Markergene betreffen. *Ruc-GFP* steht unter der Kontrolle von $P_{S_{EL}}$ und *lacZ* unter Kontrolle von $P_{7.5}$. Obwohl es sich bei beiden Promotoren um *early-late*-Promotoren handelt, konnten Erfahrungswerte zeigen, dass der $P_{7.5}$ -Promotor eine minimal schwächere Kapazität aufweist als der synthetische $P_{S_{EL}}$ -Promotor. Darüber hinaus wäre ebenso denkbar, dass der verwendete β -Gal-Antikörper möglicherweise eine geringere Spezifität im Vergleich zu dem GFP-Antikörper aufwies. Im weiteren Infektionsverlauf stiegen die Mengen beider Markerproteine aufgrund fortschreitender Virus-Amplifikation leicht an, nahmen 72 hpi allerdings wieder ab. Dies könnte zum einen daran liegen, dass in dieser Bande weniger Gesamtprotein aufgetragen wurde oder viel wahrscheinlicher, dass zu diesem Zeitpunkt die Zellyse bereits weit fortgeschritten war, wodurch intrazelluläre Proteine ins umgebende Medium gelangen konnten und demnach in Zellysat-Proben nicht mehr zu detektieren waren.

Neben der Beobachtung, dass beide Virus-Konstrukte über ein identisches Replikationsverhalten verfügen, konnte gezeigt werden, dass beide Viren ein identisches Muster der Markergenexpression aufweisen. Dies führt zu der Annahme, dass in späteren *in vivo* Experimenten nach Injektion von GLV-1h90 mögliche Unterschiede in der

Tumorregression oder auch auftretende systemische Effekte ausschließlich auf das integrierte Gen für das *Designer*-Zytokin Hyper-IL-6 zurückzuführen sind.

Auch die Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 konnte durch den Einsatz unterschiedlicher Methoden in GLV-1h90-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Sowohl in Western Blot-Analysen als auch mit Hilfe eines ELISAs konnte Hyper-IL-6 sowohl in Zelllysaten als auch in Überständen von GLV-1h90-infizierten Zellen bereits 12-24 hpi dokumentiert werden. Die Beobachtung, dass die Menge an Hyper-IL-6 im Zellkulturüberstand während des Infektionsverlaufs kontinuierlich anstieg, wohingegen die Mengen in den Zellen konstant blieb, führt zu der Annahme, dass Hyper-IL-6 sofort nach der Expression in das umgebende Medium sezerniert wird. Die Quantifizierung der produzierten Hyper-IL-6-Menge über ELISA ergab 72 hpi eine maximale Menge in Zellkulturüberständen von 783 ng/6-Well, während in Zelllysaten bereits 48 hpi ein Maximum mit 151 ng/6-Well erreicht wurde. Die anschließende Reduktion der Hyper-IL-6-Mengen in den Zelllysaten sowie die weitere Zunahme in den Überständen, lässt sich auf die Lyse infizierter Zellen zurückführen, wodurch intrazellulär produziertes Hyper-IL-6 in das umgebende Medium gelangt und dort gemeinsam mit dem sezernierten Hyper-IL-6 gemessen wurde. Erwartungsgemäß konnte ausschließlich nach GLV-1h90- und nicht nach GLV-1h68-Infektion von DU-145-Zellen eine Hyper-IL-6-Expression detektiert werden. Sowohl in den Western Blot-Analysen als auch im ELISA konnte allerdings auch ein geringes IL-6-Signal in GLV-1h68-infizierten DU-145-Zellen beobachtet werden. Dabei handelt es sich entweder um unspezifische Bindungsstellen der IL-6-Antikörper oder aber um endogen in der Zelle vorhandenes IL-6.

Der Nachweis, dass Hyper-IL-6 direkt nach der intrazellulären Expression von der infizierten Zelle ins umgebende Medium sezerniert wurde, bildet die Voraussetzung dafür, dass das *Designer*-Zytokin bei einer Anwendung von GLV-1h90 *in vivo* nach intratumoraler Expression zur systemischen Wirkung in den Körperkreislauf gelangt und somit nicht nur lokal seine Wirkung entfalten kann.

IL-6 führt über den *JAK/STAT*-Signalweg zur Phosphorylierung von STAT3 und zu dessen Translokation in den Zellkern⁸². Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivität auch für das von GLV-1h90-exprimierte Hyper-IL-6 ausgeübt wird. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnten phosphorylierte STAT3-Moleküle ausschließlich in DU-145-Zellen detektiert werden, welche mit dem Hyper-IL-6-haltigen Überstand von GLV-1h90-infizierten Zellen oder mit der Positiv-Kontrolle Onkostatine M behandelt wurden. Darüber hinaus konnte durch Immunfluoreszenz-Färbung die direkte Translokation phosphorylierter STAT3-Proteine in den Zellkern von Hyper-IL-6-behandelten DU-145-Zellen verfolgt werden.

Diese Aktivierung der *JAK/STAT*-Signalkaskade *in vitro* belegt die funktionelle Aktivität des von GLV-1h90-exprimierten *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6, welches somit alle Voraussetzung erfüllt, auch *in vivo* Effekte hervorzurufen.

Bei dem rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h68 handelt es sich um ein bezüglich Effizienz und Tumorspezifität optimiertes onkolytisches Virus, dessen intratumorale Replikation bereits für eine Reihe von Tumor-Modellen gezeigt werden konnte^{126,132-135}. Ob sich durch die Integration des *Designer-Zytokins* Hyper-IL-6 Unterschiede in der Replikation ergeben, sollte in DU-145-Tumor-tragenden Mäusen nach intravenöser Injektion von GLV-1h90 sowie als Kontrolle mit GLV-1h68 untersucht werden. Eine Möglichkeit, die virale Replikation *in vivo* über einen gewissen Zeitraum *live* zu verfolgen, stellt das Fluoreszenz-*Imaging* dar. Anhand der Virus-vermittelten Expression des Markergens *Ruc-GFP*, welches als Indikator für die Menge der amplifizierten Virus-Partikel eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass sich bereits 7 dpi sowohl in GLV-1h90- als auch in GLV-1h68-injizierten Mäusen Virus-Partikel im Tumor befanden. Im weiteren Infektionsverlauf nahm die GFP-Expression bei GLV-1h68-injizierten Mäusen jedoch stark zu, während GLV-1h90-injizierte Mäuse ein konstantes GFP-Signal aufwiesen. Dies lässt zunächst vermuten, dass die Replikation von GLV-1h90 im Vergleich zu GLV-1h68 in diesem Tumor-Modell stark eingeschränkt war. Da es sich hierbei allerdings ausschließlich um eine visuelle Bewertung handelt, können keine direkten Rückschlüsse auf die eigentliche Virus-Replikation oder die Mengen der viralen Partikel im Tumorgewebe gezogen werden. Es wird angenommen, dass nach intravenöser Virus-Injektion nur wenige Virus-Partikel über durchlässige Blutgefäße in den Tumor gelangen und dort Tumorzellen infizieren. Ausgehend von diesen wenigen Zellen breitet sich das Virus durch sogenanntes „*Spreading*“ von Zelle zu Zelle weiter aus, wodurch kleine infizierte Bereiche entstehen, welche als *Virus-Patch* bezeichnet werden. Befindet sich ein solches *Virus-Patch* nicht an der Oberfläche des Tumors, kann das dort lokalisierte GFP-Signal über Fluoreszenz-*Imaging* nicht detektiert werden, wodurch das Ergebnis verfälscht werden kann. Eine genauere Methode, um den Verlauf der Virus-Replikation in Tumorgewebe zu verfolgen, ist die Bestimmung der Virus-Menge mit Hilfe von *Plaque Assays*. Hierbei konnte gezeigt werden, dass über einen Infektionsverlauf von 14 Tagen die intratumoralen Titer sowohl von GLV-1h68 als auch von GLV-1h90 im Gegensatz zu der visuellen Auswertung mit Hilfe des Fluoreszenz-*Imagings* drastisch anstiegen. Allerdings war auch hier eine tendenziell effektivere Replikation von GLV-1h68 zu verzeichnen, wobei die Unterschiede zu GLV-1h90 keine statistische Signifikanz erreichten.

