

---

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie

---



**Wirkung der Vaccinia-viral kodierten Proteine Relaxin 1 und  
Matrixmetalloproteinase 9 auf die extrazelluläre Matrix und  
die virale Ausbreitung in Tumorgewebe**

**Dissertation**

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

vorgelegt von Simon Schäfer aus Darmstadt

Würzburg, Januar 2012

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 .....	5
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Krebs: Ein kurze Zusammenfassung des Krankheitsverlaufs .....	8
1.2 Klassische Formen der Krebstherapie .....	10
1.3 Krebstherapie mittels onkolytischer Viren .....	12
1.4 Vaccinia Virus .....	14
1.4.1 Die Systematik der Poxviridae .....	14
1.4.2 Die Rolle des Vaccinia Virus bei der Bekämpfung der Pocken .....	15
1.4.3 Charakteristika der Vaccinia Viren .....	15
1.4.4 Infektion, Replikation und Ausbreitung .....	16
1.4.5 Die rekombinanten Vaccinia Viren GLV-1h68, GLV-1h169 und GLV-1h255.....	19
1.5 Relaxin.....	21
1.5.1 Die Familie der Relaxin-Proteine und deren Rezeptoren.....	21
1.5.2 Der Relaxin-Signalweg .....	23
1.5.3 <i>In vivo</i> Funktionen von Relaxin.....	23
1.5.4 Die Rolle von Relaxin beim <i>Remodeling</i> der extrazellulären Matrix und bei Krebs.....	25
1.5.4.1 Struktur und Funktion der extrazellulären Matrix .....	25
1.5.4.2 Die Rolle von Relaxin und MMPs beim <i>Remodeling</i> der extrazellulären Matrix und bei der Krebsentstehung.....	26
1.5.4.3 Relaxin in der Tumorthherapie .....	28
1.6 Ziele der Arbeit.....	29
<b>2 Material.....</b>	<b>30</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme .....	30
2.2 Puffer und Lösungen .....	32
2.3 Zelllinien und –kulturmedien .....	34
2.3.1 Zelllinien .....	34
2.3.2 Zellkulturmedien .....	35
2.4 Antikörper .....	35
2.5 Rekombinante Viruskonstrukte .....	36
2.5.1 GLV-1h68 .....	36
2.5.2 GLV-1h169 .....	37
2.5.3 GLV-1h255 .....	37

2.6	Versuchstiere .....	38
2.7	Geräte und sonstige Materialien .....	38
2.8	Verwendete Software .....	40
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	41
3.1.1	Kultivierung von adhären wachsenden Eukaryontenzellen.....	41
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	42
3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	42
3.2	Virologische Methoden.....	43
3.2.1	Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay .....	43
3.2.2	Infektion eukaryotischer Zellen mit Vaccinia-Viren .....	43
3.2.3	Analyse der Virusreplikation in eukaryotischen Zellen .....	44
3.3	Mausexperimentelle Methoden .....	44
3.3.1	Implantation von humanen Tumorzellen.....	44
3.3.2	Intravenöse Injektion von rekombinanten Vaccinia Viren .....	45
3.3.3	Narkose von Mäusen.....	45
3.3.4	Tumor- und Organentnahme .....	46
3.3.5	Immunhistochemie.....	46
3.3.6	Virustiterbestimmung aus Gewebeproben .....	46
3.4	Bildaufnahme und -auswertung.....	47
3.4.1	Quantifizierung von Agaroseschnitten mittels Maestro-Imaging System .....	47
3.4.2	Quantifizierung von Agaroseschnitten mittels ImageJ.....	47
3.4.3	Auszählen der Blutgefäße und Bestimmung der Gefäßdurchmesser .....	48
3.5	Proteinanalytische Methoden.....	48
3.5.1	Herstellung von Proteinextrakten .....	48
3.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
3.5.3	Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Western-Blot).....	50
3.5.4	PonceauS Färbung .....	50
3.5.5	Immundetektion von Proteinen mittels ECL-Methode .....	51
3.5.6	Gelatine-Zymographie.....	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1	Charakterisierung des onkolytischen rVACV GLV-1h169 (Relaxin 1).....	53
4.1.1	Einsatz von DU145-Tumoren zur Analyse der Tumorregression und der Virus- Ausbreitung unter Verwendung der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 .....	53
4.1.1.1	Analyse des <i>in vitro</i> Replikationsverhaltens von GLV-1h68 und GLV-1h169 .....	53
4.1.1.2	Einfluss der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von DU145- Xenograft-Tumoren.....	54
4.1.1.3	Nachweis von viral exprimiertem Relaxin 1 in Tumorproben.....	55

4.1.1.4	Analyse der rVACV-vermittelten Veränderungen der extrazellulären Matrix und der viralen Ausbreitung in DU145-Tumorgewebe.....	56
4.1.2	Verwendung von PC3-Tumor-tragenden Mäusen zur Analyse des Einflusses der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf die Metastasierung in renalen und lumbalen Lymphknoten.....	59
4.1.2.1	Nachweis von viral exprimiertem Relaxin in Tumorproben.....	59
4.1.2.2	Einfluss der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren.....	59
4.1.2.3	Analyse des Einflusses von GLV-1h68 und GLV-1h169 auf lumbale und renale Lymphknoten-Metastasen.....	60
4.1.3	Einsatz von C33A-Tumor-tragenden Mäusen zur Analyse der Tumorregression und viralen Ausbreitung von GLV-1h68 und GLV-1h169.....	63
4.1.3.1	Einfluss von GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von C33A-Xenograft-Tumoren.....	63
4.1.3.2	Quantifizierung von Komponenten der extrazellulären Matrix und der MMP-9-Expression in GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 infizierten C33A-Tumoren.....	64
4.1.3.3	Analyse der viralen Ausbreitung und der Virustiter in C33A-Tumoren.....	66
4.1.3.4	Bestimmung der Blutgefäßdichte und –permeabilität in C33A-Tumoren.....	67
4.1.3.5	Expression von Relaxin 1, MMP-9 und MHC II in Randbereichen und inneren Bereichen von C33A-Tumoren.....	69
4.2	Charakterisierung von GLV-1h255 in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.....	72
4.2.1	Expression von viral codiertem MMP-9 in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten PC3-Zellen.....	72
4.2.2	Nachweis der enzymatischen Aktivität von MMP-9 in GLV-1h255- und GLV-1h256- infizierten A549-Zellen und deren Überständen.....	73
4.2.3	Einfluss der onkolytischen Viren GLV-1h68 und GLV-1h255 auf das Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren.....	74
4.2.4	Analyse des Einflusses der Viren GLV-1h68 und GLV-1h255 auf lumbale und renale Lymphknoten-Metastasen in PC3-tumortragenden Mäusen.....	75
4.2.5	Analyse der Veränderungen der extrazellulären Matrix und der MMP-9-Expression in GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-infizierten PC3-Tumoren.....	77
4.2.6	Analyse der GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-Virustiter in PC3-Tumoren.....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
5.1	Therapeutischer Effekt der Viren GLV-1h169 und GLV-1h255.....	87
5.2	Expression von Relaxin 1 und MMP-9, Veränderungen der EZM, der Vaskulatur und der Einfluss auf die Ausbreitung der Viren.....	88
5.3	Einfluss der Viren GLV-1h169 und GLV-1h255 auf die Metastasierung lumbaler und renaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.....	94
<b>6</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>107</b>
7.1	Abkürzungen.....	107

7.2	Danksagung.....	111
7.3	Eidesstattliche Erklärung.....	113
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>116</b>

## Zusammenfassung

Die heute in der Krebstherapie vorherrschenden konventionellen Therapiemethoden weisen Defizite bezüglich ihrer Wirksamkeit auf und rufen oftmals gravierende Nebenwirkungen hervor. Eine Alternative für die Behandlung von Tumoren ist der Einsatz onkolytischer Viren. Um einen erfolgreichen klinischen Einsatz onkolytischer Viren zu ermöglichen, ist eine Verstärkung von deren Wirksamkeit durch die Insertion therapeutischer Gene wünschenswert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Abbau von Proteinen der extrazellulären Matrix durch die Insertion des Relaxin- oder Matrixmetalloproteinase 9-Gens (MMP-9) in das Vaccinia-Virus Genom erreicht und dadurch die Virusausbreitung im Tumorgewebe erleichtert werden. Hierfür wurden die rekombinanten Vaccinia-Viren GLV-1h169, codierend für das Hormon Relaxin und GLV-1h255, codierend für das Enzym MMP-9, eingesetzt.

Es wurde analysiert, ob die Expression dieser Proteine zu einem Abbau von Matrixproteinen führt, dies die Virusausbreitung erleichtert und die Lyse infizierter Tumorzellen gegenüber dem parentalen Virus GLV-1h68 verstärkt.

GLV-1h169 wurde in DU145-, PC3- und C33A-Tumor-tragende Mäuse injiziert und die Wirkung des viral-codierten Relaxins auf die extrazelluläre Matrix und die virale Ausbreitung im Tumorgewebe analysiert. In Zellkultur-Experimenten wurde ermittelt, dass die Insertion des Relaxin-Gens in das GLV-1h169-Genom das Replikationsverhalten in DU145-Zellen gegenüber dem des parentalen Virus GLV-1h68 nicht negativ beeinflusst. In DU145-, PC3- und C33A-Tumorschnitten konnte eine Expression von Relaxin in GLV-1h169-infizierten Bereichen nachgewiesen werden. Die Expression von Relaxin soll durch die Aktivierung des Relaxin-Signalweges zur Translation von MMP-9 führen. Das Enzym wird von infizierten Zellen sezerniert und spaltet Proteine der extrazellulären Matrix. Der Gehalt der MMP-9 Substrate Collagen IV und Laminin in GLV-1h169 behandelten DU145- und C33A-Tumoren wurde analysiert und mit jenem in GLV-1h68- und PBS-behandelten Tumoren verglichen. In Virus-behandelten DU145-Tumoren zeigte sich im Vergleich mit PBS-behandelten Tumoren ein signifikant verringerter Collagen IV- und

Laminingehalt. Weiterhin war der Collagen IV-Gehalt in GLV-1h169 infizierten Tumoren signifikant niedriger als in GLV-1h68 infizierten. Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung des Virustiters und nicht zu einer verbesserten Virusausbreitung. GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierte Tumore zeigten gegenüber PBS-behandelten Tumoren eine starke Regression. Die GLV-1h169-vermittelte Relaxin-Expression führte jedoch nicht zu einer weiteren Verstärkung der Tumorregression.

In Virus-behandelten C33A-Tumoren wurde eine signifikante Erhöhung des Collagen IV- und Laminingehalts gegenüber PBS-behandelten Tumoren nachgewiesen. Dies könnte durch eine Virus-induzierte Inflammationsreaktion hervorgerufen werden, die eine Fibroblasten-vermittelte Collagenablagerung nach sich zieht. Das MMP-9 Expressionslevel war in Virus-behandelten Tumoren gegenüber PBS-behandelten signifikant erhöht, jedoch bewirkte die GLV-1h169-vermittelte Expression von Relaxin keine zusätzliche MMP-9 Expression. In Tumorrandbereichen erfolgte eine Expression von Relaxin und MMP-9, im Tumorrinneren jedoch nur eine Expression von Relaxin. Hingegen wurde eine Korrelation zwischen der MMP-9-Expression und der Präsenz MHC II-positiver Zellen beobachtet. Diese Zellen migrieren von außen in das Tumorgewebe und exprimieren dort MMP-9. Bei der Analyse der Virustiter und -ausbreitung im Tumorgewebe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169-injizierten Tieren. Die Injektion von beiden onkolytischen Viren in C33A-Tumor-tragende Mäuse führte zu einer starken Tumorregression. Diese wurde jedoch nicht durch die GLV-1h169-vermittelte Relaxin-Expression beeinflusst. Da die Aktivierung des Relaxin-Signalweges zu einer Expression des vascular endothelial growth factors (VEGF) führen kann, welcher die Angiogenese stimuliert, wurde die Blutgefäßdichte in C33A-Tumoren ermittelt. Die Expression von Relaxin führte nicht zu einer erhöhten Blutgefäßdichte. Die Basalmembran von Blutgefäßen enthält Collagen IV, deshalb wurde untersucht, ob die Relaxin-Expression eine erhöhte Permeabilität der Gefäße bewirkt. In den Virus-behandelten Tumoren zeigte sich eine gegenüber PBS-behandelten Tumoren signifikant erhöhte Gefäß-Permeabilität, jedoch bewirkte die Expression von Relaxin keine weitere Erhöhung der Gefäß-Permeabilität.



Der Abbau von Matrixproteinen durch proteolytische Enzyme kann das Herauslösen von malignen Zellen aus dem Tumorgewebe erleichtern und damit die Metastasierung begünstigen. Daher wurden in PC3-Tumor-tragenden Mäusen die Volumina renaler und lumbaler Lymphknoten untersucht, die durch Tumorzellen besiedelt werden können und letzten Endes zur Metastasenbildung führen. In Virus-behandelten Tieren waren diese Lymphknoten signifikant kleiner als in PBS-behandelten Tieren.

Weiterhin wurde das MMP-9 codierende Virus GLV-1h255 analysiert. In *in vitro* Versuchen wurde die Expression von MMP-9 in GLV-1h255-infizierten Zellen analysiert. Mittels Zymographie wurde die enzymatische Aktivität nachgewiesen. PC3-Tumore zeigten ein hohes basales Expressionslevel von MMP-9. In GLV-1h255 infizierten Tumorbereichen wurde das Enzym dennoch signifikant überexprimiert. Es wurde ein signifikant niedrigerer Collagen IV-Gehalt in GLV-1h255-infizierten Tumorbereichen gegenüber nicht-infizierten Tumorbereichen nachgewiesen. Die Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix durch MMP-9 kann zur Freisetzung von VEGF führen und damit indirekt die Angiogenese im Tumor begünstigen. GLV-1h68- und GLV-1h255-infizierte Tumorbereiche zeigten jedoch eine signifikant verringerte Blutgefäßdichte gegenüber nicht-infizierten Tumorbereichen. Es kam in GLV-1h255-behandelten PC3-Tumor-tragenden Mäusen zu einer früher einsetzenden und gegenüber GLV-1h68-behandelten Tieren verstärkten Tumorregression. Sieben Tage nach Virusinjektion wurde ein signifikant höherer Virustiter in GLV-1h255-infizierten Tumoren als in GLV-1h68-infizierten Tumoren ermittelt. Der MMP-9-vermittelte Abbau von Collagen IV bewirkte keine verstärkte Metastasierung der renalen und lumbalen Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach systemischer Injektion von GLV-1h169 oder GLV-1h255 Relaxin bzw. MMP-9 im Tumorgewebe exprimiert wurde. Die intratumorale Expression von Relaxin führte jedoch nicht zu einer verstärkten Virusausbreitung im Tumorgewebe und es konnte keine Verstärkung der Tumorregression beobachtet werden. Die GLV-1h255-vermittelte Überexpression von MMP-9 in PC3-Tumor-tragenden Mäusen führte hingegen zu einem Abbau von Collagen IV und resultierte in einer beschleunigten und verstärkten Tumorregression und einem signifikant

erhöhten Virustiter. Potentiell negative Effekte, wie eine verstärkte Angiogenese oder Metastasierung, konnten ausgeschlossen werden.

## Summary

The currently dominating conventional cancer therapy methods are facing limitations regarding their efficacy and often cause severe side effects. An alternative for the treatment of tumors is the use of oncolytic viruses. To ensure a successful clinical application of oncolytic viruses, an enhanced efficacy by the insertion of therapeutic genes is desirable.

In the scope of this thesis, a degradation of extracellular matrix proteins should be achieved by the insertion of the *relaxin* or *matrix metalloproteinase 9* gene into the vaccinia virus genome, facilitating increased viral spreading in the tumor tissue. To this end, the recombinant vaccinia viruses GLV-1h169, encoding the hormone relaxin and GLV-1h255, encoding the enzyme MMP-9 were used.

It was analyzed whether the expression of these proteins causes a degradation of matrix proteins and leads to an increased viral spreading and an enhanced lysis of infected tumor cells, when compared to the parental virus GLV-1h68.

DU145, PC3 and C33A tumor-bearing mice, respectively, were injected with GLV-1h169 and the effect of virus-encoded relaxin on the extracellular matrix and viral spreading inside the tumor mass was analyzed. Tissue culture experiments confirmed that the insertion of the *relaxin* gene into the GLV-1h169 genome does not negatively influence the virus replication in DU145 cells when compared to that of the parental virus GLV-1h68. An expression of relaxin in GLV-1h169-infected tumor areas in DU145, PC3 and C33A tumor sections was shown. The expression of relaxin should activate the relaxin pathway, inducing the translation of MMP-9. The enzyme is secreted by infected cells and cleaves proteins of the extracellular matrix. The content of the MMP-9 substrates collagen IV and laminin in GLV-1h169-treated DU145 and C33A tumors was analyzed and compared to that of GLV-1h68- and PBS-treated tumors. Virus-treated tumors showed a significantly lower collagen IV and laminin content than those treated with PBS. Furthermore, the collagen IV content in GLV-1h169-treated tumors was significantly lower than in those treated with GLV-1h68. This did not lead to higher virus titers or to an enhanced virus spreading. Compared to PBS-treated tumors, those infected with GLV-1h68 or GLV-

1h169 regressed significantly. The GLV-1h169-mediated relaxin expression did not further enhance tumor regression.