Grundvoraussetzung für eine gezielte Krebstherapie mit onkolytischen Viren ist eine hohe Tumorspezifität der Viren, wodurch nicht nur eine effiziente Tumor Bekämpfung, sondern auch eine Verringerung der Nebenwirkungen erzielt werden kann. Die Untersuchung der

Virus-Menge in Lunge und Leber der Virus-injizierten Tumor-tragenden Mäuse ergab minimale Mengen in beiden Virus-Gruppen. Auch hier konnten tendenziell weniger Virus-Partikel in Organen von GLV-1h90-injizierten im Vergleich zu GLV-1h68-injizierten Mäusen nachgewiesen werden. Aufgrund zu großer Divergenz innerhalb der Gruppen konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Neben der intratumoralen Amplifikation sowie der Ruc-GFP-Expression von GLV-1h90 nach intravenöser Injektion von DU-145-Tumor-tragenden Mäusen, konnte zusätzlich die Expression des integrierten *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 bestätigt werden. Die Quantifizierung der Hyper-IL-6-Menge über einen Infektionsverlauf von 14 Tagen erfolgte durch Einsatz eines IL-6-spezifischen ELISAs und ergab eine maximale Hyper-IL-6-Menge 9 dpi mit Werten um 7900 ng/g Tumorgewebe. Die anschließende Reduktion der detektierten Mengen lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass zu diesem Zeitpunkt der Großteil des Tumorgewebes infiziert war, sich vergrößerte nekrotische Areale bildeten, die Replikation und damit die Protein-Expression allmählich eingestellt wurde und es zur Lyse der infizierten Tumorzellen kam. Durch immunhistologische Fluoreszenz-Färbung von GLV-1h90-infizierten Tumorschnitten konnte die intratumorale Hyper-IL-6-Expression zusätzlich bestätigt werden. Entscheidend war die Tatsache, dass Hyper-IL-6 außerdem in Serum-Proben von GLV-1h90-injizierten Mäusen nachgewiesen werden konnte, wobei sich die Kinetik der Hyper-IL-6-Sekretion während des Infektionsverlaufs analog zu der Kinetik der intratumoralen Expression des *Designer*-Zytokins verhielt. Erst nach einer aktiven Sekretion von infizierten Tumorzellen ist Hyper-IL-6 in der Lage, an seinen Rezeptor gp130 zu binden und auf diesem Weg funktionelle Aktivität zu entwickeln. Darüber hinaus bildet der Transport in die Blutbahn die Voraussetzung für systemisch vermittelte Hyper-IL-6-Effekte. In Serumproben von GLV-1h68- oder PBS-injizierten Mäusen konnten, genau wie in den Tumorschnitten, konstant geringe Mengen (Hyper-)IL-6 nachgewiesen werden. Da die Detektion des Fusionsproteins mit einem IL-6-Antikörper durchgeführt wurde, könnte es sich hierbei einerseits um endogen-vorhandenes IL-6 handeln, welches sowohl von murinen Zellen des Organismus als auch von humanen Tumorzellen stammen könnte. Da die Aminosäure-Sequenzen des murinen und des humanen IL-6 eine 42%ige Homologie aufweisen¹⁴²⁻¹⁴⁴, ist es möglich, dass der Antikörper in der Lage ist, beide Formen zu erkennen, weshalb eine klare Herkunft des detektierten Zytokins in den Serumproben nicht aufgeklärt werden kann.

Bei IL-6 handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin, welchem von vielen Gruppen sowohl Tumor-fördernde¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ als auch Tumor-inhibierende^{108,110} Wirkungen zugeschrieben werden. Tumor-inhibierende Effekte werden dabei insbesondere in Zusammenhang mit dem

löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) und einer Signaltransduktion über das IL-6-*Trans-Signaling* gebracht. Aufgrund der Tatsache, dass GLV-1h90 das Gen für das *Designer-Zytokin* Hyper-IL-6 trägt, nämlich das Fusionsprotein aus humanem IL-6 und seinem sIL-6-R, wurde untersucht, ob sich durch die Überexpression dieses Proteins im Tumor zusätzlich zu den onkolytischen Eigenschaften des Vaccinia-Virus anti-Tumor-Effekte ergeben. Eine Beobachtung der DU-145-Tumorregression nach intravenöser Injektion von GLV-1h90 und GLV-1h68 zeigte von 18 dpi an eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens bei beiden Virus-Konstrukten. Bei vergleichender Betrachtung beider Viren konnte bei GLV-1h90-injizierten Mäusen allerdings eine tendenziell beschleunigte Tumorroverringung beobachtet werden, wobei ausschließlich zu dem Zeitpunkt 22 dpi eine statistische Signifikanz vorlag. Ob und in welchem Maß diese minimale Verbesserung der Tumorroverregression auf die zusätzliche Integration von Hyper-IL-6 zurückzuführen ist, muss in weiteren Studien geklärt werden. Möglicherweise nimmt in dem hier eingesetzten Prostatakarzinom-Modell die Virus-vermittelte Onkolyse bei der Tumorthherapie eine übergeordnete Rolle ein, wodurch mögliche immunologische Effekte, ausgelöst durch Hyper-IL-6, maskiert werden. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Frage, ob Hyper-IL-6 unter den hier gewählten Bedingungen, wie etwa das spezielle Tumor-Modell oder die Promotor-abhängige Konzentration des *Designer-Zytokins* im Tumor, möglicherweise nicht in der Lage ist, eine direkte anti-Tumor Aktivität zu entwickeln oder ob es eventuell *in vivo* in einer inaktiven Form exprimiert wurde.

Basierend auf der Beobachtung, dass Hyper-IL-6 nach GLV-1h90-vermittelter Überexpression im Tumor in der Blutzirkulation nachgewiesen werden konnte, wurde im weiteren Verlauf die funktionelle Aktivität des *Designer-Zytokins* bezüglich systemisch-ausgelöster Effekte untersucht.

Als pro-inflammatorisches Zytokin spielt IL-6 eine übergeordnete Rolle in der Stimulation von Entzündungsprozessen, welche sich durch Fieber, Rekrutierung von Leukozyten und eine induzierte Produktion von Entzündungsmediatoren durch die Leber auszeichnen¹⁴⁵. Nach systemischer Applikation des Hyper-IL-6-exprimierenden Vaccinia-Virus GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse konnte, im Gegensatz zu GLV-1h68-injizierten Mäusen, eine Reihe von Effekten beobachtet werden, welche mit Entzündungsprozessen in Zusammenhang stehen. Dabei ist zunächst eine zeitlich begrenzte Rotfärbung der Haut zu nennen, welche mit Hilfe eines Maestro EX *Imaging* Systems erfasst werden konnte. Diese Rotfärbung kann möglicherweise als Folgeerscheinung von Fieber auftreten, da es mit dem Ziel der Wärmeregulierung zu peripheren Gefäßerweiterungen in der Haut kommt. Da es sich hierbei um Nacktmäuse handelte, könnte die Haut aufgrund dieser Gefäßerweiterungen eine rötlichere Farbe annehmen. Es konnte jedoch keine Änderung der Körpertemperatur bei den entsprechenden Mäusen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig wurden

erhöhte Hämoglobin-Werte gemessen (Daten nicht gezeigt). Deshalb sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den Grund für die veränderte Hautfarbe zu klären. Eine weitere Beobachtung beinhaltete sowohl eine signifikante Vergrößerung der Lebern von GLV-1h90-injizierten Mäusen im Vergleich zu PBS- oder GLV-1h68-injizierten als auch eine verstärkte Expression des Akute-Phase-Proteins CRP (C-reaktives Protein) in der Leber. Es bleibt zu diskutieren, ob die beobachtete Organvergrößerung in direktem Zusammenhang mit der Hyper-IL-6-vermittelten Stimulation der Akute-Phase-Antwort steht. Die Tatsache, dass IL-6 eine wichtige Rolle in der Initiation der Leberregeneration¹⁴⁶ spielt, könnte die Vergrößerung der Leber erklären. Es ist besonders hervorzuheben, dass die Vergrößerung der Leber, genau wie die Rotfärbung der Haut, nur vorübergehender Natur war und sich während des Infektionsverlaufes wieder normalisierte. Dies bestätigt zusätzlich einen Zusammenhang mit Hyper-IL-6, da aufgrund fortschreitender Onkolyse, die Hyper-IL-6-Expression und somit die durch das Zytokin ausgelösten Effekte selbstlimitierend sind.