Virus-treated C33A tumors showed a significantly increased collagen IV and laminin content compared to those treated with PBS. This could be due to a virus-induced inflammation, leading to a fibroblast-mediated collagen deposition. The MMP-9 expression level in virus-treated tumors was significantly higher than in those treated with PBS. However, the GLV-1h169-mediated expression of relaxin did not further increase MMP-9 expression. In outer tumor areas relaxin and MMP-9 were expressed, in inner tumor areas only relaxin was expressed. In contrast, a correlation between the expression of MMP-9 and the presence of MHC II-positive cells was observed. These cells migrate from the outside into the tumor tissue where they express MMP-9. The analysis of virus titers and spreading inside the tumor mass revealed no significant differences between GLV-1h68- and GLV-1h169-injected mice. The injection of both oncolytic viruses led to a pronounced tumor regression, which was not further enhanced by the GLV-1h169-mediated expression of relaxin. As relaxin can induce the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) via the relaxin pathway, blood vessel density in C33A tumors was analyzed. The expression of relaxin did not result in an increased blood vessel density. As the basal membrane of blood vessels contains collagen IV, it was analyzed whether the expression of relaxin increases the permeability of vessels. In virus-treated tumors, vessel permeability was significantly increased compared to those treated with PBS. However, the expression of relaxin did not further increase the vessel permeability.

The degradation of matrix proteins by proteolytic enzymes can facilitate the shedding of malignant cells from the primary tumor, thus supporting metastasis. In PC3-tumor bearing mice, renal and lumbar lymph nodes can be colonized by shedded tumor cells and form metastases. Thus, the volume of these lymph nodes was measured and it was found that lymph nodes in virus-treated mice were significantly smaller than those in PBS-treated mice.

Furthermore, the MMP-9-encoding virus GLV-1h255 was analyzed. *In vitro* experiments confirmed that MMP-9 is expressed by GLV-1h255-infected cells. Zymography revealed that the enzyme is active. PC3 tumors show a high basal expression level of MMP-9.

Nonetheless, MMP-9 expression was significantly higher in GLV-1h255-infected tumor areas compared to uninfected areas. The cleavage of matrix proteins can result in the shedding of VEGF, indirectly supporting tumor angiogenesis. However, blood vessel density in GLV-1h68 and GLV-1h255 infected tumor areas was significantly lower than in non-infected tumor areas. GLV-1h255-treated PC3 tumor-bearing mice showed an accelerated and enhanced tumor regression when compared to GLV-1h68-treated mice. Seven days after virus injection, virus titers in GLV-1h255-infected tumors were significantly higher than those infected with GLV-1h68. The MMP-9-mediated degradation of collagen IV did not result in an increased metastasis of renal and lumbar lymph nodes in PC3 tumor bearing mice.

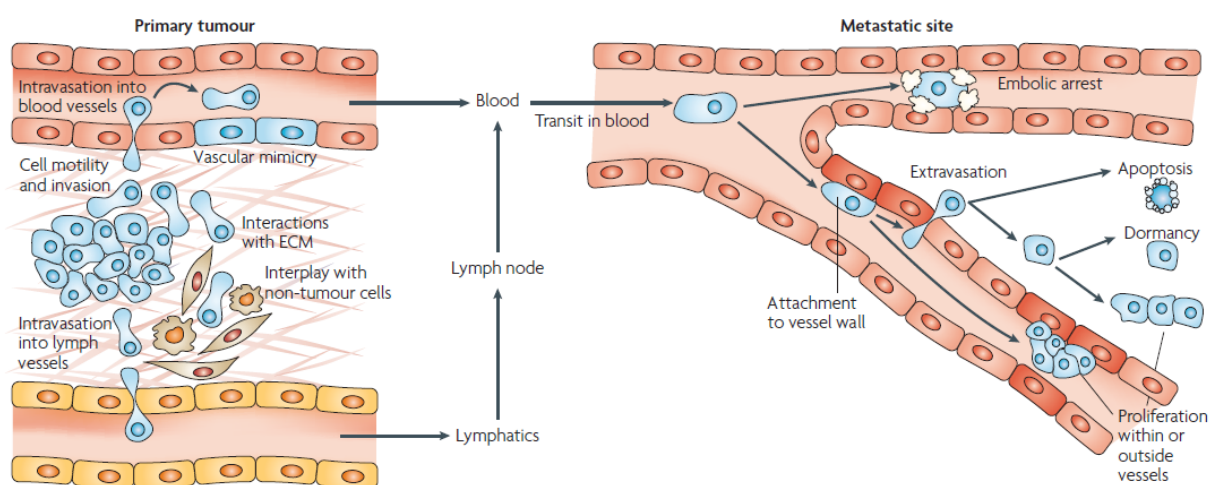
Taken together, this thesis showed that the systemic injection of GLV-1h169 or GLV-1h255 mediated an expression of relaxin or MMP-9 in tumor tissue. The intra-tumoral expression of relaxin did not lead to an enhanced virus spreading or to an enhanced tumor regression. The GLV-1h255-mediated over-expression of MMP-9 in PC3 tumor-bearing mice resulted in a degradation of collagen IV, an accelerated and enhanced tumor regression and a significantly increased virus titer. Potentially negative effects, such as an increased angiogenesis of metastasis, could be excluded.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs: Ein kurze Zusammenfassung des Krankheitsverlaufs

Der menschliche Körper besteht aus etwa 100 Billionen Zellen. Pro Sekunde werden mehrere Millionen Zellen neu gebildet, vor allem solche, die starken Belastungen ausgesetzt sind, wie in der Haut oder dem Darm<sup>1</sup>. Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung, die in Deutschland bei 77 (Männer) und 83 Jahren (Frauen) liegt<sup>2</sup>, wird im Laufe des Lebens eine Größenordnung von ca.  $10^{14}$  Zellteilungen erreicht. Aus diesen beeindruckenden Zahlen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen. Zum einen muss die Zellteilung sehr exakt reguliert werden, und die entsprechenden Mechanismen müssen sehr robust gegenüber Störungen sein. Zum anderen ist neben der Neubildung von Zellen deren definiertes Absterben ebenso wichtig. So können alte, überflüssige oder beschädigte Zellen entfernt werden. Schließlich müssen Schäden an der DNA behoben werden, um eine Degeneration des Erbguts zu unterbinden. Die DNA kann auf vielerlei Weisen beschädigt werden. Wenn diese Schäden nicht oder fehlerhaft repariert werden, können sich Mutationen ansammeln. Auslöser von Mutationen können beispielsweise UV-Strahlen sein. Dieses kurzwellige, energiereiche Licht kann unter anderem zur Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen benachbarten Pyrimidinen führen. Diese Cyclobutan-Pyrimidindimere sind sehr stabil und können über längere Zeit bestehen, falls sie nicht repariert werden<sup>3</sup>. Chemische Agenzien können ebenfalls die DNA modifizieren. Basenanaloga wie 5-Bromuracil können in die Gensequenz eingebaut werden und bei der Replikation mit Adenin (keto-Form) oder Guanin (enol-Form) Basenpaare bilden<sup>4</sup>. Des Weiteren gibt es Viren, wie das Rous-Sarkoma-Virus oder das Humane-Papilloma-Virus, die nach der Infektion des Wirts Krebs auslösen können<sup>5,6</sup>. Die Krankheit kann ebenso durch die Aktivierung zellulärer proto-Oncogene, der Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen<sup>7,8</sup> oder Vererbung einer genetischen Prädisposition entstehen<sup>5</sup>. Eine einzelne Mutation reicht in der Regel nicht aus, um eine gesunde Zelle in eine Krebszelle zu konvertieren. Vielmehr ist es ein mehrstufiger Prozess, der sich über einen längeren Zeitraum erstrecken kann<sup>9</sup>. Da es zu Muta-

tionen in den verschiedensten Zelltypen des Körpers kommen kann, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Krebsarten. Sie werden meist nach dem Typ des entarteten Gewebes benannt, z.B. stammen Karzinome von Epithelzellen ab. Eine Krebszelle unterscheidet sich in wichtigen Aspekten von einer gesunden Zelle. Sie ist meist genetisch instabil und anfälliger für weitere Mutationen als eine normale Zelle<sup>10</sup>. Krebszellen sind unsterblich und können ungebremst proliferieren. Dies kann durch eine Störung in der Zellteilung und/oder der Apoptose sowie der Aktivität der Telomerase, die die Chromosomenenden verlängert, hervorgerufen werden. Weiterhin haben Krebszellen oft eine verringerte Adhäsion bzw. sind unabhängig von Verankerung zu dem umgebenden Gewebe und zeigen keine Kontaktinhibierung<sup>11</sup>. Im Gegensatz zu normalen Zellen bilden Krebszellen keine definierten Gewebstrukturen, sondern wuchern unkontrolliert. Erreicht die Tumormasse einen Durchmesser von über 0,2 mm ist keine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung mehr gewährleistet<sup>5</sup>. Tumorzellen sekretieren daher Angiogenese-induzierende Proteine, wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor).



**Abbildung 1. Verhalten von Tumorzellen während des metastatischen Prozesses.**

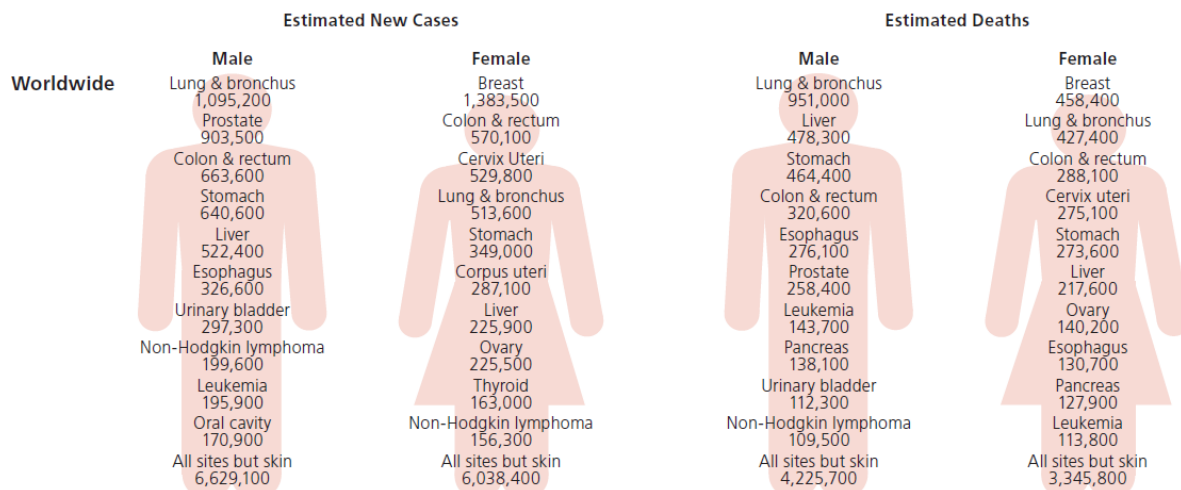
Tumorzellen können sich aus dem Zellverbund des Primärtumors lösen und durch Intravasation in Blut- oder Lymphgefäße gelangen. Im Blut angelangt stirbt ein Großteil der Zellen ab, für die Überlebenden gibt es drei Möglichkeiten: Zum Einen können sie durch Extravasation aus den Blutgefäßen gelangen, zum Anderen in Blutgefäßen proliferieren oder es bildet sich ein embolischer Verschluss. Für die aus den Blutgefäßen gelangten Zellen gibt es wiederum drei Möglichkeiten: Sie können in Apoptose gehen, in einen Schlafzustand verfallen oder proliferieren. Über das Lymphsystem können Tumorzellen in Sentinel-Lymphknoten gelangen und dort durch Proliferation Metastasen bilden. Abbildung modifiziert aus<sup>12</sup>.

Mit dem Fortschreiten des Tumorwachstums steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich Zellen aus dem Tumorgewebe lösen und über das Blut- oder Lymphsystem auswandern. Fin-

den die Zellen dabei geeignete Wachstumsbedingungen vor, können sie metastasieren (Abbildung 1). Manche Zellen erreichen aber auch Nischen, wie z.B. das Knochenmark, in denen sie in eine Ruhephase eintreten und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv werden können<sup>13,14</sup>. Wenn der Primärtumor oder die Metastasen in lebensnotwendige Organe wuchern, kann es zu deren Versagen und letztendlich zum Tod kommen.

## 1.2 Klassische Formen der Krebstherapie

Global gesehen ist jeder achte Todesfall durch Krebs bedingt. Krebs ist insgesamt die zweithäufigste Todesursache und für mehr Todesfälle als AIDS, Tuberkulose und Malaria zusammen verantwortlich<sup>15</sup> (Abbildung 2).



**Abbildung 2. Todesfälle und Neuerkrankungen durch Krebs.**

Globale Neuerkrankungen und Todesfälle durch Krebs, aufgelistet nach Typus. Daten des Jahres 2008<sup>15</sup>.

Mehrere Faktoren erschweren die Krebstherapie. Zum einen deckt der Begriff Krebs ein breites Feld verschiedener Krankheiten ab, die als Gemeinsamkeit eine unkontrollierte Zellteilung und eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen aufweisen. Zum anderen sind Tumore an sich heterogene Gebilde, die aus unterschiedlichen Zelltypen bestehen<sup>16</sup>. Weiterhin evolvieren Krebszellen im Verlauf der Krankheit, so dass eine Therapie zunächst erfolgreich sein kann, es später aber zu einem Rückfall kommt. Aufgrund dieser Schwierigkeiten ist es notwendig, unterschiedliche Therapieansätze zur Verfügung zu haben und neue Behandlungsmöglichkeiten zu erforschen. Im Weiteren werden verschiedene klassi-



sche Formen der Krebstherapie näher beleuchtet und auf deren Vor- und Nachteile eingegangen.

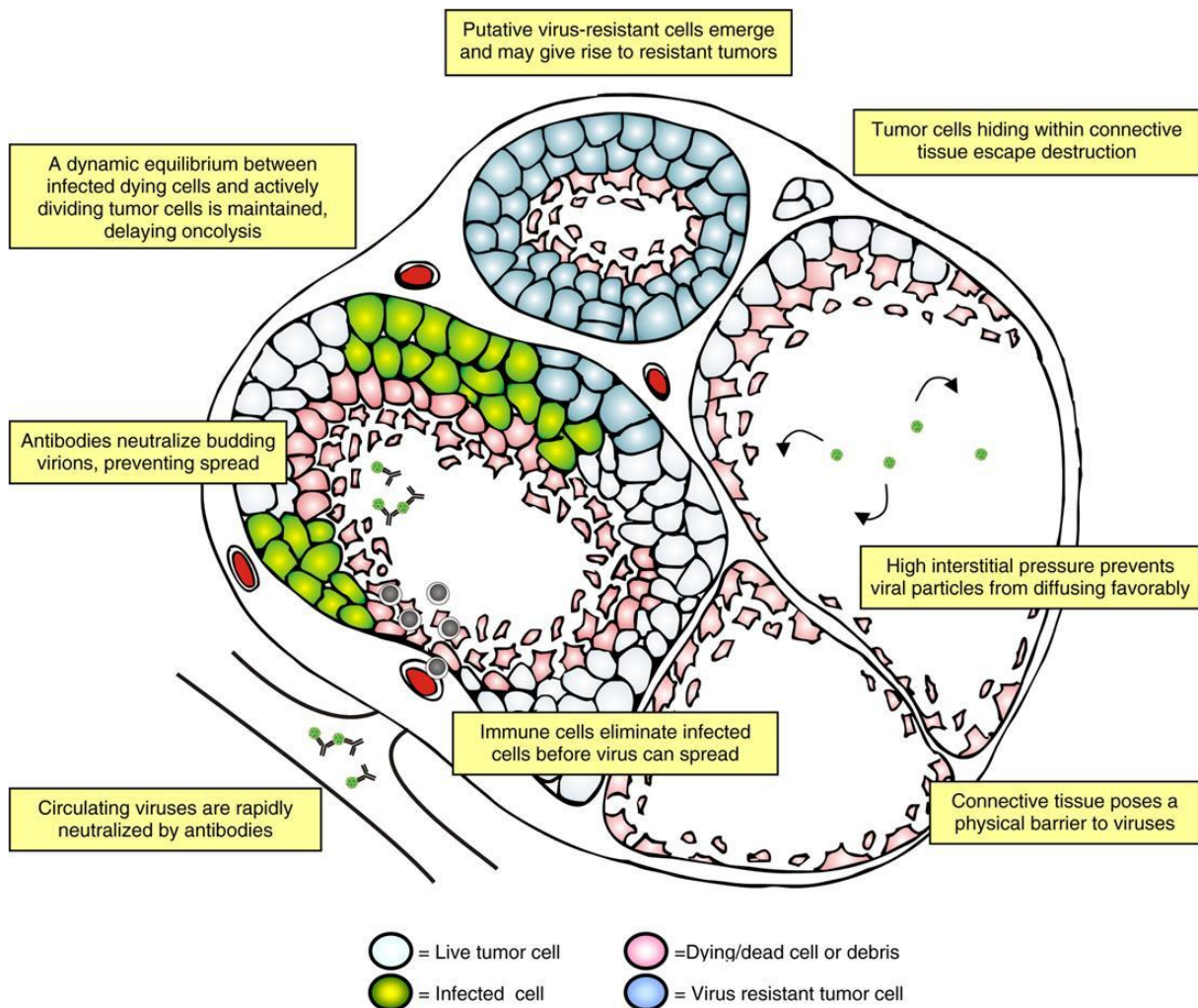
Der operative Eingriff ist die älteste Form der Krebsbehandlung. Im optimalen Fall, wenn es noch nicht zur Metastasierung gekommen ist und der Tumor vollständig entfernt werden kann, bietet diese Methode die besten Heilungschancen. Kann der Tumor nicht vollständig entfernt werden, so wird versucht, das verbleibende Gewebe mittels Bestrahlung oder Chemotherapie zu schädigen<sup>17</sup>. Des Weiteren können Biopsieproben zur Analyse und zum Tumor *Staging* verwendet werden<sup>18</sup>. Ebenfalls seit langer Zeit wird die Chemotherapie eingesetzt. Hierbei wird meist der Fakt ausgenutzt, dass sich Tumorzellen häufig teilen. Es gibt verschiedene Gruppen von Chemotherapeutika, die sich in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden. So modifizieren alkylierende Agenzien die DNA durch die Anheftung einer Alkylgruppe an Guanin und stören somit die Zellteilung. Dieser Effekt ist jedoch nicht von der Phase des Zellzyklus abhängig und somit sehr unspezifisch und mit starken Nebenwirkungen verbunden. Weitere Substanzklassen sind Topoisomerase- oder Mitoseinhibitoren. Die Gabe von Zytostatika wirkt auf rasch proliferierende Zellen im Allgemeinen und so kann es auch zur Beeinträchtigung von gesunden Geweben wie z.B. dem Knochenmark, Haarfollikeln oder Zellen des Verdauungstrakts kommen<sup>18,19</sup>. Eine andere Methode, um den Tumor durch eine Schädigung der Tumorzellen zu bekämpfen, stellt die Bestrahlung dar. Dabei wird ionisierende Strahlung verwendet, durch die freie Radikale gebildet werden und DNA-Doppelstrangbrüche entstehen können. Freie Radikale können zelluläre Enzyme sowie andere Moleküle beschädigen und somit eine weitere Teilung der Zellen verhindern. Als Nebenwirkungen treten meist Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit oder Kopfschmerzen auf, jedoch oft nur während der Behandlung<sup>20</sup>. Ein weiterer Ansatzpunkt der Tumorthherapie stellt die Hormon- oder Antikörpertherapie dar. Im erstgenannten Fall wird ausgenutzt, dass manche Tumore verstärkt unter dem Einfluss von Hormonen wachsen. So wird beim androgenabhängigen Prostatakarzinom auf einen Androgenentzug gesetzt (*androgen deprivation therapy*). Dies führt zu einem Schrumpfen oder verlangsamten Wachstums des Tumors, es ist jedoch keine vollständige Genesung möglich<sup>21</sup>. Zusätzlich ist die Therapie mit einigen Nebenwirkungen verbunden und es kann zur Androgenunabhängigkeit des Tumors kommen<sup>22</sup>. Die Antikörpertherapie zielt

beispielsweise auf eine Inhibierung der Angiogenese ab (Avastin oder Bevacizumab)<sup>23</sup>. Die Antikörper werden teilweise in Kombination mit Chemotherapeutika oder alleine eingesetzt. Nebenwirkungen können allergische Reaktionen, grippeähnliche Symptome, Hautreizungen, Übelkeit, Diarrhöe, eine Veränderung des Blutbildes, Blutungen, und Herzprobleme sein<sup>24</sup>. Wie bereits oben angeklungen, werden verschiedene Methoden kombiniert, um einen optimalen Effekt zu erzielen. Einen entscheidenden Beitrag zu einer erfolgreichen Therapie leistet die frühzeitige Diagnose, denn solange es noch nicht zur Metastasierung gekommen ist, kann durch die Entfernung des Primärtumors die Krankheit geheilt werden. Teilweise, wie im Falle von Brustkrebs, wird auf Routine-Screenings gesetzt, damit rechtzeitig die richtigen Maßnahmen in die Wege geleitet werden können<sup>25,26</sup>.

### **1.3 Krebstherapie mittels onkolytischer Viren**

Neben den in Abschnitt 1.2 beschriebenen Methoden der Krebstherapie steht mit den onkolytischen Viren ein weiterer Ansatz zur Verfügung. Die Anfänge der Virotherapie gehen auf das späte 19. Jahrhundert zurück. Diese Zeit gilt als der Beginn der modernen Medizin und wurde von Namen wie Virchow, Lister, Koch und Pasteur geprägt. Die Krebstherapie beschränkte sich zu dieser Zeit im Wesentlichen auf das operative Entfernen der Tumore. Anästhesie und eine aseptische Arbeitsweise wurden ebenfalls in diesem Zeitraum etabliert. Erste Versuche wurden mit onkolytischen Viren durchgeführt, nachdem man beobachtet hatte, dass es nach natürlich auftretenden Infektionen zu einer Tumorrogression kam. Zu dieser Zeit war über Viren aber noch fast nichts bekannt, wichtige Erkenntnisse wurden erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts gewonnen<sup>27</sup>. Dock war einer der ersten, der einen Fall von Remission beschrieb. Dabei handelte es sich um eine an Leukämie erkrankte Patientin, die vermutlich eine Influenza-Infektion hatte<sup>28</sup>. De Pace berichtete 1912 von einer Frau, bei der es, nachdem sie von einem tollwütigen Hund gebissen wurde, zu einer temporären Regression des Tumors kam<sup>29</sup>. 1922 zeigten Experimente von Levaditi *et al.*, dass Vaccinia Virus (VACV) in verschiedenen Tumoren replizieren kann und eine Tumor-inhibierende Wirkung in Nagern hat<sup>30</sup>. Neben diesen Erkenntnissen gab

es auch schon früh erste klinische Studien. Dabei wurden Krebspatienten oftmals infektiöse Körperflüssigkeiten oder Gewebe verabreicht, die aus Patienten mit Viruserkrankungen gewonnen wurden. Dies führte teilweise zu gravierenden Nebenwirkungen oder sogar dem Tod<sup>27</sup>. Weitere klinische Studien folgten 1949 mit dem Hepatitis B Virus<sup>31</sup>, 1952 mit dem West Nile Virus<sup>32</sup>, 1956 mit Adenovirus<sup>33</sup> und 1974 mit dem Mumpsvirus<sup>34</sup>. Trotz großer Erfolge gab es auch einige Herausforderungen, die in den 1970er bis 1980er Jahren zu einem nachlassenden Interesse an onkolytischen Viren führten. Die wichtigsten Hemmnisse für einen erfolgreichen Einsatz von onkolytischen Viren sind in Abbildung 3 zusammengefasst.



**Abbildung 3. Mögliche Hemmnisse für den erfolgreichen Einsatz von onkolytischen Viren.**

Schematische Darstellung eines Tumors. Herausgehoben sind einige bekannte und potentielle Probleme der Virotherapie. Bei der Ausbreitung von Viruspartikeln in der Tumormasse kann die extrazelluläre Matrix (EZM) eine physikalische Barriere darstellen. Weitere Probleme können die rasche Neutralisierung von Viren durch das Immunsystem, so wie der hohe interstitielle Druck im Tumor, durch den der Austritt von Viruspartikeln aus den Blutgefäßen sowie die Ausbreitung im Tumor erschwert werden, darstellen<sup>35</sup>.

Häufig kommt es nach der Injektion von onkolytischen Viren zu einer unvollständigen und heterogenen Infektion des Tumorgewebes<sup>36-42</sup>. Dabei kann ein hoher interstitieller Druck im Tumorgewebe den Austritt von Viren aus den Blutgefäßen, bzw. ihre Diffusion im Gewebe erschweren<sup>43-46</sup>. Des Weiteren kann durch die EZM die Virusbreitung behindert werden<sup>41</sup>. Viruspartikel können von der EZM gebunden, bzw. in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden, weil die Matrix als Molekülsieb fungiert<sup>47</sup>. Dies resultiert in einer reduzierten Effektivität der Virotherapie. Zur Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit könnte jedoch die initiale Infektion durch eine Vorbehandlung der Tumore mit proteolytischen Enzymen verbessert werden<sup>35</sup>. Durch den Abbau von EZM-Proteinen durch eine Virus-induzierte intra-tumorale Expression proteolytischer Enzyme konnte die virale Ausbreitung erleichtert werden<sup>48,49</sup>. Eine durchgehende Infektion des gesamten Tumorgewebes ist eine Hauptvoraussetzung für eine effiziente Onkolyse, die im Falle von Vaccinia Virus (VACV) ein kritischer Faktor der Virotherapie ist<sup>50</sup>. Weitere Verbesserungen des therapeutischen Effekts konnten durch die Insertion rekombinanter Gene in onkolytische Viren erreicht werden. Die dadurch ermöglichte intra-tumorale Expression rekombinanter Proteine konnte z.B. zur Inhibierung der Angiogenese genutzt werden<sup>51</sup>.

## **1.4 Vaccinia Virus**

### **1.4.1 Die Systematik der Poxviridae**

VACV gehört zur Familie der Poxviridae, dabei können Viren dieser Familie in zwei Subfamilien untergliedert werden, Chordopoxvirinae und Entomopoxvirinae. Die erstgenannten infizieren Vertebraten, letztere ausschließlich Insekten. Die Chordopoxvirinae lassen sich wiederum in acht Gattungen aufspalten, die Ähnlichkeit in der Morphologie und dem Wirtstropismus zeigen. VACV lässt sich in die Gattung der Orthopoxviridae einordnen, deren Mitglieder Erreger der Pocken sind<sup>52</sup>. Der Ursprung von VACV ist unklar, genetisch ist es dem Pferdepocken-Virus am ähnlichsten<sup>53</sup>.

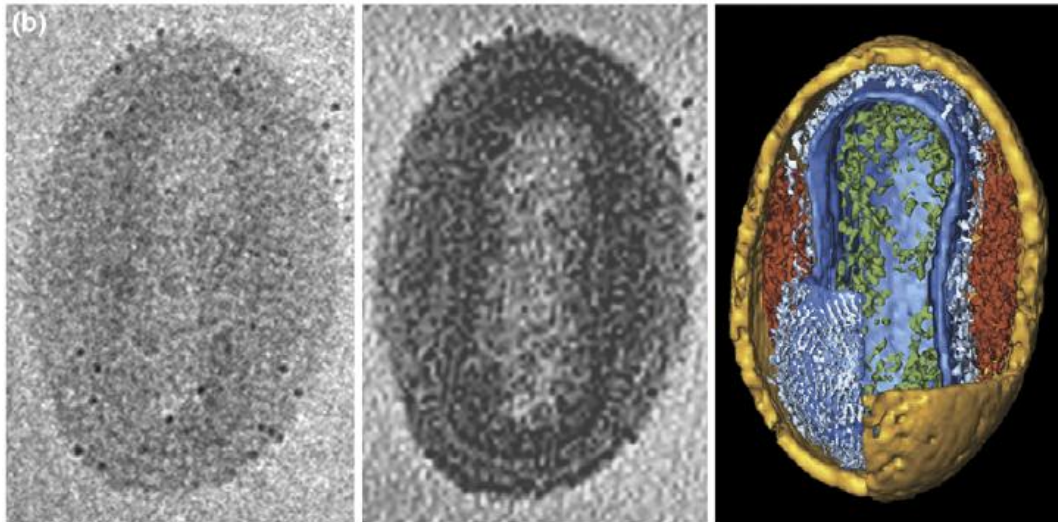
### 1.4.2 Die Rolle des Vaccinia Virus bei der Bekämpfung der Pocken

Pocken begleiten die Menschheit schon seit geraumer Zeit, Schätzungen zufolge seit 10.000 v. Chr.<sup>54,55</sup>. Schon 430 v. Chr. war bekannt, dass Überlebende der Pocken immun gegen eine erneute Erkrankung sind<sup>56</sup>. Eine früh eingesetzte, erfolgreiche Methode bei der Bekämpfung der Pocken war die Inokulation. Dabei wurde Material aus einer frischen Pocke einer infizierten Person entnommen und dem Patienten subkutan in Arm oder Bein appliziert. Diese Methode wurde im 18. Jahrhundert in Europa eingeführt und verbreitete sich rasch, andernorts wurde sie aber schon früher praktiziert<sup>55-57</sup>. 1757 wurde, als einer von Tausenden, ein 8 jähriger Junge in Gloucester, England mit dieser Methode behandelt. Sein Name war Edward Jenner<sup>55</sup>. Jenner selbst inokulierte 1796 einen Jungen mit Material aus einer Pocke einer an Kuhpocken erkrankten Frau, woraufhin der Junge immun gegen weitere Erkrankungen wurde<sup>57</sup>. Dieser Vorgang wurde von Jenner als *vaccination* (engl.) bezeichnet, was sich vom lateinischen *vacca* (Kuh) ableitet<sup>58</sup>.

Die Impfung gegen Pocken wurde schließlich global durchgeführt und 1980 konnte die World Health Organization (WHO) die Ausrottung der Krankheit bekanntgeben<sup>59</sup>. Interessanterweise wurde erst 1939 aufgeklärt, dass es sich bei dem verwendeten Virus nicht um das Kuhpocken-Virus handelt, sondern eine distinkte Form, die daraufhin als VACV bezeichnet wurde<sup>60</sup>.

### 1.4.3 Charakteristika der Vaccinia Viren

Die Abmessungen eines VACV-Partikels betragen ca. 300 x 240 x 120 nm. Der hantelförmige Kern enthält eine 192 kb große, lineare, doppelsträngige DNA, welche für 200 meist nicht überlappende Gene codiert (Abbildung 4). Die Enden der DNA sind jedoch jeweils über *hairpin* Schleifen miteinander verbunden, so dass es sich im Endeffekt um ein einzelsträngiges, zirkuläres Molekül handelt. Es ist mit zahlreichen viruskodierten Proteinen assoziiert, die für die Transkription der RNA-Polymerase und RNA-Prozessierung notwendig sind. Der Viruskern ist von einer Lipoprotein-Hülle umgeben<sup>61,62</sup>.



**Abbildung 4. Morphologie eines VACV Partikels.**

Links, Mitte: Transmissions-Elektronenmikroskopie eines VACV-Partikels. Rechts: Cryo-Elektronen-Tomographie. Farb-Legende: Orange, äußere Membranen, rot, Lateralkörper, blau, der hantelförmige Kern, grün, DNA, hellblau, *crystalline spike layer*<sup>63,64</sup>.