Neben den bereits beschriebenen Hyper-IL-6-vermittelten Unterschieden bezüglich Entzündungsprozessen zwischen GLV-1h90- und GLV-1h68-injizierten Mäusen, konnten zusätzliche Beobachtungen gemacht werden, die auf einen verbesserten Gesundheitszustand GLV-1h90-injizierter Mäuse hinweisen. Zum einen konnte über den kompletten Infektionsverlauf von 31 dpi eine kontinuierliche Zunahme des Netto-Körpergewichts von GLV-1h90-injizierten Mäusen verzeichnet werden. Zudem wirkten die Tiere im Verhältnis aktiver und gesund. In der Literatur werden erhöhte IL-6 Serum-Konzentrationen mit einer Appetitsteigerung, einer Zunahme des *body mass index* (BMI) sowie des Bauchumfangs in Zusammenhang gebracht, ebenso wie mit viszeralen Fettansammlungen und einem erhöhten Fettsäurespiegel im Blutplasma¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Es muss daher abgewogen werden, in welchen Fällen die Hyper-IL-6-vermittelte Gewichtszunahme einen therapeutischen- oder einen krankheitsauslösenden Effekt erzielt. Bei Krebserkrankungen kann allerdings davon ausgegangen werden, dass eine Vielzahl der eingesetzten Therapien den Organismus schwächen, wodurch eine zusätzlich stimulierte Gewichtszunahme vielmehr einen positiven und ausgleichenden Einfluss hat. IL-6 wurden darüber hinaus weitere wichtige Funktionen zugesprochen, welche mit Prozessen der Wundheilung in Verbindung stehen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Beobachtung von Wang und Kollegen, dass die Beteiligung von IL-6 an diesen Prozessen überwiegend über den löslichen IL-6-Rezeptor und demnach über das IL-6 *Trans-Signaling* vermittelt wird⁷⁸. In dieser Arbeit konnte auch für das GLV-1h90-kodierte Hyper-IL-6 eine stimulierende Wirkung auf die Wundheilung beobachtet werden. Bei der Untersuchung Virus-induzierter Schwanzläsion nach intravenöser Injektion von GLV-1h90 in DU-145-Tumor-tragende Mäuse konnte beobachtet werden, dass der Wundverschluss während des

Infektionsverlaufs im Vergleich zu GLV-1h68-induzierten Läsionen stark beschleunigt war. Diese durch Hyper-IL-6 stimulierte Wundheilung kann durch mehrere unterschiedliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte Hyper-IL-6 an der Aktivierung und folglich an der Proliferation von Keratinozyten beteiligt sein, wodurch es zu einem beschleunigten Wundverschluss kommt. Aufgrund der Beobachtung, dass Schwanzläsionen von GLV-1h90-injizierten Mäusen 31 dpi mit einer dicken Epithelschicht bedeckt waren, während zu diesem Zeitpunkt GLV-1h68-induzierte Läsionen noch Ähnlichkeit zu offenen Wunden hatten, kann diese Theorie bestätigt werden. Des Weiteren könnten immunologische Prozesse, wie die Anlockung von Neutrophilen Granulozyten sowie ihre Anheftung an Fibroblasten der Haut¹⁰² oder die Rekrutierung von Monozyten oder Makrophagen, welche für den Abtransport von Zelltrümmern verantwortlich sind, durch Hyper-IL-6 reguliert werden. Ebenso wäre eine Hyper-IL-6-induzierte Produktion von Wachstumsfaktoren oder Faktoren, welche die Angiogenese regulieren¹⁰³, denkbar. Darüber hinaus ist es allerdings wichtig anzumerken, dass die in diesem Fall betrachteten Schwanzläsionen nicht direkt mit herkömmlichen Verletzungs-bedingten Wunden verglichen werden können. Obwohl der genaue Mechanismus nicht bekannt ist, kann eine intravenöse Injektion von Vaccinia-Viren in die laterale Schwanzvene zu Läsionen an der Einstichstelle führen, welche sich außerdem ausgehend von der Einstichstelle im Laufe der Infektion vermehren können. Vaccinia-Viren sind in der Lage, sich in diesen Läsionen zu replizieren, wodurch es in den meisten Fällen eher zu einer Propagation als zu einer Heilung der Wunde kommt. Demnach könnte die Hyper-IL-6-vermittelte beschleunigte Wundheilung dieser Läsionen auch auf eine direkte oder indirekte Blockierung der viralen Replikation zurückzuführen sein¹⁵⁰. Welche Mechanismen im Detail jedoch an dem hier beobachteten Wundheilungsprozess beteiligt sind, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Basierend auf der bekannten Funktion von IL-6, auch ohne den Zusatz anderer Wachstumsfaktoren die Megakaryozyten-Reifung im Knochenmark zu stimulieren und auf diesem Weg eine vermehrte Produktion von Thrombozyten in Gang zu setzen^{98,100}, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dies auch für das GLV-1h90-kodierte Hyper-IL-6 gilt. In Vollblut-Proben von GLV-1h90-injizierten Mäusen konnte bereits 8 dpi eine signifikante Erhöhung der Thrombozyten-Zahl beobachtet werden. Diese Erhöhung erreichte ihr Maximum 11 dpi und war zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich um das Doppelte erhöht, im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Bereits drei Tage später konnte eine erneute Reduktion der Thrombozyten-Zahl verzeichnet werden, welche ab 16 dpi wieder Normalwerte im Bereich der Kontrollgruppen erreichte. Darüber hinaus konnte bei GLV-1h90-injizierten Mäusen 14 dpi eine signifikante Vergrößerung der Milz festgestellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Milz um den Haupt-Abbauort von überalterten Thrombozyten handelt, lässt sich

die ebenfalls temporäre Vergrößerung dieses Organs mit einem angeregten Abbau der in großer Zahl vorhandenen Thrombozyten erklären¹⁵¹. Interessanterweise entsprach die Kinetik der Zunahme der Thrombozyten-Zahl über den Infektionsverlauf direkt der Kinetik der Hyper-IL-6-Expression im Tumor und außerdem deren Detektion im Blutkreislauf. Hierbei fiel allerdings auf, dass die Zunahme der Thrombozyten-Zahl durchschnittlich 3-4 Tage nach der Hyper-IL-6-Expression auftrat. Dies führt zu der Annahme, dass Hyper-IL-6 in Folge der Überproduktion im Tumor über den Blutkreislauf ins Knochenmark gelangt und dort die Megakaryopoese und auf diesem Weg die Produktion von Thrombozyten stimuliert, welche dann 3-4 Tage später im Blut zu finden sind¹⁰⁰. Mit Hilfe der Anfertigung von Semi-Dünnschnitten des Knochenmarks von GLV-1h90- sowie als Kontrolle von GLV-1h68- und PBS-injizierten DU-145-Tumor-tragenden Mäusen konnten unterschiedliche Reifungsstadien der Megakaryozyten quantifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen im Knochenmark von GLV-1h90-injizierten Mäusen bereits 7 dpi eine signifikant größere Anzahl an Megakaryozyten in einem fortgeschrittenen Reifungszustand befanden, während signifikant weniger Megakaryozyten des Anfangsstadiums detektiert werden konnten. Dies bestätigt die Theorie, dass Hyper-IL-6 in der Lage ist, bereits 7 dpi die Reifung von Megakaryozyten im Knochenmark zu stimulieren und es auf diesem Weg 2-4 Tage später zu einer erhöhten Thrombozyten-Zahl im Blutkreislauf kommt. Es bleibt zu diskutieren, ob die in diesem Modell auftretende, erhöhte Thrombozyten-Zahl zu negativen Komplikationen führen kann. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei die Gefahr einer Thrombose zu nennen. Obwohl eine übermäßige Produktion von Thrombozyten, welche als Thrombozytose bezeichnet wird, normalerweise nicht als Risikofaktor für die Bildung von venösen Blutgerinnseln gilt, muss in diesem Fall aufgrund des Zusammenhangs mit Entzündungsprozessen mit besonderer Vorsicht gehandelt werden¹⁵²⁻¹⁵³. Thrombosen können bei normalen Thrombozyten-Zahlen entstehen¹⁵⁴⁻¹⁵⁵, ebenso wie sie bei hohen Konzentrationen ausbleiben können¹⁵⁶. Zur Bewertung von Risikofaktoren müssen demnach eine Reihe weiterer Parameter in Betracht gezogen werden, wie die Bestimmung des Aktivierungszustands der Thrombozyten sowie ihrer Fähigkeit zur Adhäsion und Aggregation. Individuell für jeden Patienten muss dann über eine mögliche begleitende, prophylaktische oder Symptom-bedingte Therapie entschieden werden. Besonders hervorzuheben ist auch in diesem Fall die zeitliche Limitierung der beobachteten Zunahme der Thrombozyten-Zahl, welche höchstwahrscheinlich auf die Virus-bedingte Zerstörung Hyper-IL-6-produzierender Tumorzellen zurückzuführen ist. Dies impliziert zudem, dass eventuelle Komplikationen, welche durch die Überexpression des *Designer-Zytokins* hervorgerufen werden können, ebenfalls selbstlimitierend sind.

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von GLV-1h90 ist, aufgrund der vielen kontrovers diskutierten Effekte von Hyper-IL-6, im Vergleich zu einer universellen Krebsbehandlung vielmehr an spezielle Einsatzmöglichkeiten zu denken. In Folge einer Chemotherapie kommt es oft zu einer Vielzahl von gefährlichen Nebenwirkungen, da alle schnell proliferierenden Zellen des Körpers betroffen sind. Thrombozytopenie ist eine der am häufigsten vorkommenden Nebenwirkung und beschreibt eine massive Reduktion der Thrombozyten-Zahl im Blut⁶. Darüber hinaus birgt die Thrombozytopenie aufgrund ungenügender Behandlungsmöglichkeiten ein schwerwiegendes Risiko⁷. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob durch einen kombinatorischen Einsatz des onkolytischen Vaccinia-Virus GLV-1h90 und dem Chemotherapeutikum Mitomycin C eine Chemotherapie-induzierte Thrombozytopenie reduziert werden kann. Bei Mitomycin C handelt es sich um ein zytotoxisches Antibiotikum, welches ursprünglich aus *Streptomyces caespitosus* isoliert wurde. Durch die Bildung freier Sauerstoff-Radikale und die Alkylierung von DNA-Strängen entwickelt dieses Chemotherapeutikum nach enzymatischer Aktivierung seine zytotoxische Wirkung¹⁵⁷⁻¹⁵⁸. Neben einer Reihe weiterer Nebenwirkungen wurde als Folge einer Mitomycin C-Behandlung eine schwerwiegende Thrombozytopenie beschrieben¹⁵⁹. Dies konnte in ersten Vorversuchen durch eine Mitomycin C-Behandlung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen von DU-145-Tumor-tragenden *Nude*-Mäusen bestätigt werden, wobei hier eine beginnende Thrombozytopenie circa 7 Tage nach der intravenösen Applikation von Mitomycin C beobachtet werden konnte. Um eine direkte Korrelation der Thrombozytopenie mit der Zunahme der Thrombozyten-Zahl zu erreichen, wurde in dem hier entwickelten Kombinations-System die Mitomycin C-Injektion 4 und 5 Tage nach Beginn der Virus-Behandlung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie von Mitomycin C und GLV-1h90 einerseits zu einem verzögerten Eintreten der Thrombozytopenie führte und andererseits das Abklingen dieser aufgetretenen Nebenwirkung beschleunigte. Demnach konnte die Zeitspanne, in welcher eine signifikant reduzierte Thrombozyten-Zahl beobachtet wurde, auf unter eine Woche reduziert werden. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit Mitomycin C alleine sowie in Kombination mit GLV-1h68 zu einer massiven Thrombozytopenie, welche in beiden Gruppen mindestens 14 Tage währte. Warum der additive Einsatz von GLV-1h90 nicht zu einer vollständigen Kompensation der Thrombozytopenie geführt hatte, kann durch die beschriebene Funktion von IL-6 erklärt werden. Demnach ist IL-6 durch die Stimulierung des Zellwachstums und der Zellproliferation maßgeblich an der Reifung bereits existierender Megakaryozyten beteiligt, allerdings nicht an der Bildung und Differenzierung neuer Megakaryozyten aus hematopoetischen Vorläuferzellen⁹⁹. Geht man davon aus, dass die Behandlung mit Mitomycin C zu einer allgemeinen Myelosuppression im Knochenmark führt und dabei hauptsächlich bestehende Megakaryozyten zerstört werden, ist Hyper-IL-6 ausschließlich in

der Lage, die noch existierenden Megakaryozyten zu einer Produktion von Thrombozyten anzuregen. Daraus ergibt sich eine gewisse Limitierung, durch welche sich die hier beobachtete unvollständige Kompensation der Mitomycin C-induzierten Thrombozytopenie durch Hyper-IL-6 erklären lässt. Darüber hinaus wäre es allerdings denkbar, durch Modifizierung der Parameter, wie die Zeitspanne zwischen Virus-Injektion und Mitomycin C-Behandlung oder die angewandte Mitomycin C-Konzentration, die auftretende Thrombozytopenie weiter einzudämmen.