#### 1.4.4 Infektion, Replikation und Ausbreitung

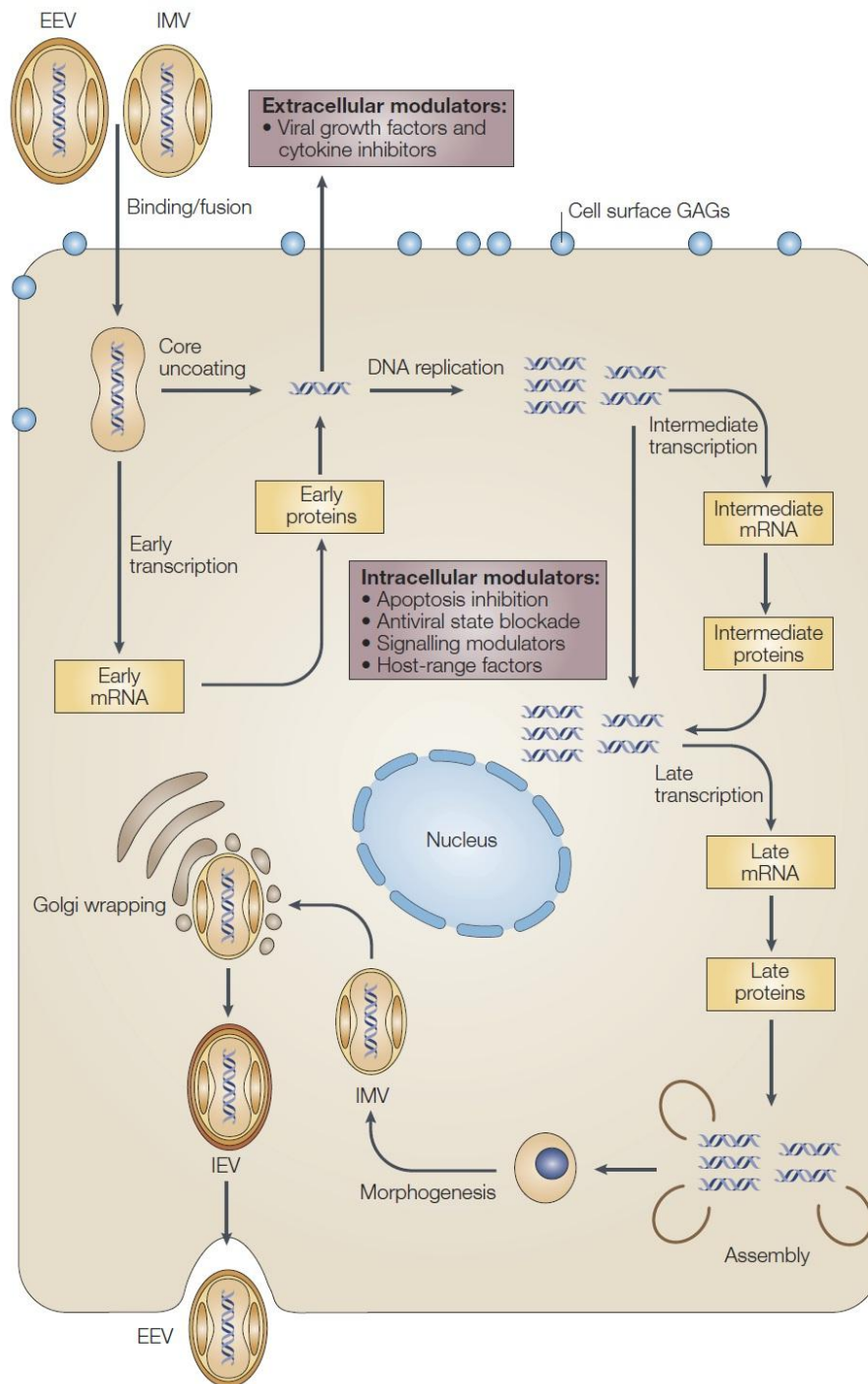
Eine Besonderheit von VACV ist das Vorhandensein mehrerer infektiöser Formen. Die am weitesten verbreitete Form wird als IMV (*intracellular mature virion*) bezeichnet<sup>65</sup>. Sie wird von nur einer Membran umhüllt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine einzelne Lipid-Doppelschicht<sup>63,66,67</sup>. Dies ist interessant, da es sich um eine von einer Zell-Organelle abgeleitete Membran handelt und es Vermutungen gab, dass es sich um eine Doppelmembran handelt<sup>68,69</sup>. Diese Vermutungen konnten aber nicht bestätigt werden. Weitere Formen sind IEV (*intracellular enveloped virion*) und EV (*extracellular virion*). Die EV lassen sich wiederum in CEV (*cell-associated enveloped virus*) und EEV (*extracellular enveloped virus*) unterteilen.

Der Eintritt von IMV erfolgt im Wesentlichen über drei Schritte. Das Anhaften der Viruspartikel, die Aktivierung von Fusionsproteinen und die Membranfusion. Beim Anhaften der Viruspartikel spielen sowohl virale Proteine (z.B. D8, A27, H3), als auch Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), wie die Glykosaminoglykane (GAGs), eine Rolle<sup>70-74</sup>. Interessanterweise konnten noch keine Rezeptoren gefunden werden, die bei der Infektion von VACV involviert sind, evtl. sind *Lipid Rafts* beteiligt<sup>75</sup>. Die Fusion kann mit der Plasmamembran der Wirtszelle oder mit einem endozytotischen Vesikel erfolgen<sup>70,76-</sup>

<sup>80</sup>. Bei der Aufnahme könnte auch Micropinozytose eine Rolle spielen<sup>81,82</sup>. Obwohl die endosomale Aufnahme normalerweise über einen Schritt mit niedrigem pH-Wert läuft, scheint dieser hier nicht notwendig zu sein<sup>83-85</sup>. Bei der EEV Form konnte gezeigt werden, dass die fragile, äußere Membran vor dem Eintritt in die Zelle zerstört wird<sup>86</sup>. Dadurch wird die IMV-Membran freigelegt, es kann zur Fusion und dem Eintritt des Viruskerns ins Cytosol kommen. Dort angekommen, beginnt die Replikation.

Der Replikationszyklus (Abbildung 5) von VACV läuft ausschließlich im Cytosol ab, es kommt zu keiner Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom<sup>61</sup>. VACV nutzt im Wesentlichen viral kodierte Proteine für die DNA-Replikation und die mRNA-Synthese, nur eine minimale Interaktion mit Wirtsproteinen ist notwendig. Das erlaubt es dem VACV, in vielen verschiedenen Zelltypen zu replizieren und die Wirtsabwehr zu vermeiden<sup>62</sup>. Der Viruskern enthält die zur Initiation der mRNA-Synthese benötigten Proteine wie RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren und RNA-modifizierende Proteine<sup>61,87</sup>. Die Replikation der viralen DNA findet in den sogenannten *virus factories* statt und kann in mehrere Phasen unterteilt werden<sup>88-90</sup>. Dabei wird die Makromolekül-Synthese der Wirtszelle vollständig gestoppt. Während der Virus-Replikation wird jedes Gen während einer definierten Phase exprimiert (*early, intermediate, late*). Dies wird über die entsprechenden viralen Promotoren gesteuert<sup>62</sup>. Nach der Expression der späten Proteine beginnt in den *virus factories* der Zusammenbau der Viren. Dabei wird die virale DNA mit Proteinen und Lipiden verpackt und schließlich werden die IMV fertiggestellt<sup>91</sup>. Die meisten IMV verbleiben bis zur Lyse in den Wirtszellen, ein Teil gelangt jedoch über Mikrotubuli zum Golgi-Apparat<sup>92,93</sup>. Dort erhalten sie eine vom *trans*-Golgi-Netzwerk oder von frühen Endosomen abgeleitete Membran und werden dann als IEV bezeichnet<sup>94</sup>. Diese werden erneut über Mikrotubuli transportiert und erreichen so die Plasmamembran<sup>95-98</sup>. Dort kommt es zur Fusion mit selbiger. Verbleiben die Viruspartikel auf der Zelloberfläche werden diese CEV genannt, lösen sich diese ab, EEV. Von den beschriebenen Formen sind IMV für die Übertragung von Wirt zu Wirt wichtig, CEV und EEV für die Ausbreitung<sup>94,99</sup>. CEV können über polymerisierende Aktinschwänze von der Zelloberfläche weggeschoben werden und andere Zellen penetrieren. EEV sind für die Ausbreitung über längere Entfernungen notwendig<sup>62</sup>.



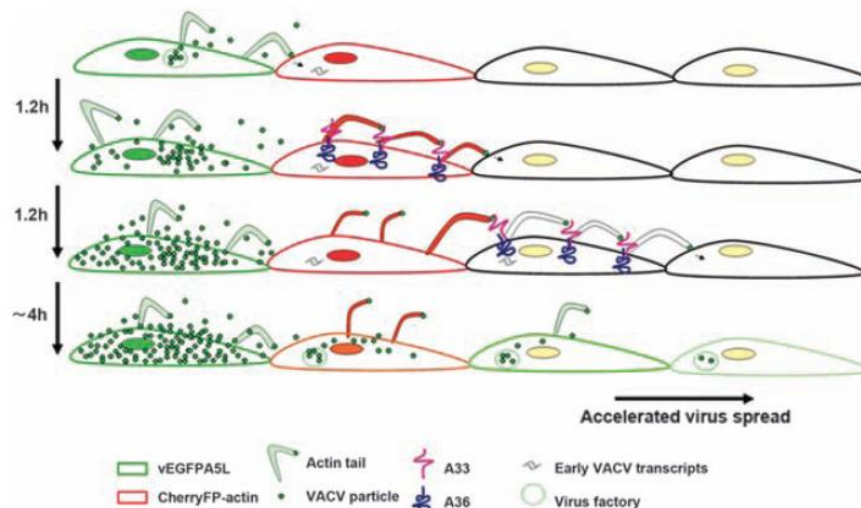


**Abbildung 5. VACV Replikationszyklus.**

Die Infektion kann entweder durch IMV (*intracellular mature virus*) oder EEV (*extracellular enveloped virus*) erfolgen. Die Bindung des Virus erfolgt über verschiedene virale Proteine sowie GAGs (Glykosaminoglykane) oder durch weitere Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Die Virusreplikation erfolgt in drei Phasen (*early*, *intermediate* und *late*), gefolgt von der Morphogenese der Viruspartikel. Die IMV werden über Mikrotubuli zum Golgi-Apparat transportiert. Dort werden sie von einer von dieser Organelle abgeleiteten Membran umhüllt. Diese Form bezeichnet man als IEV (*intracellular enveloped virus*). Die IEV fusionieren mit der Zellmembran und bilden dann die CEV (*cell-associated enveloped virus*), die entweder über eine Polymerisation von Aktinschwänzen aus der Zelle befördert oder als EEV freigesetzt werden. EEV können auch durch ein Abknospen der IMV entstehen<sup>100</sup>.



Doceul *et al.*<sup>101</sup> beschrieben 2010 einen Mechanismus, der die rasche Ausbreitung von VACV erklären kann. Dabei zeigten sie, dass die Ausbreitung schneller erfolgt, als es wenn es sukzessive zu Infektion, Replikation und Freisetzung kommt. Neu infizierte Zellen exprimieren früh Oberflächenproteine (A33 und A36), die die Zelle als infiziert markieren. Superinfizierende Viruspartikel können so abgewiesen und rasch an nicht infizierte Zellen weitergereicht werden (Abbildung 6).




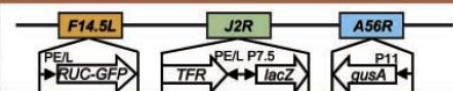
**Abbildung 6. Ausbreitung viraler Partikel über den A33/A36 Proteinkomplex.**

Von Doceul *et al.* vorgeschlagener Mechanismus zur raschen Ausbreitung von VACV. Früh nach der Infektion werden A33 und A36 exprimiert, die entsprechende Zelle ist als infiziert markiert. Kommen CEV/EEV mit dem A33/A36 Proteinkomplex in Kontakt, wird die Bildung von Aktinschwänzen induziert. Diese reichen die Viruspartikel an nicht infizierte Zellen weiter<sup>101</sup>.

#### 1.4.5 Die rekombinanten Vaccinia Viren GLV-1h68, GLV-1h169 und GLV-1h255

Einige Faktoren machen VACV zu einem gut geeigneten Kandidaten für die onkolytische Virustherapie. Dazu gehört die Replikation im Zytoplasma ohne eine Integration in das Wirtsgenom. Weiterhin können bis zu 25 kb große DNA-Fragmente in das Virusgenom inseriert werden<sup>102</sup>. Durch den Einsatz als Impfstoff gegen die Pocken ist VACV sehr gut charakterisiert und es liegen Antikörper vor (z.B. Rabbit-anti-Vaccinia Virus Antikörper, Quartett, Berlin), die bei Komplikationen während des therapeutischen Einsatzes angewendet werden können, um Viruspartikel zu neutralisieren. Die Vaccinia-Infektion hat beim Menschen einen milden Verlauf ohne starke Nebenwirkungen. Weiterhin weist VACV einen natürlichen Tumortropismus auf, der bei der Konstruktion von GLV-1h68

weiter verbessert wurde<sup>103</sup>. Dieses Virus wurde durch gezielte Mutagenese des LIVP-Wildtyp-Stammes (Lister virus from the Institute of Viral Preparations, Moscow, Russia) hergestellt (Abbildung 7)<sup>104</sup>.

Recipient VACV strains	Gene inserts	Viral genome	Strain designation / phenotype
LIVP wt	none		LIVP wt
LIVP wt	<i>RUC-GFP, lacZ, TFR, gusA</i>		<b>GLV-1h68</b> RUC-GFP <sup>+</sup> , LacZ <sup>+</sup> , GUS <sup>+</sup>

**Abbildung 7. Schematische Darstellung der Expressionskassetten von GLV-1h68 und dem parentalen LIVP- Wildtyp.**

GLV-1h68 wurde auf Basis des LIVP-Wildtyp-Stammes konstruiert. Dabei wurden drei Genexpressionskassetten eingefügt, für ein Fusionsprotein aus *Renilla* Luciferase und *Aequorea* GFP (F14.5L), für  $\beta$ -Galactosidase (J2R) und für  $\beta$ -Glucuronidase (A56R). Abbildung modifiziert aus<sup>104</sup>.

Dabei wurden in die Genloci F14.5L, J2R und A56R Genexpressionskassetten unter Deletion der viralen Gene eingefügt. Dies führt zu einer verbesserten Tumorselektivität, wie bereits in humanem Brustkarzinom, anaplastischem Schilddrüsenkarzinom, malignem Pleuramesotheliom, Pankreaskarzinom und caninem Brustkarzinom gezeigt werden konnte<sup>104-109</sup>.

Das Gen F14.5L kodiert für ein Transmembranprotein, welches mit dem N-Terminus in der Membran des IMV verankert ist. Zusätzlich ist es auf der Oberfläche infizierter Zellen zu finden und vermittelt eine Calcium-unabhängige Zelladhäsion<sup>110</sup>. Eine Deletion dieses Gens führt zu einer verminderten Virulenz in Mäusen<sup>111</sup>. In diesen Locus wurde ein Gen, welches für ein Fusionsprotein aus *Renilla* Luciferase und *Aequorea* GFP (*green fluorescent protein*) kodiert, inseriert. Beide Reportergene eignen sich für das *in vivo* Imaging in Mäusen. Im Falle der Luciferase muss das Substrat Coelenterazin gespritzt werden, bei GFP reicht eine Anregung mit Licht im Bereich von 395 nm aus.

J2R kodiert für die Thymidinkinase (TK), welche die Phosphorylierung von Desoxythymidin zu Desoxythymidin 5'-Phosphat unter ATP-Verbrauch katalysiert und damit für die DNA-Synthese von Bedeutung ist. In virus-transformierten Zellen kommt es zu einer erhöhten TK-Aktivität, was in VACV-Stämmen mit inaktiver TK (wie z.B. LIVP) zu einer verminderten Pathogenität und verbesserten Tumorspezifität führt<sup>104,111-114</sup>. Hier wurde das  $\beta$ -Galactosidase-Gen inseriert. Das Enzym spaltet das Substrat 5-Brom-4-chlor-

3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid. Das entstehende Produkt oxidiert zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, einem blauen Farbstoff. Zusätzlich konnte dieses Enzym verwendet werden, um die Tumorthherapie effizienter zu gestalten. Dabei wurde ein Prodrug verwendet, welches enzymatisch in die cytotoxische Form umgewandelt wird<sup>115</sup>.

A56R kodiert für Hemagglutinin (HA) welches mit K2 ein Multimer auf der Oberfläche infizierter Zellen bildet. Der Komplex kann durch eine Interaktion mit dem *entry/fusion complex* (EFC) den Viruseintritt und die -fusion sowie die Bildung von Synzytien verhindern<sup>116</sup>. In diesen Locus wurde das Gen für  $\beta$ -Glucuronidase inseriert, welche 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure spaltet. Aus dem Produkt der Reaktion entsteht nach Oxidation und Dimerisierung 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo.

Bei der Konstruktion neuer, auf GLV-1h68 basierenden Viren, wird eines der aufgeführten Reportergene ersetzt. Bei den Viren GLV-1h107 – GLV-1h109 beispielsweise wurde die TK durch GLAF-1, einem VEGF-Antikörper, ausgetauscht, was zu einem signifikant verbesserten therapeutischen Effekt führte<sup>117</sup>. Weitere Beispiele sind die in dieser Arbeit verwendeten rVACV (rekombinante Vaccinia Viren) GLV-1h169 und GLV-1h255. Bei GLV-1h169 wurde das Gen für humanes Relaxin 1 unter Kontrolle des *synthetic early/late* Promotors in den TK-Locus inseriert, bei GLV-1h255 das humane MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) Gen unter Kontrolle des *synthetic early* Promotors.