Ein weiterer bedeutender Aspekt in dieser Kombination aus Chemotherapie und onkolytischer Virustherapie betrifft die eigentliche Tumortherapie. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine solche Kombinationstherapie zu Interaktionen führen kann, welche eine Verstärkung der therapeutischen Effekte zur Folge hat¹³⁷. Auch für das rekombinante Vaccinia-Virus GLV-1h68 konnte in jüngster Zeit eine verbesserte Tumorregression durch den kombinatorischen Einsatz mit einer Reihe unterschiedlicher Chemotherapeutika, wie beispielsweise Cisplatin oder Gemcitabin, nachgewiesen werden¹³⁴. Ergebnisse aus dieser Arbeit bestätigten diese Beobachtung. Die Kombinationstherapie von GLV-1h90 oder GLV-1h68 mit Mitomycin C führte zu einer signifikant verbesserten Tumorregression im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien. Bei vergleichender Betrachtung beider Virus-Konstrukte konnte auch hier bei der Kombination mit dem Chemotherapeutikum eine tendenziell beschleunigte Tumorroverminderung durch den Einsatz von GLV-1h90 beobachtet werden, wobei allerdings wiederum keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Welche Mechanismen im Detail für die Verstärkung der anti-Tumor Therapie verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden. Synergistische Mechanismen, welche bereits für andere onkolytische Viren charakterisiert wurden, könnten dabei hilfreiche Hinweise liefern. Häufig zielen diese synergistischen Effekte auf eine verstärkte Replikation der onkolytischen Viren im Tumor ab, woraus sich neben einer verbesserten Tumorregression allerdings auch oft eine stärkere Toxizität des jeweiligen Virus ergibt¹⁶⁰. Chemotherapie-induzierte Prozesse, die eine verbesserte Virus-Replikation zur Folge haben, schließen unter anderem eine Blockierung der Virus-induzierten Apoptose in Nachbarzellen¹⁶¹, die Aufrechterhaltung der Protein-Synthese in infizierten Zellen¹⁶⁰ sowie Veränderungen der zellulären Signalwege, welche die DNA-Reparatur betreffen¹⁶², mit ein. Darüber hinaus ist es wichtig zu bedenken, dass die meisten Chemotherapeutika zur Ausprägung ihrer zytotoxischen Eigenschaften direkt an der DNA angreifen, wodurch sich bei der Kombination mit DNA-Viren, wie dem Vaccinia-Virus, möglicherweise Einschränkungen der viralen Replikation ergeben. Die Untersuchung der viralen Replikation *in vitro* von GLV-1h90 sowie GLV-1h68 in DU-145-Zellen unter Einfluss von Mitomycin C ergab, dass es bei beiden Virus-Konstrukten zu einer signifikanten

Beeinträchtigung der Replikation durch das Chemotherapeutikum kam. Allerdings konnte diese direkte Hemmung der Virus-Replikation möglicherweise durch spezielle synergistische Mechanismen *in vivo* in den Hintergrund gestellt werden, wodurch sich die massiv verbesserte Tumorregression erklären lässt. Eine solche Überwindung negativer Effekte *in vivo* wurde bereits von Petrowsky und Kollegen für das Herpes simplex-Virus 1 beschrieben¹⁶⁰.

Darüber hinaus wurden die systemisch-vermittelten Hyper-IL-6-Effekte bezüglich der Wundheilung Virus-indizierter Schwanzläsionen sowie der Zunahme des Nettokörpergewichts im Kombinations-Modell untersucht. Interessanterweise konnte für Mitomycin C keine negative Beeinflussung der Wundheilung beobachtet werden. Während die Anzahl der Schwanzläsionen von GLV-1h68- plus Mitomycin C-injizierten Mäusen während des Infektionsverlaufs stetig anstieg und keine Anzeichen von Wundheilung aufwies, entwickelten GLV-1h90- plus Mitomycin C-injizierte Mäuse bis 7 dpi eine weitaus geringere Anzahl an Schwanzläsionen, welche darüber hinaus im weiteren Infektionsverlauf aufgrund von Wundheilungsprozessen signifikant reduziert wurden. Im Gegensatz dazu führte eine Therapie mit Mitomycin C zu einer starken, allerdings temporären Reduktion des Körpergewichts der behandelten Mäuse, welche durch die Kombination mit dem Hyper-IL-6-exprimierenden GLV-1h90 allerdings nicht ausgeglichen werden konnte. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass es sich bei der Gewichtszunahme generell um einen zeitlich längeren Prozess handelt, wodurch der Chemotherapie-induzierte plötzliche Gewichtsverlust nicht kompensiert werden konnte. Die Regenerationsphase könnte jedoch trotzdem aufgrund der Wirkungen von Hyper-IL-6 unterstützt werden, auch wenn dies anhand der hier bestimmten Daten nicht zu bestimmen ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine systemische Injektion von GLV-1h90 zu einer funktionellen Expression des *Designer*-Zytokins Hyper-IL-6 führte, welches in der Lage ist die Kombinationstherapie aus einem onkolytischen Vaccinia-Virus und dem Chemotherapeutikum Mitomycin C zusätzlich zu optimieren. Neben einem massiv verbesserten onkolytischen Effekt, welcher allerdings auch mit dem Kontrollvirus GLV-1h68 erreicht werden konnte, war GLV-1h90 darüber hinaus in der Lage eine Hauptnebenwirkung von Mitomycin C, die Thrombozytopenie, signifikant zu reduzieren. Im Hinblick auf eine mögliche Übertragung dieser Erkenntnisse in die Klinik, muss in weiteren Studien einerseits untersucht werden, ob diese Hyper-IL-6-vermittelte Verbesserung des Gesundheitszustands auch bei der Kombination mit anderen Chemotherapeutika beobachtet werden kann. Darüber hinaus muss geprüft werden, ob andere Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) oder Interleukin-11 (IL-11), welche bereits für die Behandlung von Thrombozytopenie zugelassen

sind, durch die rekombinante Integration in ein onkolytisches Vaccinia-Virus bei einer Kombinationstherapie dieselbe Wirkung oder möglicherweise sogar weitaus effektiver als Hyper-IL-6 die Kompensation einer auftretenden Thrombozytopenie bewirken und somit den Gesundheitszustand der Patienten verbessern könnten.

6 Referenzen

1. Globocan 2008. *International Agency for Research on Cancer* (2010).
2. World Health Organisation. Fact Sheet: Cancer. <http://www.who.int/en/> (2008).
3. Meyer, U. [Clinical proof is the decisive terrain. The history of alkylating agents]. *Pharm Unserer Zeit* **35**, 104-109 (2006).
4. Voigt, W., Dietrich, A. & Schmoll, H.J. [Overview of development status and clinical action. Cisplatin and its analogues]. *Pharm Unserer Zeit* **35**, 134-143 (2006).
5. American Cancer Society. Chemotherapy Principles: An Indepth Discussion of the Techniques and Its Role in Cancer Treatment. <http://www.cancer.org> (2010).
6. Kaushansky, K. The thrombocytopenia of cancer. Prospects for effective cytokine therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* **10**, 431-455 (1996).
7. Elting, L.S., *et al.* Incidence, cost, and outcomes of bleeding and chemotherapy dose modification among solid tumor patients with chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Oncol* **19**, 1137-1146 (2001).
8. Adams, V.R. & Brenner, T.L. Oprelvekin (Neumega(R)). *J Oncol Pharm Pract* **5**, 117-124 (1999).
9. Perner, L., Fowler, G.A. & Nauts, H.C. Effects of concurrent infections and their toxins on the course of leukemia. *Acta Med Scand Suppl* **338**, 1-47 (1958).
10. Sinkovics, J. & Horvath, J. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* **36**, 193-214 (1993).
11. Dock, G.A.M. The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia. *American Journal of the Medical Sciences* **127**, 563-592 (1904).
12. Kelly, E. & Russell, S.J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* **15**, 651-659 (2007).
13. Roberts, M.S., Lorence, R.M., Groene, W.S. & Bamat, M.K. Naturally oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther* **8**, 314-321 (2006).
14. Yap, T.A., Brunetto, A., Pandha, H., Harrington, K. & Debono, J.S. Reovirus therapy in cancer: has the orphan virus found a home? *Expert Opin Investig Drugs* **17**, 1925-1935 (2008).
15. Schirmacher, V., *et al.* Immunization with virus-modified tumor cells. *Semin Oncol* **25**, 677-696 (1998).
16. Diaz, R.M., *et al.* Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res* **67**, 2840-2848 (2007).

17. Grote, D., *et al.* Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood* **97**, 3746-3754 (2001).
18. Roberts, M.S., Groene, W.S., Lorence, R.M. & Bamat, M.K. Naturally occurring viruses for the treatment of cancer. *Discov Med* **6**, 217-222 (2006).
19. Chiocca, E.A. Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* **2**, 938-950 (2002).
20. McCormick, F. Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015. *Cancer Biol Ther* **2**, S157-160 (2003).
21. Zeh, H.J. & Bartlett, D.L. Development of a replication-selective, oncolytic poxvirus for the treatment of human cancers. *Cancer Gene Ther* **9**, 1001-1012 (2002).
22. Ko, D., Hawkins, L. & Yu, D.C. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene* **24**, 7763-7774 (2005).
23. Alain, T., *et al.* Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Mol Ther* **15**, 1512-1521 (2007).
24. Medina-Kauwe, L.K. Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1485-1496 (2003).
25. Hernandez-Alcoceba, R. Recent advances in oncolytic virus design. *Clin Transl Oncol* **13**, 229-239 (2011).
26. Frentzen, A., *et al.* Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12915-12920 (2009).
27. Kim, J.H., *et al.* Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF. *Mol Ther* **14**, 361-370 (2006).
28. Luo, J., *et al.* Treatment of cancer with a novel dual-targeted conditionally replicative adenovirus armed with mda-7/IL-24 gene. *Clin Cancer Res* **14**, 2450-2457 (2008).
29. Parker, J.N., *et al.* Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2208-2213 (2000).
30. Wong, R.J., *et al.* Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum Gene Ther* **12**, 253-265 (2001).
31. Erbs, P., *et al.* Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* **15**, 18-28 (2008).
32. Foloppe, J., *et al.* Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus. *Gene Ther* **15**, 1361-1371 (2008).

33. McCart, J.A., *et al.* Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther* **7**, 1217-1223 (2000).
34. Seubert, C.M., *et al.* Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a beta-galactosidase-activatable prodrug secolog analog of duocarmycin SA. *Cancer Gene Ther* **18**, 42-52 (2011).
35. Puhlmann, M., *et al.* Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* **7**, 66-73 (2000).
36. Yu, Y.A., *et al.* Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol* **22**, 313-320 (2004).
37. Chen, N., *et al.* A novel recombinant vaccinia virus expressing the human norepinephrine transporter retains oncolytic potential and facilitates deep-tissue imaging. *Mol Med* **15**, 144-151 (2009).
38. Haddad, D., *et al.* Insertion of the human sodium iodide symporter to facilitate deep tissue imaging does not alter oncolytic or replication capability of a novel vaccinia virus. *J Transl Med* **9**, 36 (2011).
39. McCart, J.A., *et al.* Oncolytic vaccinia virus expressing the human somatostatin receptor SSTR2: molecular imaging after systemic delivery using ¹¹¹In-pentetreotide. *Mol Ther* **10**, 553-561 (2004).
40. Harrison, S.C., *et al.* Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11178-11192 (2004).
41. Baxby, D. Poxviruses. (1996).
42. Edward Jenner: His Life, his Work, and his Writings. *Br Med J* **1**, 1245-1261 (1896).
43. Moss, B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**, 1662-1667 (1991).
44. Krauss, H., *et al.* Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from animals to Humans. . *ASM Press, Washington DC.* (2033).
45. Moss, B. Regulation of vaccinia virus transcription. *Annu Rev Biochem* **59**, 661-688 (1990).
46. Traktman, P. Poxviruses: an emerging portrait of biological strategy. *Cell* **62**, 621-626 (1990).
47. Le Boeuf, F. & Bell, J.C. United virus: the oncolytic tag-team against cancer! *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 205-211 (2010).
48. Moss, B. & Earl, P.L. Overview of the vaccinia virus expression system. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 5**, Unit5 11 (2001).

49. Moss, B. Poxviridae: the viruses and their replication. In: *Knipe DM, Howley PM, eds. Fields virology, 5th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins., 2905–2946 (2007).*
50. Wein, L.M., Wu, J.T. & Kirn, D.H. Validation and analysis of a mathematical model of a replication-competent oncolytic virus for cancer treatment: implications for virus design and delivery. *Cancer Res* **63**, 1317-1324 (2003).
51. Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535 (2008).
52. Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**, 48-54 (2006).
53. McCart, J.A., *et al.* Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* **61**, 8751-8757 (2001).
54. Putz, M.M., Midgley, C.M., Law, M. & Smith, G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat Med* **12**, 1310-1315 (2006).
55. De Clercq, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res* **55**, 1-13 (2002).
56. Yang, G., *et al.* An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge. *J Virol* **79**, 13139-13149 (2005).
57. Reeves, P.M., *et al.* Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med* **11**, 731-739 (2005).
58. Nathan, C. & Sporn, M. Cytokines in context. *J Cell Biol* **113**, 981-986 (1991).
59. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314 (1998).
60. Nicola, N.A. Guidebook to Cytokines and their Receptors. *Oxford University Press*, 1-7 (1994).
61. Salazar-Onfray, F., Lopez, M.N. & Mendoza-Naranjo, A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 171-182 (2007).
62. Muraguchi, A., *et al.* T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* **127**, 412-416 (1981).
63. Yoshizaki, K., *et al.* Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol* **128**, 1296-1301 (1982).

64. Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J.H. & Revel, M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* **5**, 2529-2537 (1986).
65. Van Damme, J., *et al.* Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **165**, 914-919 (1987).
66. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7251-7255 (1987).
67. Wolvekamp, M.C. & Marquet, R.L. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* **24**, 1-9 (1990).
68. Taga, T. & Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**, 797-819 (1997).
69. Blanchard, F., Duplomb, L., Baud'huin, M. & Brounais, B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 19-28 (2009).
70. Xu, G.Y., *et al.* Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol* **268**, 468-481 (1997).
71. Kishimoto, T., Akira, S. & Taga, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* **258**, 593-597 (1992).
72. Jones, S.A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. & Fuller, G.M. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* **15**, 43-58 (2001).
73. Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* **148**, 4066-4071 (1992).
74. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. & Rubinstein, M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* **170**, 1409-1414 (1989).
75. Peters, M., Muller, A.M. & Rose-John, S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* **92**, 3495-3504 (1998).
76. Marz, P., Otten, U. & Rose-John, S. Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* **11**, 2995-3004 (1999).
77. Romano, M., *et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315-325 (1997).

-
78. Wang, X.P., *et al.* The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* **123**, 124-131 (2004).
 79. Jones, S.A., Richards, P.J., Scheller, J. & Rose-John, S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 241-253 (2005).
 80. Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. & Scheller, J. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol* **90**, 484-494 (2011).
 81. Jostock, T., *et al.* Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* **268**, 160-167 (2001).
 82. Scheller, J., Grötzinger, A. & Rose-John, S. Zytokinsignale über lösliche und membranständige Rezeptoren: Interleukin-6. *BIOspektrum*. **13. Jahrgang** **03/07**, 250-253 (2007).
 83. Santer, F.R., Malinowska, K., Culig, Z. & Cavarretta, I.T. Interleukin-6 transsignalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* **17**, 241-253 (2010).
 84. Heinrich, P.C., *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20 (2003).
 85. Rawlings, J.S., Rosler, K.M. & Harrison, D.A. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 1281-1283 (2004).
 86. Hibi, M., Nakajima, K. & Hirano, T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl)* **74**, 1-12 (1996).
 87. Akira, S., *et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71 (1994).
 88. Brown, R.T., Ades, I.Z. & Nordan, R.P. An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *J Biol Chem* **270**, 31129-31135 (1995).
 89. Schumann, R.R., *et al.* The lipopolysaccharide-binding protein is a secretory class 1 acute-phase protein whose gene is transcriptionally activated by APRF/STAT/3 and other cytokine-inducible nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 3490-3503 (1996).
 90. Kishimoto, T. The biology of interleukin-6. *Blood* **74**, 1-10 (1989).
 91. Naka, T., Nishimoto, N. & Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**, S233-242 (2002).