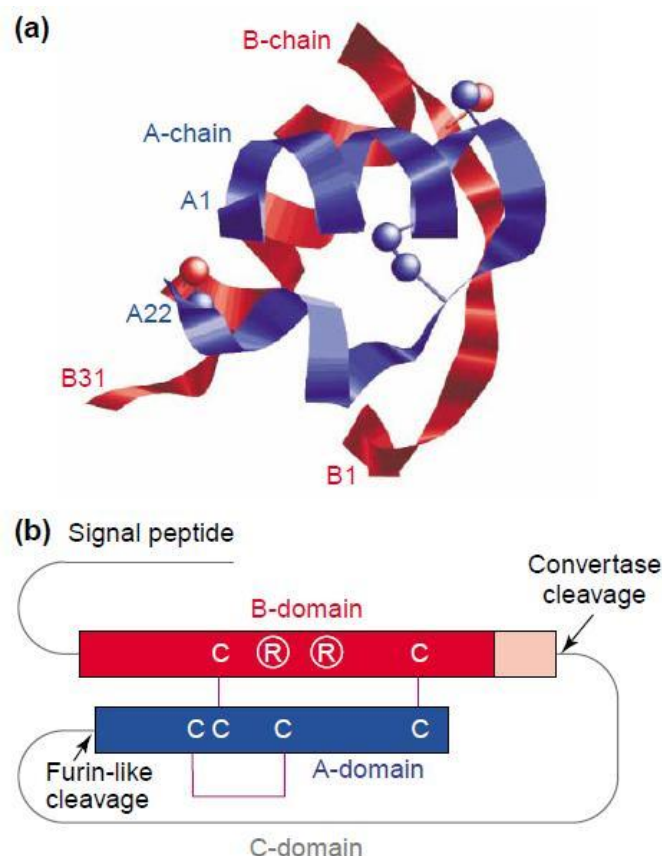
## 1.5 Relaxin

### 1.5.1 Die Familie der Relaxin-Proteine und deren Rezeptoren

Die Relaxin-Protein Familie umfasst Relaxin 1-3, die Insulin-like Peptides (INSL) 3-6 sowie die Rezeptoren RXFP 1-4. Aus historisch, nomenklatorischen Gründen entspricht Relaxin 2, welches ausschließlich in Menschen und Menschenaffen vorkommt, Relaxin 1 in allen anderen Säugetieren<sup>118</sup>. Relaxin 3, welches erst kürzlich entdeckt wurde<sup>119</sup>, stellt Sequenzanalysen zufolge vermutlich die ursprünglichste Form aller Relaxine dar<sup>120</sup>. Aufgrund der Ähnlichkeiten in der Proteinstruktur und -prozessierung der Relaxinproteine zu Insulin wurde ein gemeinsames Vorläufergen für diese Proteine postuliert. Deshalb

wurden die Relaxinproteine in die Insulin-Superfamilie eingeordnet. Bei den Ähnlichkeiten handelt es sich zum einen um sechs Cysteine an konservierten Positionen, die drei Disulfidbrücken ausbilden können, zwei davon zwischen der A- und B-Kette, eine innerhalb der A-Kette. Zum anderen wird das prozessierte Protein, ein Heterodimer aus A- und B-Kette, durch das Herausspalten der C-Kette aus dem Pro-Hormon gebildet (Abbildung 8)<sup>118,121-123</sup>.

Die wichtigsten Merkmale der Relaxin-Rezeptoren sind auf der einen Seite das Vorhandensein von sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices und auf der anderen Seite die Kopplung an G-Proteine, die für die Relaxin-Signalkaskade von Bedeutung sind. Zwei der vier Rezeptoren, RXFP 1 und 2 (auch als LGR 7 und LGR 8 bezeichnet), wurden 2002 von Hsu *et al.* beschrieben<sup>124,125</sup>. Relaxin 1 und 2 interagieren mit RXFP1 und RXFP2, wobei die Interaktion mit RXFP1 von physiologischer und jene mit RXFP2 von pharmakologischer Relevanz ist<sup>118</sup>.



**Abbildung 8. Struktur des Relaxin-Proteins.**

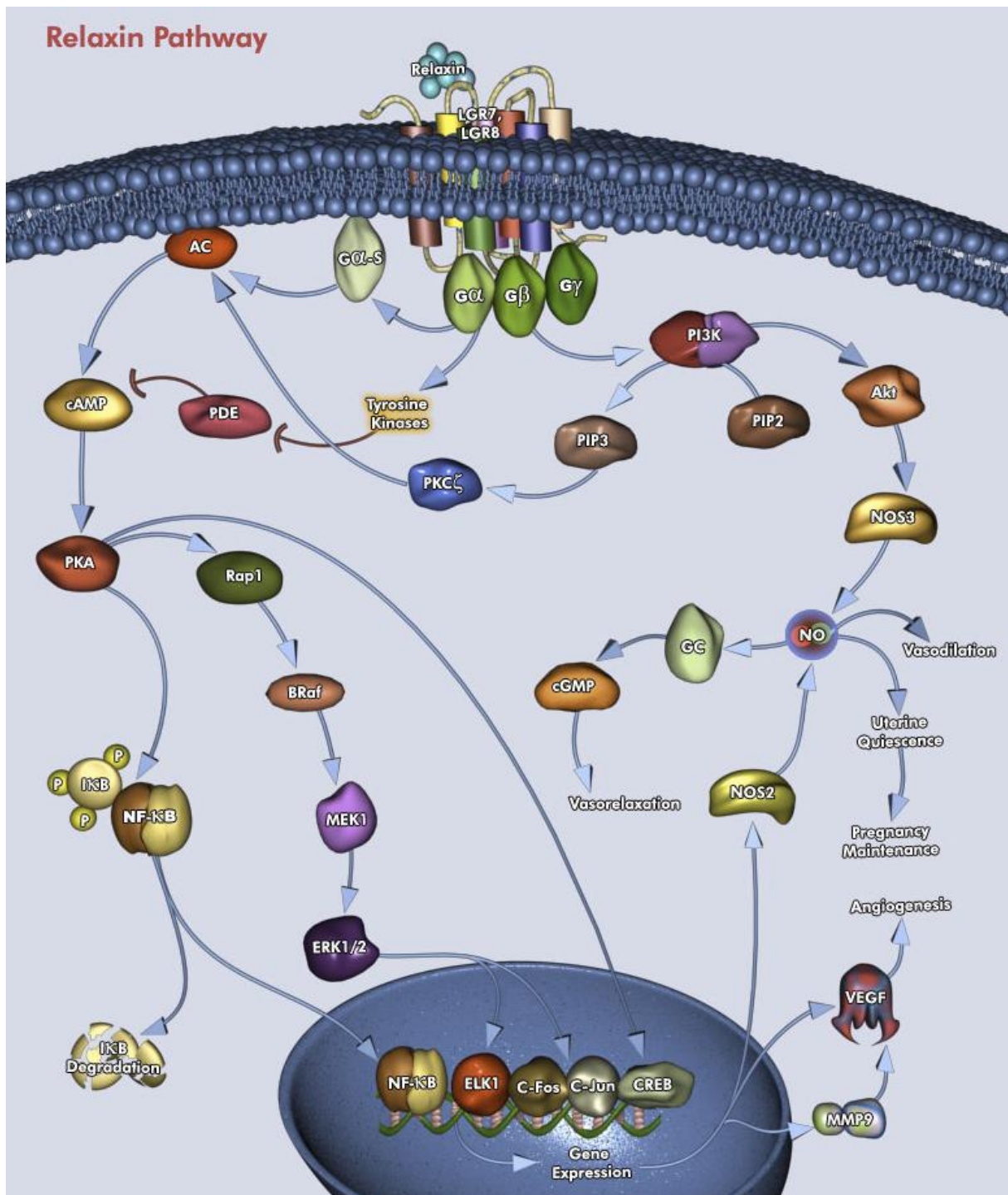
(A) Kristallstruktur von porcinem Relaxin. (B) Schematische Darstellung des Relaxin-Vorläuferproteins. Die C-Kette wird bei der Prozessierung herausgeschnitten. Die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten (C) sind durch Linien dargestellt. Argininreste (R) der B-Kette sind für die Rezeptorbindung von Bedeutung. A-Kette in blau, B-Kette in rot<sup>126</sup>.

### 1.5.2 Der Relaxin-Signalweg

Nach der Bindung des Relaxin-Proteins an den Rezeptor kommt es im ersten Schritt zu einer Aktivierung der an diesen gekoppelten G-Proteine. Daraufhin kommt es durch die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) zu einer Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)<sup>127-130</sup>. Zusätzlichen Einfluss auf die cAMP-Konzentration hat das Aktivitätslevel der Phosphodiesterase (PDE)<sup>131</sup>, welche cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) spaltet. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade kommt es unter anderem zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) in den Zellkern und zur Transkription der *downstream* aktivierten Gene MMP-9 und VEGF<sup>132-134</sup>. Über einen weiteren Zweig der Signalkaskade kann es durch die nitric oxide synthase 2 bzw. 3 (NOS2/3) zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) kommen. Über die Aktivierung von Guanylatcyclase (GC) kann zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet werden<sup>135-140</sup>. Die Komplexität des Relaxin-Signalweges spiegelt sich in einer Fülle von *in vivo* Funktionen wieder.

### 1.5.3 *In vivo* Funktionen von Relaxin

Relaxin gehört zu einer Gruppe von Hormonen und Wachstumsfaktoren, die speziell den Bedürfnissen von Säugetieren angepasst sind. Es wird daher auch als Neohormon bezeichnet. Zu diesen Bedürfnissen zählen unter anderem die Viviparie, die Laktation und die Wundheilung<sup>141</sup>. Bei Frauen hat Relaxin eine besondere Bedeutung während der Schwangerschaft. Diese reicht u.a. von der Implantation über uterines und placentales Wachstum, dem Platzen der Fruchtblase bis hin zu der Weitung des Geburtskanals. Für diese Funktionen von Relaxin ist im Wesentlichen das *Remodeling* der EZM notwendig. Weiterhin ist Relaxin für die Vaskularisierung des Endometriums sowie das Wachstum und die Differenzierung des Brustgewebes verantwortlich<sup>136,141,142</sup>. Zusätzlich kommt es während der Schwangerschaft zu einer Relaxin-vermittelten Vasodilatation. In diesem Zusammenhang spielt die Bildung von NO durch die NOS eine Rolle<sup>143</sup>. Bei Männern wird Relaxin hauptsächlich in der Prostata exprimiert und wird in die Samenflüssigkeit abgegeben. Dort ist es für die Beweglichkeit der Spermien und die Befruchtung wichtig<sup>144-148</sup>. Neben diesen *in*



**Abbildung 9. Schematische Übersicht über den Relaxin-Signalweg.**

Die Relaxin-Rezeptoren RXFP1 und RXFP2 werden auch als LGR7 und LGR8 bezeichnet. AC Adenylatcyclase, PDE Phosphodiesterase, PKC $\zeta$  Proteinkinase C $\zeta$ , PKA Proteinkinase A, NF- $\kappa$ B nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, I $\kappa$ B Inhibitor of NF- $\kappa$ B, PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase, PIP2 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, PIP3 Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat, NOS2/3 Nitric oxide synthase, GC Guanylate cyclase, VEGF Vascular endothelial growth factor, MMP-9 Matrix metalloproteinase 9, Rap1 Ras-proximate-1 or Ras-related protein 1, BRaf Serine/threonine-protein kinase, MEK1 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1, ELK1 E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1, CREB cAMP response element-binding protein, NO Stickstoffmonoxid, cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat, cGMP, cyclisches Guanosinmonophosphat. Nach: Qiagen.com Geneglobe.

*vivo* Funktionen ist Relaxin bei einer Reihe weiterer körperlicher Prozesse involviert. Aufgrund dieser Fülle von Funktionen wird es auch als pleiotropes Hormon bezeichnet.

#### **1.5.4 Die Rolle von Relaxin beim *Remodeling* der extrazellulären Matrix und bei Krebs**

##### **1.5.4.1 Struktur und Funktion der extrazellulären Matrix**

Einen großen Anteil im Gewebe hat der extrazelluläre Raum, der ein Netzwerk aus Makromolekülen enthält, aus welchen sich die EZM zusammensetzt. Bei dieser handelt es sich jedoch nicht um ein inertes Gerüst zur Stabilisierung von Gewebe, vielmehr spielt die EZM eine komplexe Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse. Dazu gehören die Entwicklung, die Migration, das Wachstum, die Funktion und das Überleben jener Zellen, die mit der EZM in Kontakt stehen.

Fibroblasten sezernieren viele der EZM-Komponenten, die im Wesentlichen in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Glykosaminoglykane (GAGs) und fibrilläre Proteine, wie Collagen, Elastin, Fibronectin und Laminin. Dabei sind die Collagene ein Hauptbestandteil der EZM und machen in Säugetieren ca. 25 % der Gesamtproteinmenge aus. Collagene sind reich an Prolin und Glycin. Diese Zusammensetzung erlaubt die Zusammenlagerung von drei  $\alpha$ -Ketten zu einer Superhelix. Insgesamt sind über zwanzig verschiedene Collagen-Typen bekannt.

Die EZM unterliegt einem permanenten Wandel durch Ab- und Aufbau ihrer Komponenten. Ein schneller Abbau findet z.B. während der Schwangerschaft und Geburt statt. Ein lokaler Abbau von EZM-Komponenten kann aber auch die Migration von Zellen erlauben. Dies kann in gesundem Gewebe z.B. die Migration von Blutzellen durch die Basallamina sein oder im Falle von Krebs die Migration von Tumorzellen aus dem Primärtumor heraus in die Blut- und Lymphgefäße (Abbildung 1). Beim Auf- und Abbau von EZM-Proteinen spielen proteolytische Enzyme wie Matrixmetallo- und Serinproteinasen eine große Rolle. Diese beiden Enzymtypen können Proteine wie Collagen, Laminin und Fibronectin, abbauen. Die Aktivität der Proteinase muss sehr präzise reguliert sein, was z.B. durch die Sekretion von inaktiven Vorläuferproteinen oder durch die Expression von



Inhibitoren gewährleistet wird. Im Falle von Matrixmetalloproteinasen handelt es sich um *tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMPs), bei den Serinproteasen um Serpine<sup>149</sup>.

#### **1.5.4.2 Die Rolle von Relaxin und MMPs beim *Remodeling* der extrazellulären Matrix und bei der Krebsentstehung**

Relaxin spielt ebenfalls eine Rolle beim Matrix *Remodeling*. Hisaw beschrieb diesen Effekt zum ersten Mal 1926<sup>150</sup> an der Relaxation des *interpubic ligament* von weiblichen Meerschweinchen, denen er Serum von schwangeren Tieren injizierte. Das Relaxin-Hormon wurde schließlich 1930 entdeckt<sup>151</sup>. Weitere Erkenntnisse über den Einfluss von Relaxin auf die EZM wurden u.a. an Relaxin 1 knockout (-/-) Mäusen gewonnen. Bei diesen Mäusen kam es im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu einem deutlich erhöhten Collagen-Gehalt in verschiedenen Organen weiblicher Mäuse sowie einer altersabhängigen Lungenfibrose<sup>152-154</sup>.

Im Zusammenhang mit Krebs wurden verschiedene Effekte von Relaxin beobachtet. Zum einen wurden negative Effekte<sup>155-159</sup> und zum anderen wurden neutrale bis positive Effekte beschrieben<sup>160-162</sup>. Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese Effekte.

Die Erhöhung der Invasivität und Proliferation von Tumorzellen durch die Expression von Relaxin wird auf die Induktion von MMPs und die Degradation von Collagen zurückgeführt<sup>120,121,142</sup>. Im Folgenden wird näher auf die Wechselwirkungen zwischen MMPs und dem Tumormikromilieu sowie den Einsatz von Relaxin in der onkolytischen Virustherapie eingegangen.

Das Tumorstroma setzt sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen, wie Fibroblasten, Immunzellen, Blut- und Lymphgefäßen, EZM und malignen Zellen. Bei der Expression von MMPs und deren Inhibitoren spielen Neutrophile, Macrophagen, Lymphocyten, Mastzellen, Endothelialzellen, Fibroblasten, dendritische Zellen und hematopoetische Vorläuferzellen eine Rolle. Insgesamt wurden bisher über zwanzig verschiedene MMPs beschrieben<sup>163,164</sup>. Die Aktivität der MMPs, kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Dies erfolgt beispielsweise durch Kompartimentierung, Aktivierung von inaktiven Vorläuferproteinen und Inhibitoren (TIMP1-4). Kommt es durch MMPs zur Spaltung von Matrix-Proteinen, können dabei mit ihr assoziierte Faktoren freigesetzt



**Tabelle 1.** Effekte von Relaxin in verschiedenen Tumormodellen.

Referenz	Modell	Beschriebene Effekte
Binder <i>et al.</i> , 2002 <sup>155</sup>	MCF-7, SK-BR3	Erhöhte Invasivität von SK-BR3- und MCF-7-Zellen nach Inkubation mit Relaxin
Binder <i>et al.</i> , 2004 <sup>156</sup>	Brustkrebspatienten	Erhöhte Relaxinlevel in Brustkrebspatienten gegenüber gesunden Menschen
Feng <i>et al.</i> , 2007 <sup>157</sup>	Prostatakrebs-Gewebeproben, PC3, LNCaP	Erhöhte Relaxinlevel in Patienten mit wiederkehrendem Prostatakrebs gegenüber gesundem Prostatagewebe
Hombach-Klonisch <i>et al.</i> , 2006 <sup>158</sup>	FTC-133 und FTC-238	Erhöhte Zellmotilität und Invasivität von LGR7 transfizierten FTC-133 und FTC-238 Zellen
Thompson <i>et al.</i> , 2006 <sup>159</sup>	LNCaP	Erhöhte Relaxinkonzentration bei androgen-unabhängigen LNCaP Xenograft Tumoren
Radestock <i>et al.</i> , 2005 <sup>160</sup>	MDA-MB-231	Herabgesetzte Expression von Metastasin in stabil exprimierenden Relaxin-MDA-MB-231-Zellen
Radestock <i>et al.</i> , 2008 <sup>161</sup>	MDA-MB-231	Reduziertes Wachstum von Relaxin-MDA-MB-231 Xenograft Tumoren
Rho <i>et al.</i> , 2005 <sup>162</sup>	HeLa	Kein Einfluss von Relaxin auf HeLa-Zellen in Zellkultur

werden. Dies kann z.B. einen Einfluss auf die Tumorvaskulatur haben, welche durch ein Aussprossen lokaler Blutgefäße gebildet wird. Dabei reguliert von inflammatorischen Zellen gebildetes MMP-9 die Verfügbarkeit von VEGF und spielt somit eine große Rolle bei der Angiogenese. Die neuen Blutgefäße sind oft unregelmäßig angeordnet und haben eine höhere Durchlässigkeit als normale Gefäße, da sie nicht durch Perizyten bedeckt sind. Dadurch können Tumorzellen leichter in diese neuen Blutgefäße eindringen<sup>165</sup>. Es wurde aber auch beschrieben, dass der Abbau von EZM-Komponenten zur Freisetzung von Angiogenese-inhibierenden Faktoren, wie Endostatin, Tumstatin und Angiostatin<sup>166-169</sup>, führt.

Weiterhin kann die metastatische Kaskade durch die enzymatische Aktivität der MMPs beeinflusst werden. Die metastatische Kaskade besteht aus den folgenden Schritten:

- Herauslösung von Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors,
- Intravasation in Blut- und Lymphgefäße,
- Überleben in der Zirkulation und der Arrest in der Vaskulatur,
- Extravasation aus den Gefäßen,
- Besiedelung von sekundären Organen.

Bei all diesen Prozessen spielen MMPs eine Rolle, die pro- aber auch anti-metastatisch sein kann<sup>170</sup>. Beispielhaft wird hier auf die ambivalente Rolle von MMP-9 beschrieben. Einerseits wurde in  $\alpha 1$ -null-Mäusen (diese Tiere haben ein erhöhtes MMP-9 Level) mit subkutanen Tumoren eine verringerte Vaskulatur und ein erhöhtes Plasma-Angiostatin-Level gefunden<sup>171</sup>, andererseits wurde MMP-9 Expression nur in invasivem Hautkrebs beobachtet, nicht jedoch in gutartigen Papilloma oder in *in situ* Karzinomen<sup>172</sup>.

Der proteolytische Abbau von Matrixproteinen beseitigt nicht nur eine physikalische Barriere, sondern führt durch die Freisetzung matrixgebundener Faktoren zur Induktion von Signalwegen, die mit der Tumorgenese verbunden sind.

#### **1.5.4.3 Relaxin in der Tumorthherapie**

Relaxin wurde aufgrund seines degradierenden Einflusses auf die EZM bereits in der Tumorthherapie eingesetzt. Da sich beim Einsatz von Adenoviren die EZM als störend für die virale Ausbreitung erwies, wurde Relaxin in die DNA in dieser onkolytischen Viren inseriert<sup>48,49</sup>. Dies resultierte in einer verbesserten viralen Ausbreitung und einem deutlich verbesserten therapeutischem Effekt. Im einem weiteren Ansatz wurden tumortragenden Mäusen genetisch modifizierte hematopoetische Stammzellen (HSC) transplantiert. Diese in den Tumor einwandernden HSCs trugen ein induzierbares Relaxin-Gen. Die Expression von Relaxin im Tumor führte zu einem Abbau von EZM-Komponenten und damit zu einer besseren Infiltration von Antitumor-Immunzellen und damit einem verbesserten therapeutischen Effekt<sup>173</sup>.

## 1.6 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die beiden onkolytischen rVACV GLV-1h169 und GLV-1h255 charakterisiert werden. Bei GLV-1h169 sollte das Gen für humanes Relaxin 1 unter Kontrolle des *synthetic early/late* Promotors in den TK-Locus inseriert werden, bei GLV-1h255 das humane MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) Gen unter Kontrolle des *synthetic early* Promotors. Für die Charakterisierung wurden drei Tumormodelle eingesetzt. Die beiden Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 sowie die Zervixkarzinom-Zelllinie C33A. Es sollte untersucht werden, ob die Expression der oben genannten Gene in den jeweiligen Xenograft Tumoren erfolgt und ob sie den therapeutischen Effekt der rVACV verbessert. Dabei sollten weiterhin die virale Ausbreitung in den Tumoren, Effekte auf Komponenten der EZM und Veränderungen in der Tumolvaskulatur analysiert werden. Außerdem sollte im PC3-Modell erforscht werden, ob es Veränderungen der Metastasierung in lumbalen und renalen Lymphknoten kommt.

---

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxoddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
1x Balanced Salt Solution (BSS)	PAA, A-Pasching
Brij 35	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM High Glucose (4,5 g/L)	PAA, A-Pasching
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Ethanol (p.a.)	Riedel deHaen, Seelze
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, A-Pasching
Gelatine (Rinderhaut)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamicin	PAA, A-Pasching
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamax	Gibco (Invitrogen), Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt

---

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	PAA, A-Pasching
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Low Melt Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nichtessentielle Aminosäuren	PAA, A-Pasching
Orthophosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
1x Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, A-Pasching
Penicillin/Streptomycin	PAA, A-Pasching
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteaseinhibitoren-Mix Complete Mini	Roche, US-Indianapolis
RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching
Saccharose	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, CH-Buchs
Tris-Base	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe

---

Triton X-100		Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA		PAA, A-Pasching
Tween 20		Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %		Merck, Darmstadt

## 2.2 Puffer und Lösungen

CMC-Medium	7,5 g	Carboxymethylcellulose
	500 mL	DMEM (1x Pen/Strep, 5 % FKS)
Einfriermedium	90 %	Kulturmedium
	10 %	DMSO
Entwicklungspuffer 10x (Zymographie)		
	12,1 g	Tris Base
	63 g	Tris-HCl
	117 g	NaCl
	7,4 g	CaCl <sub>2</sub>
	0,2%	Brij 35
	auf 1 L	mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Kristallviolett-Lösung	1,3 g	Kristallviolett
	50 mL	Ethanol (96 %)
	300 mL	Formaldehyd (37 %)
	650 mL	ddH <sub>2</sub> O

ECL-Reagenz	Lösung 1	90 mM (0,5 mL)	p-Cumarsäure
	Lösung 2	250 mM (1 mL)	Luminol
	Lösung 3	1 M (20 mL)	Tris-HCl, pH 8,5
		auf 200 mL	H <sub>2</sub> O auffüllen
	vor Gebrauch:	3 µL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zu 10 mL Lösung geben
Proteinlysepuffer		50 mM	Tris-HCl
		2 mM	EDTA, pH 7,4
		2 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
		1/10 mL	Tablette Roche complete mini
Paraformaldehyd (PFA)		4 g	PFA in warmem ddH <sub>2</sub> O lösen
		NaOH	zugeben bis Lösung klar ist
		10 mL	10x PBS
		auf 100 mL	H <sub>2</sub> O auffüllen
		pH 7,4	
1x PBS		140 mM	NaCl
		2,7 mM	KCl
		8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O
		1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PonceauS-Färbelösung		0,5 g	PonceauS
		1 mL	Essigsäure
		auf 100 mL	H <sub>2</sub> O auffüllen
Renaturierungspuffer 10x (Zymographie)			
		25% (v/v)	Triton X-100 in H <sub>2</sub> O

10x SDS-Laufpuffer	440 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 M	Glycin
	1,5 % (w/v)	SDS
	pH 8,2	
SDS-Probenpuffer	10 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	8 mL	20% SDS
	10 mL	MilliQ H <sub>2</sub> O
	8 mL	Glycerin
	2 mL	2-Mercaptoethanol
	4 mg	Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer 2x (Zymographie)		
	2,5 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	2 mL	Glycerin
	4 mL	10% (w/v) SDS
	0,1%	Bromphenolblau
	auf 10 mL	mit H <sub>2</sub> O auffüllen
1x Towbin-Puffer	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

## 2.3 Zelllinien und –kulturmedien

### 2.3.1 Zelllinien

A549	adhärent wachsende humane alveolare Adenokarizom-Zelllinie
C33A	adhärent wachsende humane Zervixkarzinom-Zelllinie
CV1	adhärent wachsende Nierenfibroblasten aus <i>Cercopithecus aethiops</i>



DU145                      adhärent wachsende humane Prostatakarzinom-Zelllinie

PC3                         adhärent wachsende humane Prostatakarzinom-Zelllinie

Die C33A-Zelllinie wurde freundlicherweise von Frank Stubenrauch, UKT der Eberhard-Karls Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2 Zellkulturmedien

A549- und PC3-Medium: RPMI 1640, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin

C33A-Medium: DMEM 4,5 g Glucose, 10% FKS, 1% Gentamicin

CV1-Medium: DMEM 4,5 g Glucose, 10% FKS, 1% Penicillin/Strepomycin

DU145-Medium: MEM, 10% FKS, 1% Glutamax, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat, 1,5 g/L Natriumbicarbonat

## 2.4 Antikörper

Primärantikörper	Wirt/Isotyp	Spezies	Hersteller
Monoklonaler anti-CD31 (mab1398Z)	Hamster IgG	Maus	Millipore
Polyklonaler anti-Collagen I (ab292)	Kaninchen IgG	Maus	Abcam, Cambridge UK
Polyklonaler anti-Collagen IV (ab19808)	Kaninchen IgG	Maus	Abcam, Cambridge UK
Polyklonaler anti-Laminin (ab11575)	Kaninchen IgG	Maus	Abcam, Cambridge UK
Polyklonaler anti-MHC II (14-5321)	Ratte IgG2b	Maus	eBioscience
Polyklonaler anti-MMP-9 (GT15020)	Ziege IgG	Maus/ Human	Neuromics, Edina USA
Polyklonaler anti-Relaxin 1 (FL-185)	Kaninchen IgG	Human	Santa Cruz, Santa Cruz USA

ChromPure Chicken IgG (003-000-003)	Hühnchen IgG	-	Jackson ImmunoResearch (JIR), Pennsylvania USA
β-Actin (ab 6276)		Maus	Abcam, Cambridge UK

Sekundärantikörper	Wirt/Isotyp	Spezies	Hersteller
Anti-Hamster, Cy5 konjugiert (127-175-099)	Ziege IgG	Hamster	JIR, Pennsylvania USA
Anti-Kaninchen, Cy3 konjugiert (711-165-152)	Esel IgG	Kaninchen	JIR, Pennsylvania USA
Anti-Hühnchen, Cy3 konjugiert (703-165-155)	Esel IgG	Hühnchen	JIR, Pennsylvania USA
Anti-Ratte, DyLight 649 konjugiert (712-495-153)	Esel IgG	Ratte	JIR, Pennsylvania USA
Anti-Ziege, Cy3 konjugiert (705-165-003)	Esel IgG	Ziege	JIR, Pennsylvania USA
Anti-Ziege, HRP konjugiert (A8919)	Kaninchen IgG	Ziege	Sigma, Steinheim DE
Anti-Maus, HRP konjugiert (ab6728)		Ziege	Abcam, Cambridge UK

## 2.5 Rekombinante Viruskonstrukte

### 2.5.1 GLV-1h68

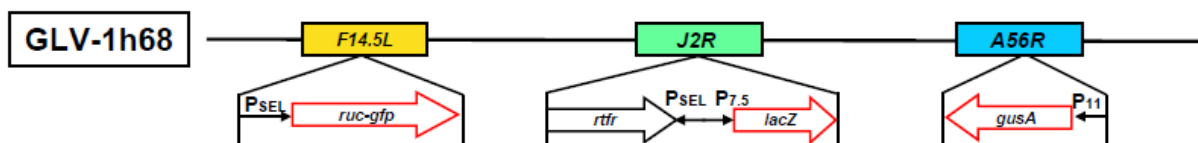


Abbildung 10. Expressionskassette von GLV-1h68.

Für diese Doktorarbeit wurde mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h68 gearbeitet (Abbildung 10). Dieses Virus basiert auf dem Vaccinia-Virus LIVP, wurde jedoch durch

zielgerichtete Mutagenese modifiziert. Im Genlocus F14.5 trägt dieses Virus ein Fusionsgen aus *Renilla* Luciferase (*RUC*) und *green fluorescent protein* (*GFP*). Dieses steht unter Kontrolle des *synthetic early/late* Promotors ( $P_{SEL}$ ). Im Thymidinkinase-Locus (J2R) befindet sich revers zum *synthetic early/late*-Promotor ( $P_{SEL}$ ) das humane Transferrin-Rezeptor-Gen (*hTfR*) sowie das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) unter dem Promotor 7.5 ( $P_{7.5}$ ). Weiterhin wurde als Markergen das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen (*gusA*) in den Hämagglutinin-Locus (A56R) inseriert. Dieses steht unter Kontrolle des viralen Promotors 11 ( $P_{11}$ ).

### 2.5.2 GLV-1h169

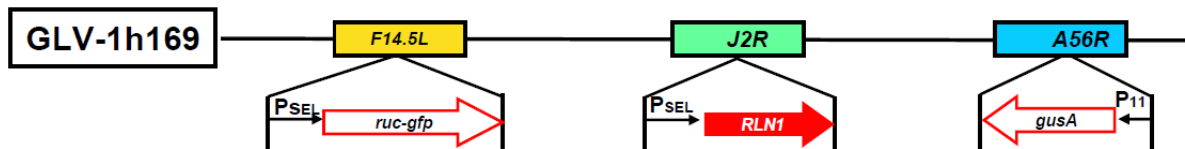


Abbildung 11. Expressionskassette von GLV-1h169.

Das humane Relaxin 1 Gen ist unter Kontrolle des *synthetic early/late*-Promotors.

Zusätzlich zu GLV-1h68 wurde weiterhin GLV-1h169 verwendet. Bei diesem Virus wurde das Gen für humanes Relaxin 1 (*hRLNI*) unter Kontrolle des *synthetic early/late*-Promotors in den Thymidinkinase-Locus inseriert.

### 2.5.3 GLV-1h255

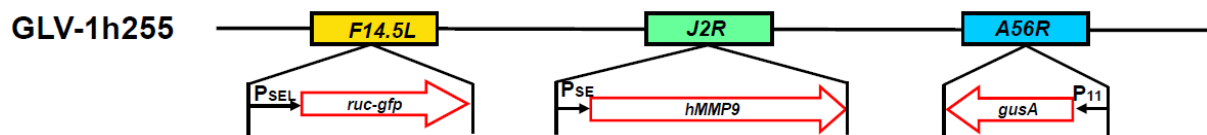


Abbildung 12. Expressionskassette von GLV-1h255.

Das humane MMP-9 Gen befindet sich unter Kontrolle des *synthetic early* Promotors.

Außerdem wurde das Virus GLV-1h255 eingesetzt. Bei diesem Virus wurde das Gen für die humane Matrix-Metalloproteinase 9 (*MMP-9*) unter Kontrolle des *synthetic early*-Promotors in den Thymidinkinase-Locus inseriert.

## 2.6 Versuchstiere

Die während dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden von der Firma Harlan (Borchen) bezogen. Es handelte sich um den Mausstamm Hsd:Athymic Nude-*Foxn1<sup>nu</sup>*. Diese athymischen Tiere haben einen haarlosen Phänotyp sowie eine T-Zell-Defizienz. Durch das supprimierte Immunsystem eignen sie sich für Xenotransplantate, die nicht abgestoßen werden.

Die Tiere wurden in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus unter abgeschwächten Lichtverhältnissen gehalten.