-
92. Ulich, T.R., del Castillo, J. & Guo, K.Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood* **73**, 108-110 (1989).
 93. Kushner, I. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med* **36**, 611-622 (1993).
 94. Nakahara, H., *et al.* Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 1521-1529 (2003).
 95. John, G.R., Lee, S.C. & Brosnan, C.F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* **9**, 10-22 (2003).
 96. Kerr, R., Stirling, D. & Ludlam, C.A. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol* **115**, 3-12 (2001).
 97. Burstein, S.A. Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets* **8**, 93-104 (1997).
 98. Ishibashi, T., *et al.* Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5953-5957 (1989).
 99. Koike, K., *et al.* Interleukin-6 enhances murine megakaryocytopoiesis in serum-free culture. *Blood* **75**, 2286-2291 (1990).
 100. Ishibashi, T., *et al.* Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* **74**, 1241-1244 (1989).
 101. Geddis, A.E. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol* **47**, 212-219 (2010).
 102. Giuliani, A.L., *et al.* Fibroblasts increase adhesion to neutrophils after stimulation with phorbol ester and cytokines. *Cell Immunol* **149**, 208-222 (1993).
 103. Leibovich, S.J. & Ross, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* **78**, 71-100 (1975).
 104. Sato, M., *et al.* In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res* **291**, 400-404 (1999).
 105. Grossman, R.M., *et al.* Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6367-6371 (1989).
 106. Mumm, J.B. & Oft, M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene* **27**, 5913-5919 (2008).

107. Trikha, M., Corringham, R., Klein, B. & Rossi, J.F. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* **9**, 4653-4665 (2003).
108. Oh, J.W., *et al.* Unmasking by soluble IL-6 receptor of IL-6 effect on metastatic melanoma: growth inhibition and differentiation of B16-F10.9 tumor cells. *Oncogene* **15**, 569-577 (1997).
109. Bellido, T., O'Brien, C.A., Roberson, P.K. & Manolagas, S.C. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* **273**, 21137-21144 (1998).
110. Ganapathi, M.K., *et al.* Resistance to interleukin 6 in human non-small cell lung carcinoma cell lines: role of receptor components. *Cell Growth Differ* **7**, 923-929 (1996).
111. Fischer, M., *et al.* I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* **15**, 142-145 (1997).
112. Chebath, J., *et al.* Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities. *Eur Cytokine Netw* **8**, 359-365 (1997).
113. Peters, M., *et al.* In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol* **161**, 3575-3581 (1998).
114. Ozbek, S., *et al.* The designer cytokine hyper-IL-6 mediates growth inhibition and GM-CSF-dependent rejection of B16 melanoma cells. *Oncogene* **20**, 972-979 (2001).
115. Gnant, M.F., Puhlmann, M., Alexander, H.R., Jr. & Bartlett, D.L. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer Res* **59**, 3396-3403 (1999).
116. Kumar, S., Gao, L., Yeagy, B. & Reid, T. Virus combinations and chemotherapy for the treatment of human cancers. *Curr Opin Mol Ther* **10**, 371-379 (2008).
117. Ottolino-Perry, K., Diallo, J.S., Lichty, B.D., Bell, J.C. & McCart, J.A. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. *Mol Ther* **18**, 251-263 (2010).
118. Advani, S.J., *et al.* Enhancement of replication of genetically engineered herpes simplex viruses by ionizing radiation: a new paradigm for destruction of therapeutically intractable tumors. *Gene Ther* **5**, 160-165 (1998).
119. Kim, S.H., *et al.* Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* **41**, 313-322 (2005).

120. Chou, J. & Roizman, B. Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5247-5251 (1994).
121. Chou, J., Kern, E.R., Whitley, R.J. & Roizman, B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* **250**, 1262-1266 (1990).
122. Kramm, C.M., *et al.* Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy. *Hum Gene Ther* **8**, 2057-2068 (1997).
123. Adusumilli, P.S., *et al.* Radiation-induced cellular DNA damage repair response enhances viral gene therapy efficacy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Ann Surg Oncol* **14**, 258-269 (2007).
124. Jarnagin, W.R., *et al.* Treatment of cholangiocarcinoma with oncolytic herpes simplex virus combined with external beam radiation therapy. *Cancer Gene Ther* **13**, 326-334 (2006).
125. Dingli, D., *et al.* Interaction of measles virus vectors with Auger electron emitting radioisotopes. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 22-29 (2005).
126. Zhang, Q., *et al.* Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* **67**, 10038-10046 (2007).
127. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
128. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
129. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
130. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
131. Woo, Y., Adusumilli, P.S. & Fong, Y. Advances in oncolytic viral therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **7**, 549-559 (2006).
132. Gentschev, I., *et al.* Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 489759 (2010).
133. Gentschev, I., *et al.* Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One* **6**, e22069 (2011).

134. Yu, Y.A., *et al.* Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther* **8**, 141-151 (2009).
135. Yu, Z., *et al.* Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* **8**, 45 (2009).
136. Simpson, R.J., Hammacher, A., Smith, D.K., Matthews, J.M. & Ward, L.D. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* **6**, 929-955 (1997).
137. Mahoney, D.J. & Stojdl, D.F. Potentiating oncolytic viruses by targeted drug intervention. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 394-402 (2010).
138. Kirn, D.H. & Thorne, S.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* **9**, 64-71 (2009).
139. Chen, N.G. & Szalay, A.A. Oncolytic vaccinia virus: a theranostic agent for cancer. *Future Virology* **5**, 763-784 (2010).
140. Liu, T.C., Hwang, T., Park, B.H., Bell, J. & Kirn, D.H. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* **16**, 1637-1642 (2008).
141. Blasco, R. & Moss, B. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *J Virol* **66**, 4170-4179 (1992).
142. Hirano, T., *et al.* Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**, 73-76 (1986).
143. Simpson, R.J., Moritz, R.L., Rubira, M.R. & Van Snick, J. Murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. Complete amino-acid sequence and relation to human interleukin-6. *Eur J Biochem* **176**, 187-197 (1988).
144. Van Snick, J., *et al.* cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6. *Eur J Immunol* **18**, 193-197 (1988).
145. Naugler, W.E. & Karin, M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* **14**, 109-119 (2008).
146. Drucker, C., Gewiese, J., Malchow, S., Scheller, J. & Rose-John, S. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *J Autoimmun* **34**, 29-37 (2010).
147. Bastard, J.P., *et al.* Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3338-3342 (2000).
148. Fenkci, S., *et al.* Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in

- overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* **54**, 455-460 (2006).
149. Trujillo, M.E., *et al.* Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 5577-5582 (2004).
 150. Kopf, M., *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339-342 (1994).
 151. Mebius, R.E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606-616 (2005).
 152. Francis, C.W. Clinical practice. Prophylaxis for thromboembolism in hospitalized medical patients. *N Engl J Med* **356**, 1438-1444 (2007).
 153. Rogers, F., Rebuck, J.A. & Sing, R.F. Venous thromboembolism in trauma: an update for the intensive care unit practitioner. *J Intensive Care Med* **22**, 26-37 (2007).
 154. Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* **115**, 3339-3347 (2005).
 155. Lupia, E., *et al.* Thrombopoietin contributes to enhanced platelet activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* **48**, 2195-2203 (2006).
 156. Buss, D.H., Cashell, A.W., O'Connor, M.L., Richards, F., 2nd & Case, L.D. Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases. *Am J Med* **96**, 247-253 (1994).
 157. Danshiitsoodol, N., de Pinho, C.A., Matoba, Y., Kumagai, T. & Sugiyama, M. The mitomycin C (MMC)-binding protein from MMC-producing microorganisms protects from the lethal effect of bleomycin: crystallographic analysis to elucidate the binding mode of the antibiotic to the protein. *J Mol Biol* **360**, 398-408 (2006).
 158. Tomasz, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* **2**, 575-579 (1995).
 159. Akahori, H., *et al.* Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on thrombocytopenia induced by a new myelosuppressive chemotherapy regimen in mice. *Stem Cells* **14**, 678-689 (1996).
 160. Petrowsky, H., *et al.* Functional interaction between fluorodeoxyuridine-induced cellular alterations and replication of a ribonucleotide reductase-negative herpes simplex virus. *J Virol* **75**, 7050-7058 (2001).
 161. Stanziale, S.F., *et al.* Infection with oncolytic herpes simplex virus-1 induces apoptosis in neighboring human cancer cells: a potential target to increase anticancer activity. *Clin Cancer Res* **10**, 3225-3232 (2004).

162. Brown, S.M., MacLean, A.R., McKie, E.A. & Harland, J. The herpes simplex virus virulence factor ICP34.5 and the cellular protein MyD116 complex with proliferating cell nuclear antigen through the 63-amino-acid domain conserved in ICP34.5, MyD116, and GADD34. *J Virol* **71**, 9442-9449 (1997).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	alpha
β	beta
μ	mikro
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AKT	Serin-Threonin Proteinkinase
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BFU-MK	<i>burst forming unit megakaryocyte</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bp	Basenpaare
BSF-2	<i>B-cell stimulatory factor 2</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD31	<i>cluster of differentiation 31</i>
CD41	<i>cluster of differentiation 41</i>
cDNA	komplementäre DNA
CEV	<i>cell-associated virion</i>
CFU-MK	<i>colony-forming unit megakaryocyte</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CMC	Caboxymethylcellulose
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
dd	Bidestilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post infection</i>

DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence Lösung</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virus</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	und Andere
FBS	Fötales Bovines Serum
Fc	kristallines Antikörper-Fragment
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
g	Gramm
Gab1	<i>Grb2-associated-binding protein 1</i>
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible gene 34</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
gusA	β-Glucuronidase
h	Stunde/Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
Hank's BSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HGF	<i>hybridoma growth factor</i>
hpi	<i>hours post infection</i>
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
HSF	<i>hepatocyte-stimulating factor</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IEV	<i>intracellular enveloped virus</i>
IMV	<i>intracellular mature virus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β -Galaktosidase
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LMP	<i>low melting point</i>
m	milli
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg	Magnesium
min	Minute
Mio	Million
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
MV	<i>mature virus</i>
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NF	<i>nuclear factor</i>
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP	<i>neuropoietin</i>
OSM	Onkostatin M
p	pico
p.a.	per analysis
PAA	Polyacrylamid
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen	Penicillin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PF	<i>platelet factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i>
PGPMC	<i>promeg cytoblast</i>
pH	potentia hydrogenii

PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Rezeptor
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtfr	Transferrin-Rezeptor
RUC	Renilla-Luciferase
rVACV	rekombinantes Vaccinia-Virus
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
s-IL-6-R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transkription</i>
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBT	Tris-Borat-Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	Thymidin-Kinase
TMB	Tetramethylbenzidin
TPO	Thrombopoetin
Tyk	Tyrosinkinase
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Szalay bedanken, der es mir ermöglicht hat drei Jahre an diesem spannenden Thema zu arbeiten und mir in seiner Arbeitsgruppe in Würzburg die besten Voraussetzungen für eine abschließende Promotion geboten hat. Daneben möchte ich mich besonders für seine fachlichen Ratschläge und die darüber hinaus gehende Unterstützung bedanken, insbesondere für die Möglichkeit, einen Teil der Laborphase im Ausland absolvieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Grummt danke ich besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit, die vielen Tipps zum wissenschaftlichen Schreiben und sein stetiges Interesse an meiner Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich ihm und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei der Herstellung von Semi-Dünnschnitten für die Elektronenmikroskopie.

Frau Dr. Cora Reiß und Herrn Dr. Stepan Gambaryan des Institus für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg danke ich für die Einführung in die Hämatologie, die Bereitstellung vieler Geräte sowie die tatkräftige Unterstützung bei Versuchen mit Thrombozyten.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Robin Wacker, der mich in die Kunst der Paraffinschnitte eingeweiht hat und mir mit seinen spannenden Geschichten oftmals den Tag schöner gemacht hat. Seiner findigen Art und langjährigen Erfahrung verdankt die Arbeitsgruppe den Besitz eines voll funktionsfähigen recycelten Mikrotoms ☺.

Bei den Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe Szalay möchte ich mich für den fachlichen Austausch, die vielen Gespräche und die angenehme Atmosphäre in den letzten 3 Jahren bedanken.

Ein spezieller Dank gilt Jochen für die intensive Betreuung und Unterstützung während der gesamten 3 Jahre. Aus seinen fachlichen Ratschlägen, den wertvollen Diskussionen und seinem großen Interesse an meinem Thema konnte ich immer wieder weiterführende Ideen entwickeln und neue Motivation schöpfen.

Simon und Caro, euch danke ich für all die Hilfe mit kleinen und großen Computer-Problemen. Ohne euch wäre ich manchmal ganzschön verzweifelt.

Besonders danken, möchte ich auch Jenny. Trotz, dass du so weit weg bist, hast du mich so sehr unterstützt. Ich danke dir nicht nur für deine perfekten Korrekturen oder die Beschaffung sämtlicher naturwissenschaftlicher Literatur, sondern vor allem für deine aufbauenden Worte bei endlosen Gesprächen über Skype. Du hast mir wirklich Kraft gegeben.

Micha, dir danke ich für deine Mithilfe bei so vielen Experimenten. Ohne dich hätte ich die Arbeit oft nicht geschafft. Natürlich danke ich dir auch für die vielen kleinen Provokationen, die den Tag lustiger gemacht haben und meistens auch ein Ansporn waren 😊.

JoJo, du bist die Seele des Labors. Ohne deinen Überblick wäre ich manchmal ganz schön verloren gewesen. Und auch ohne dein besonderes Geschick in allen histologischen Methoden und ohne die vielen Stunden, die du meinen Semi-Dünnschnitten gewidmet hast, hätte ich das alles nicht so gut hin bekommen.

Ein ganz lieber Dank geht an Rike. Du hast mir in so vielen wissenschaftlichen Diskussionen geholfen, mein Projekt zu strukturieren und hast mir dadurch oft die richtige Richtung gezeigt. Aber auch weit über die Arbeit hinaus hast du mich mit deiner Freundschaft besonders unterstützt.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern, die mich stets uneingeschränkt unterstützt, mir alle Möglichkeiten geboten und mich trotzdem jederzeit mit offenen Armen zu Hause empfangen haben. Meinem Bruder danke ich, dass er mir in so vielen Gesprächen Kraft gegeben hat und mir klar gemacht hat, was wirklich wichtig ist.

Außerdem danke ich Alex, der mich bei allem unterstützt und meine Launen ertragen hat sowie ehrliches Interesse an meiner Arbeit zeigte.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Dissertation weder in dieser noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Neben dem akademischen Grad „Diplom Biologe“ habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den _____

(Julia Sturm)

9 Publikationen

Sturm JB, Hess M, Weibel S, Chen NG, Yong YA, Zhang Q, Donat U, Reiss C, Gambaryan S, Stritzker J, Szalay AA.

Functional hyper-IL-6 from vaccinia virus-colonized tumors triggers platelet formation and helps to alleviate toxicity of mitomycin C enhanced virus therapy.

J Transl Med. Under review

Hess M, Stritzker J, Härtl B, Sturm JB, Gentschev I, Szalay AA.

Bacterial glucuronidase as general marker for oncolytic virotherapy or other biological therapies.

J Transl Med. 2011 Oct 11;9:172. 9: 172. PMID: 21989091

Seubert CM, Stritzker J, Hess M, Donat U, Sturm JB, Chen N, von Hof JM, Krewer B, Tietze LF, Gentschev I, Szalay AA.

Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a β -galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA.

Cancer Gene Ther. 2011 Jan;18(1):42-52. Epub 2010 Sep 10. PMID: 20829890