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

## 2.7 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Hersteller
Anästhesie-Anlage	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Deckgläser	Marienzell, Lauda-Königshofen
FastPrep FP120	Thermo Electron, Langenselbold
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filmkassette	Dr. Goos suprema, Heidelberg
Filterspitzen	Hartenstein, Würzburg
Flow-Hood LaminAir	Kendro, Langenselbold
Geldokumentation	PeqLab, Erlangen
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Glaswaren	Schott, VWR Brand
Kanülen	Braun, CH-Emmenbrücke
Keramikbead-Tubes	Peqlab, Erlangen

---

Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Maestro EX Imaging System	CRI, US-Woburn
Mini-PROTEAN Elektrophoresis System	BIO-RAD, München
Mikroskope:	
-DMIRB Inverses Mikroskop	Leica, Wetzlar
-MZ 16 FA Stereo-Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
M-tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Power-Pac Basic	BioRad, München
Reagenzgefäße: 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße:15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Röntgenfilme	Konica, München
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Semi-Dry Blotapparatur	Peqlab, Erlangen
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Schüttler	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Vibratom VT1000S	Leica, Wetzlar
Vortex	Labinco, NE-Breda
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturinkubatoren	RS Biotech, Irvine UK
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Schwerin

## 2.8 Verwendete Software

Adobe Photoshop CS4	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator CS4	Abbildungen
ImageJ 4.3u	Bildanalyse ( <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">http://rsbweb.nih.gov/ij/</a> )
Maestro CRi v2.4	Bildaufnahme und -analyse
MS Word 2007	Textverarbeitung
MS Excel 2007	Datenauswertung und Graphen
Leica IM1000 4.0	Bildaufnahme (Leica MZ16FA)

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Eukaryontenzellen

Um Kontaminationen bei der Kultivierung von adhärent wachsenden Eukaryontenzellen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeitsschritte unter einem laminaren, sterilen Luftstrom in einer Flow-Hood durchgeführt. Des Weiteren wurden ausschließlich sterilisierte Arbeitsgeräte und sterile Lösungen verwendet. Die Arbeitsflächen wurden vor den Arbeiten mit 70 % Ethanol desinfiziert. Um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination der Zellen in Kulturgefäßen zu verringern, wurden den Zellkulturmedien Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) zugesetzt.

Die Zellen wurden jeweils in optimiertem Medium bei 100 % Luftfeuchte, 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis sie eine Konfluenz von ca. 90 % erreichten. Dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Dies stellte sicher, dass alle von den Zellen benötigten Nährstoffe und Wachstumsfaktoren in ausreichendem Maße vorhanden waren. In verbrauchtem Medium verfärbt sich der pH-Indikator Phenolrot gelb. Vor dem Passagieren wurden die Zellen zunächst mit Hank's BSS gewaschen, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Danach wurde Trypsin zugegeben. Dieses Enzym ist eine Endopeptidase, durch deren Aktivität es zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes kommt. Die enzymatische Reaktion wird durch die Zugabe von Medium gestoppt, da dieses divalente Kationen (Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) enthält, welche Trypsin inhibieren. Auf- und Abpipettieren stellte sicher, dass sich die Zellen vollständig von einander lösen, anschließend wurde die Zellsuspension im entsprechenden Verhältnis in ein neues Kulturgefäß überführt und weiter kultiviert.

### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Dies ist ein Objektträger, in den ein spezielles Raster eingeätzt ist. Nach dem Auflegen eines Deckgläschens ergibt sich ein definiertes Volumen, in dem sich die Zellen befinden. Das Raster ist in vier große Quadrate aufgeteilt, die jeweils in weitere sechzehn Quadrate unterteilt sind. Es wurden die Zellen in den vier großen Quadraten gezählt und die Zellzahl/mL nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl/mL = (Summe der Zahlen aus den 4 Quadraten/4) × 10<sup>4</sup> × Verdünnungsfaktor.

### 3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

#### Einfrieren

Die Zellen wurden nach dem Erreichen von 90 % Konfluenz mit Hank's BSS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Konzentration auf 5 × 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µL eingestellt und jeweils 900 µL in Cryoröhrchen überführt. Es wurden 100 µL DMSO pro Aliquot hinzugefügt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80 °C eingefroren und abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### Auftauen

Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 10 mL Medium überführt, pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 mL neuem Medium resuspendiert und in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche kultiviert.



## 3.2 Virologische Methoden

### 3.2.1 Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay

Die Anzahl infektiöser Viruspartikel (Virustiter) in einer Suspension lässt sich mittels Plaque-Assay bestimmen. Diese Methode eignet sich zur Bestimmung des Titers von Virenaliquots, Gewebelysaten und Zellkulturproben. Dabei wurden zunächst CV-1-Zellen bis zu 100 % Konfluenz in 24 *Well* Platten kultiviert. Die zu untersuchenden Proben wurden dreimal für 30 s mit je 30 s Pause bei 4 °C und voller Intensität sonifiziert. Dadurch werden Virusaggregate aufgelöst. Im Anschluss wurden jeweils zwei Verdünnungsreihen der Proben in Infektionsmedium (DMEM, 2 % FKS, 1x Penicillin/Streptomycin) erstellt. Von den 24 *Well* Platten wurde das Medium abgesaugt und auf jeweils zwei Wells je 250 µL Probe gegeben. Nach 1 h Infektion wurden jeweils 1 mL Carboxymethylcellulose-Medium (CMC) pro *Well* hinzugegeben. Dies verhindert die Ausbreitung der Virusinfektion über das Medium, so dass sich die Viren nur noch von Zelle zu Zelle ausbreiten. Dabei kommt es zur Plaquebildung. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen durch Zugabe von Kristallviolett gefärbt, Plaques bleiben dabei ungefärbt. Der Virustiter (plaque forming units pro Milliliter, pfu/mL) wird über das Auszählen der Plaques mittels folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} = \frac{\text{Anzahl der Plaques (pfu)}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Infektionsvolumen (mL)}}$$

### 3.2.2 Infektion eukaryotischer Zellen mit Vaccinia-Viren

Für die Infektion werden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Zur Berechnung der erforderlichen Virusmenge wird die Zellzahl, der Virustiter (pfu/mL) und die *multiplicity of infection* (MOI) benötigt. Die MOI gibt die Anzahl der Viruspartikel pro Zelle an, so dass bei einer MOI von 1 auf jede Zelle ein Virus kommt, theoretisch also jede Zelle infiziert werden kann. Zur Berechnung der Virusmenge wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Virusmenge} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Virustiter} \left( \frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right)}$$

Vor der Infektion wurden die Viren für dreimal 30 s mit je 30 s Pause bei 4 °C sonifiziert, wodurch sich Virusaggregate auflösen. Vor dem Zugeben der Viren wurden die Zellen mit Hank's BSS gewaschen. Die Infektion erfolgte für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in 250 µL Infektionsmedium (2 % FKS, 1x Penicillin/Streptomycin, Volumenangabe für 24 *Well*) mit der zuvor berechneten Virusmenge. Nach dieser Zeit wurde das Infektionsmedium durch normales Medium ersetzt.

### 3.2.3 Analyse der Virusreplikation in eukaryotischen Zellen

Die Analyse der Virusreplikation der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 wurde in der Zelllinie DU145 durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 24 *Well*-Platten bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert und mit einer MOI von 0,1 infiziert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde jeweils der Überstand von drei *Wells* abgenommen und in Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden mit 1 mL Hank's BSS gewaschen und mit 0,5 mL Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit 0,5 mL Medium abgestoppt, die Zellen pelletiert, in 1 mL Hank's BSS resuspendiert und in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C. Um eine gute Freisetzung der Viruspartikel aus den Zellen zu gewährleisten, wurden drei *freeze-and-thaw* Zyklen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen jeweils im Wasserbad aufgetaut und in Stickstoff eingefroren.

Die Virustiter der einzelnen Proben wurden mittels Plaque-Assay ermittelt.

## 3.3 Mausexperimentelle Methoden

### 3.3.1 Implantation von humanen Tumorzellen

Für die *in vivo* Experimente wurden 5–6 Wochen alte athymische *Nude*-Mäuse verwendet. Die zu implantierenden Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert, mit Hank's BSS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Zellkultur-Medium abgestoppt. Von der erhaltenen Zellsuspension wurde die

Zellzahl durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in PBS resuspendiert, erneut pelletiert und im entsprechenden Volumen PBS resuspendiert. Pro Tier wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen bei C33A,  $2 \times 10^6$  im Falle von PC-3 und  $1 \times 10^7$  bei DU145 in 100  $\mu\text{L}$  PBS eingesetzt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden bei DU145 nur bei der Wachstumskurve eingesetzt, bei späteren Experimenten  $5 \times 10^6$  (es gab keine Unterschiede beim Wachstum der Tumore). Die Zellsuspension wurde subkutan in die rechte, hintere Flanke der Maus injiziert, wobei die entsprechende Stelle vor und nach dem Einstich mit Alkohol desinfiziert wurde.

Das Tumorstadium wurde in regelmäßigen Intervallen protokolliert. Dabei wurde die Tumorstadiumgröße mit einer digitalen Schieblehre gemessen. Das Tumorstadiumvolumen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorstadiumvolumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)}^2 \times 0,5$$

### **3.3.2 Intravenöse Injektion von rekombinanten Vaccinia Viren**

Die Infektion tumortragender Mäuse erfolgte bei einem Tumorstadiumvolumen von 200–300  $\text{mm}^3$  (Ausnahme: DU145-Wachstumskurve, hier erfolgte die Infektion bei einem mittleren Tumorstadiumvolumen von 500  $\text{mm}^3$ ). Dazu wurden pro Tier  $5 \times 10^6$  pfu Vaccinia Virus in 100  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert und in eine laterale Schwanzvene injiziert. Zur Erleichterung der Injektion wurden die Mäuse für 5 min mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Um Sekundärinfektionen zu verhindern wurde die Injektionsstelle vor und nach der Injektion mit Alkohol desinfiziert.

### **3.3.3 Narkose von Mäusen**

Die Narkose von Mäusen wurde unter Verwendung von Isofluran durchgeführt. Dieses wird in einem Verdampfer in die gasförmige Phase gebracht und in einer Konzentration von 1,5–3 % in die Narkosekammer geleitet. Die Inhalation dieses Anästhetikums entfaltet rasch eine Muskel relaxierende und hypnotische Wirkung. Sollen weitere Experimente

durchgeführt werden, wie z.B. bildgebende Verfahren, muss kontinuierlich weiter Isofluran zugeführt werden.

### **3.3.4 Tumor- und Organentnahme**

Zur Analyse von Tumoren und Organen wurden die Tiere zu definierten Zeitpunkten mit Hilfe von CO<sub>2</sub> getötet. Dieses Vorgehen erlaubt die intrakardiale Entnahme von Blut. Weiterhin wurden Organe und Tumore herauspräpariert und in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.3.5 Immunhistochemie**

Für die Histologie wurden die Organe oder Tumore über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die fixierten Gewebe wurden gründlich mit PBS gewaschen und in 5 % *low melt* Agarose eingebettet und in Blöcke zurechtgeschnitten. Unter Verwendung eines Vibratoms wurden 100 µm Gewebeschnitte angefertigt.

Der erste Schritt der immunhistologischen Färbung war die Permeabilisierung des Gewebes mittels 0,2 % Triton X-100 in 5 % FKS für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Durch das fötale Rinderserum werden unspezifische Bindungstellen abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 12 h bei RT in 0,2 % Triton X-100, 5 % FKS. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 10 min, wurde der Sekundärantikörper sowie Hoechst-Farbstoff in 0,2 % Triton X-100, 5 % FKS zugegeben und für 4 h bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte erneut in PBS gewaschen und in Mowiol/Dabco eingedeckelt.

### **3.3.6 Virustiterbestimmung aus Gewebeproben**

Zur Bestimmung der viralen Titer aus Tumor- und Organproben wurden die entsprechenden Organe bei Versuchsende entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80 °C gelagert. Zum Aufschluss des Gewebes wurden die Proben zunächst gewogen und dann im doppelten Volumen Puffer geschreddert. Im Falle der DU145-Tumore wurde Proteinlysepuffer verwendet, bei C33A-Tumoren Dulbecco's PBS

und bei PC3-Tumoren und Organen Dulbecco's PBS mit einer Tablette Roche complete mini pro 50 mL. Tumore und Organe wurden mit einem Skalpell in kleine Gewebstücke geschnitten und in Schredderröhrchen gegeben. Für Tumore wurden M-tubes (Miltenyi Biotec) und für Organe Keramikbead-Röhrchen (Peqlab) verwendet. Tumore wurden zweimal mit dem gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec), Programm RNA 02.01 aufgeschlossen, Organe zweimal mit dem FastPrep FP120 (Thermo Electron). Nachdem Gewebsaufschluss erfolgten drei Zyklen aus Einfrieren und Auftauen zum weiteren Aufschließen der Zellen, sowie drei Zyklen mit Ultraschall für je 30 s um Virusaggregate aufzutrennen. Die Titerbestimmung wurde mittels Plaque Assay auf CV1-Zellen durchgeführt. Grundsätzlich wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben vorgegangen. Für DU145- und C33A-Tumore wurden jeweils zwei Verdünnungsreihen von den Virusproben erstellt und beide als Duplikate ausplattiert. Für PC3-Tumore wurde jeweils eine Verdünnungsreihe erstellt und als Triplikate ausplattiert. Bei PC3-Organen wurde jeweils eine Verdünnungsreihe erstellt und als Duplikate ausplattiert. Die Virustiter wurden nach dem Plaque Assay durch Auszählen der Plaques bestimmt und als PFU/g Gewebe angegeben.

### **3.4 Bildaufnahme und -auswertung**

#### **3.4.1 Quantifizierung von Agaroseschnitten mittels Maestro-Imaging System**

Eine Möglichkeit der Quantifizierung von 100 µm Agaroseschnitten stellte die Verwendung des Maestro-Imaging (CRi) Systems dar. Dieses Gerät eignet sich zum einen für das *in vivo* Imaging von Mäusen und zum anderen zur Aufnahme fluoreszierender Proben, wie z.B. Gewebsschnitten. Die Auswertung der erhaltenen Aufnahmen (Image cubes) erfolgte mit der Maestro Software v2.4 und MS Excel 2007.

#### **3.4.2 Quantifizierung von Agaroseschnitten mittels ImageJ**

Eine weitere Möglichkeit stellte die Erstellung der Aufnahmen mit dem Leica MZ16FA mit anschließender Auswertung mittels ImageJ Software dar. Dazu wurden die erhaltenen RGB Aufnahmen zunächst in Graustufenbilder umgewandelt (Adobe Photoshop). Die

Auswertung in ImageJ konnte entweder nach mittlerer Fluoreszenzintensität (Analyse → Measure) oder nach Anzahl der als positiv gewerteten Pixel erfolgen. Dazu musste zunächst ein Schwellenwert (Image → Adjust → Threshold) definiert werden, um Signal und Hintergrund zu trennen, danach erfolgte die Auswertung (Analyse → Analyse Particles). Auf diese Weise konnte über die Hoechst-Färbung der Nuclei auch die Gesamtschnittfläche definiert werden. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit MS Excel 2007.

### **3.4.3 Auszählen der Blutgefäße und Bestimmung der Gefäßdurchmesser**

Zum Auszählen der Blutgefäße und zur Bestimmung der Gefäßdurchmesser wurden zunächst Ausschnittbilder von CD31-gefärbten 100 µm Agaroseschnitten erstellt (Leica MZ16FA). Bei C33A-Tumoren wurden die Aufnahmen mit 100x, bei PC3-Tumoren mit 200x erstellt. Dabei wurde die Belichtung so gewählt, dass Gefäße gut erkennbar waren. Zum Auszählen der Gefäße wurden mittels Photoshop gleichmäßig verteilte Linien eingezeichnet (bei C33A-Tumoren sieben Linien, bei PC3-Tumoren fünf Linien). Es wurden jeweils die Blutgefäße gezählt, die diese Linien kreuzten. Dies ergab die Anzahl der Blutgefäße pro Ausschnittbild. Die erhaltenen Daten wurden mittels MS Excel 2007 ausgewertet. Zum Bestimmen der Gefäßdurchmesser wurden dieselben Aufnahmen verwendet. Mittels Leica Software konnten die Bilder skaliert werden, d.h. z.B. die Bildbreite in die entsprechenden µm umgerechnet werden. Die Gefäßdurchmesser wurden jeweils von jenen Gefäßen, die die eingezeichneten Linie kreuzten, bestimmt. Zur Bestimmung der Gefäßdurchmesser wurde Adobe Illustrator verwendet.

## **3.5 Proteinanalytische Methoden**

### **3.5.1 Herstellung von Proteinextrakten**

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden in einer sechs Well Platte jeweils  $2 \times 10^5$  PC3-Zellen ausgesät und für vier Tage inkubiert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1 für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> infiziert (RPMI 1640, 2 % FKS, 1 % Penicil-

lin/Streptomycin). Nach dieser Zeit wurde das Infektionsmedium abgenommen und 2 mL serumfreies Medium (RPMI 1640, 1 % Penicillin/Streptomycin) auf die Zellen gegeben und für einen Tag bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Probengewinnung wurden die Zellüberstände mit 0,1 µm Sterilfiltern filtriert. Dadurch wurden Viruspartikel entfernt. Auf die Zellen wurden jeweils 100 µL SDS-Probenpuffer gegeben und in Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Vor der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE erfolgte die Probenvorbereitung. Zu den Zelllysaten wurde jeweils 1 µL Benzonase gegeben und die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Überstandsproben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt. Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte durch Erhitzen der Proben auf 95 °C für 5 min. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 15 µL Probe eingesetzt.

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Hierzu werden Gele aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid verwendet. Dabei kann die Porengröße des Gels anhand der Acrylamidkonzentration variiert werden. Für kleine bis große Proteine kann so eine optimale Auftrennung erreicht werden. Die schon oben angesprochene Denaturierung mittels Erhitzen linearisiert die Proteinmoleküle, weiterhin werden Disulfidbrücken mittels β-Mercaptoethanol reduziert. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) kann sich an die linearisierten Proteine anlagern und erlaubt deren Trennung im elektrischen Feld. Das zur Auftrennung der Proteine eingesetzte Gel hat ein weitporiges Sammelgel, in dem die Proteine fokussiert werden und ein engporiges Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung der Proteine stattfindet. Die Gele setzten sich wie in Tabelle 2 angegeben zusammen.

Die denaturierten Proteinproben wurden in Taschen des Gels geladen und bei 110 V aufgetrennt.

Tabelle 2. Zusammensetzung der SDS-Gele.

Reagenz	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
Wasser	4,1 mL	3,05 mL
Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 mL	0,65 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	1,25 mL
10 % SDS	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
10 % APS	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

### 3.5.3 Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)

Für die weiterführende Analyse der Proteine müssen diese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Dabei wurde das sogenannte Semi-Dry-Blot-Verfahren verwendet. Dabei werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld auf die Membran transferiert und dort aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen dauerhaft gebunden. Für den Transfer wurden zunächst drei Lagen Whatman-Papier mit Towbin-Puffer getränkt und auf die Anode im Boden der Blotting-Kammer gelegt. Darauf folgten die ebenfalls mit Towbin-Puffer benetzte Nitrozellulose-Membran, das SDS-Gel und abschließend drei weitere Lagen in Towbin-Puffer getränkte Whatman-Papiere. Der Deckel der Blotting-Kammer enthält die Kathode. Der Proteintransfer wurde für 2 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran durchführt.

### 3.5.4 PonceauS Färbung

Um den Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran zu überprüfen, wurden die Proteine für drei Minuten mit PonceauS-Lösung gefärbt. Der Farbstoff bindet reversibel an die Amino-gruppen der Proteine. Nach dem Entfärben der Membran mit Wasser sind die Proteinbanden zu erkennen.



### 3.5.5 Immundetektion von Proteinen mittels ECL-Methode

Diese Methode erlaubt die Detektion spezifischer Proteine unter Verwendung der entsprechenden Antikörper. Dazu wurden unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran durch die Inkubation mit 5 % Milchpulverlösung blockiert (1 h, RT, Schüttler). Dadurch wurde das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis verbessert. Anschließend wurden die Primärantikörper ( $\beta$ -Actin 1:10.000 und MMP-9 1:1.000 in PBS-T) zugegeben und inkubiert (über Nacht, 4 °C, Schüttler). Der ungebundene Primärantikörper wurde durch Waschschrte mit PBS-T (3x 5min) entfernt. Als Sekundärantikörper (anti-Maus-HRP 1:2.000 und anti-Ziege-HRP 1:5.000 in PBS-T) wurden jeweils Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugierte Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1h bei RT auf einem Schüttler. Überschüssige Antikörper wurden durch abschließende Waschschrte entfernt (3x 5min). Für die Detektion wurde ECL-Lösung eingesetzt (1min Inkubation). Die Peroxidase oxidiert dabei unter alkalischen Bedingungen Luminol zu 5-Aminophthalsäure. Das entstehende Lumineszenz-Signal kann durch Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert werden. Die Belichtungszeiten waren 30 s für MMP-9 und 1 s für  $\beta$ -Actin.

### 3.5.6 Gelatine-Zymographie

Bei der Gelatine-Zymographie (nach Millipore-Protokoll) handelt es sich um eine Methode zum Nachweis enzymatischer Aktivität proteolytischer Enzyme, wie z.B. Matrixmetalloproteinasen. Zunächst wurden  $5 \times 10^4$  A549 Zellen in einer 12 Well-Platte ausgesät und für einen Tag inkubiert. Die Infektion erfolge mit einer MOI von 0,1 für eine Stunde (Infektionsmedium RPMI 1640, 2 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin). Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt (ebenfalls Infektionsmedium) und die Zellen für 1 d inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Für die Probenvorbereitung wurden die Überstände sterilfiltriert (0,1  $\mu$ m Filter) und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ L SDS-Probenpuffer (für Zymographie) lysiert und ebenfalls in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Zur Probenvorbereitung wurden zu den Zelllysaten jeweils 0,5  $\mu$ L Benzonase gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für

die Gelbeladung wurden je Probe 20  $\mu$ L eingesetzt. Die Überstände wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer (für Zymographie) gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Für die Gelbeladung wurden je Probe 20  $\mu$ L eingesetzt. Bei den eingesetzten Gelen handelte es sich um normale 10% SDS-Gele, die jedoch zusätzlich 1 mg/mL Gelatine enthielten. Die Proteinauftrennung wurde mit 25 mA/Gel durchgeführt. Nach dem Gellauf wurden die Gele in 1x Renaturierungspuffer inkubiert (30 min, RT, Schüttler). Nach der Renaturierung der Proteine wurden die Gele mit Zymographie-Entwicklerpuffer für 30 min bei RT äquilibriert. Anschließend wurde neuer Zymographie-Entwicklerpuffer zugegeben und die Gele bei 37 °C für 1 d inkubiert. Die Proteine wurden für 30 min gefärbt (Coomassie Brilliant Blue 0,5 % (w/v)) und mit Entfärbelösung entfärbt (Methanol:Eisessig:Wasser 50:10:40). Die Entfärbung wurde solange durchgeführt, bis in den Bereichen enzymatischer Aktivität klare Banden erkennbar waren.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den therapeutischen Effekt von GLV-1h68 zu verbessern. Dies soll über eine verstärkte Ausbreitung der Viruspartikel im Tumorgewebe angestrebt werden. Es konnte in vorangehenden Studien bereits gezeigt werden, dass die extrazelluläre Matrix die Ausbreitung von Adenoviren behindert<sup>48,49</sup>. Durch die Injektion der Viren GLV-1h169 bzw. GLV-1h255 in Tumor-tragende Mäuse sollte es zur Virus-vermittelten Expression von Relaxin 1 bzw. MMP-9 im Tumorgewebe kommen. Durch eine Relaxin-induzierte Expression von MMP-9 bzw. durch eine direkte Überexpression dieses Proteins können Komponenten der EZM, wie z.B. Collagen IV proteolytisch abgebaut werden. In dieser Arbeit wird der Einfluss der Virus-vermittelten Überexpression von Relaxin 1 und MMP-9 auf Komponenten der EZM, die Virus-Ausbreitung, die Vaskulatur im Tumorgewebe sowie die Metastasierung und die Tumorregression untersucht.

### 4.1 Charakterisierung des onkolytischen rVACV GLV-1h169 (Relaxin 1)

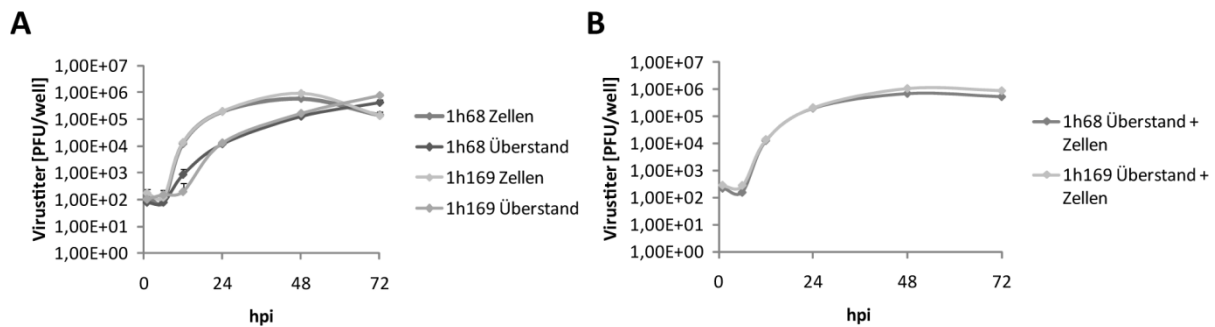
#### 4.1.1 Einsatz von DU145-Tumoren zur Analyse der Tumorregression und der Virus-Ausbreitung unter Verwendung der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169

##### 4.1.1.1 Analyse des *in vitro* Replikationsverhaltens von GLV-1h68 und GLV-1h169

Für den Vergleich der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 *in vivo* ist es wichtig vorab zu klären, ob sie sich in ihrem Replikationsverhalten unterscheiden. Um zu ermitteln, ob die Insertion des humanen Relaxin 1 Gens in den TK-Lokus dieses beeinflusst, wurde ein *in vitro* Replikationsassay der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 mit DU145-Zellen durchgeführt. Dabei zeigten beide Viren ein nahezu identisches Replikationsverhalten (Abbildung 13).

Grundsätzlich war zu beobachten, dass bis ca. 50 hpi der Virustiter in den Zellen höher lag als im Überstand. Zu diesem Zeitpunkt waren nahezu alle Zellen infiziert. Im weiteren

Verlauf kam es zum Absterben der Zellen, wobei die Zelladhärenz weitestgehend verloren ging. Die bei der Lyse freiwerdenden Viruspartikel waren im Überstand nachweisbar.



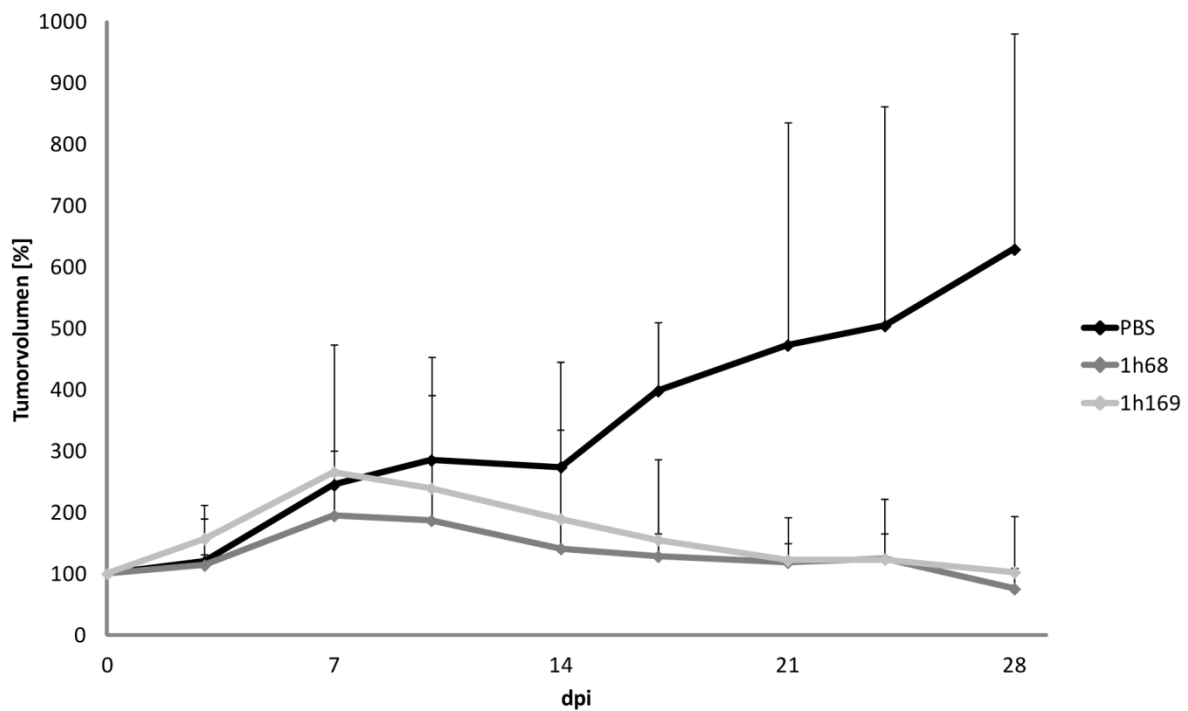
**Abbildung 13.** *In vitro* Replikations-Assay mit GLV-1h68 und GLV-1h169 in DU145-Zellen.

DU145-Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit den Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 infiziert. 1, 6, 12, 24, 48, 72 Stunden nach Infektion (hpi) wurden Zelllysate sowie Überstände gewonnen. Die Titerbestimmung wurde mittels Plaque Assay durchgeführt. (A) Zeitlicher Verlauf der Virusreplikation getrennt für Zellen und Überstände beider Viren. (B) Darstellung der Gesamt-Titer für Zellen plus Überstände.

In diesem Replikationsassay konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von GLV-1h169 gegenüber GLV-1h68 durch die Insertion des Relaxin 1-Gens in den TK-Locus keinen Einfluss auf die virale Replikation hat.

#### 4.1.1.2 Einfluss der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von DU145-Xenograft-Tumoren

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens von DU145-Tumoren in athymischen Nacktmäusen wurde den Tieren PBS bzw. rVACV GLV-1h68 oder GLV-1h169 injiziert. Die Größe der Tumore nach der Virus- bzw. PBS-Injektion wurde alle 3-4 Tage bis zum Versuchsende aufgezeichnet und als prozentuales Wachstum über die Zeit dargestellt. Abbildung 14 zeigt, dass es in der Anfangsphase des Versuchs eine leichte Volumenzunahme bei Tumoren von GLV-1h169-injizierten Mäusen gab. Gegen Ende des Versuchs kam es jedoch zu einer Annäherung zwischen den Volumina der Tumore aus GLV-1h68- und jenen aus GLV-1h169-injizierten Mäusen. Bei Versuchsende waren die durchschnittlichen Volumina von Tumoren aus GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-injizierten Mäusen auf dem Niveau des Versuchsbeginns, während es bei Tumoren aus PBS-injizierten Mäusen zu einer deutlichen Zunahme der durchschnittlichen Volumina kam.



**Abbildung 14. Wachstum von DU145-Xenograft-Tumoren in athymischen Nacktmäusen.**

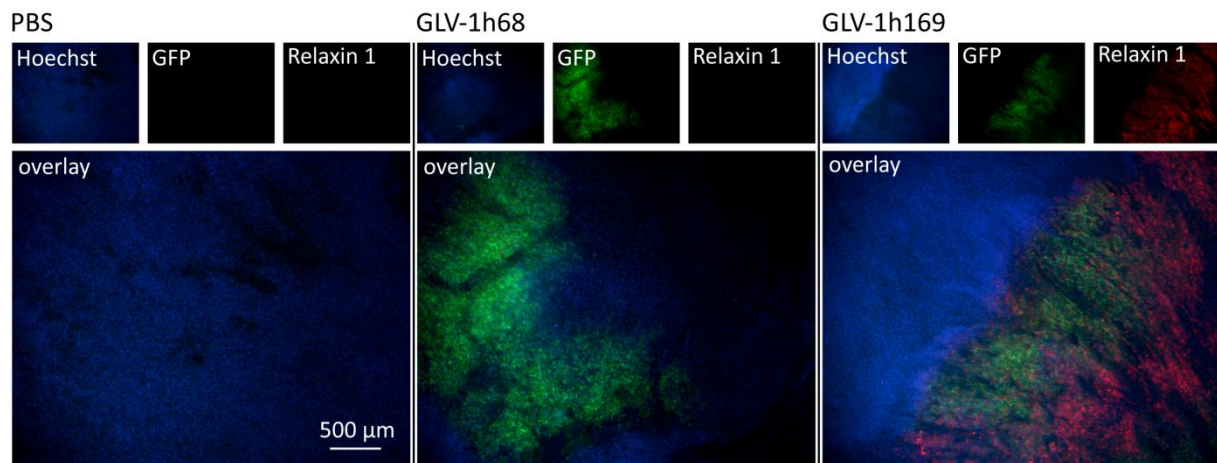
$1 \times 10^7$  DU145-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von athymischen Foxn1<sup>nu</sup>-Nacktmäusen implantiert. Bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumolvolumens von  $500 \text{ mm}^3$  wurden den Tieren  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. Die durchschnittlichen Tumolvolumina zum Zeitpunkt 0 dpi wurden gleich 100 % gesetzt. Pro Gruppe wurden vier Tiere verwendet. Der Versuch wurde 28 dpi beendet.

Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass beide Virusstämme das Tumorstadium signifikant reduzierten und zur Regression der Tumormasse führten. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden rVACV-Stämmen detektiert werden.

#### 4.1.1.3 Nachweis von viral exprimiertem Relaxin 1 in Tumorproben

Um zu ermitteln, ob es zu einer spezifischen Expression von viral codiertem Relaxin 1 in GLV-1h169-infizierten Bereichen von DU145-Tumoren kam, wurden immunhistochemische Färbungen von Relaxin 1 in DU145-Tumorschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden 7 dpi hergestellt. Infizierte Bereiche konnten anhand der Expression des viralen Markergens GFP identifiziert werden.

Die Expression von Relaxin 1 kolokalisierte mit GFP-positiven GLV-1h169-infizierten Tumorbereichen und war weder in GLV-1h68 infizierten noch in uninfizierten Kontrolltumoren nachweisbar (Abbildung 15).

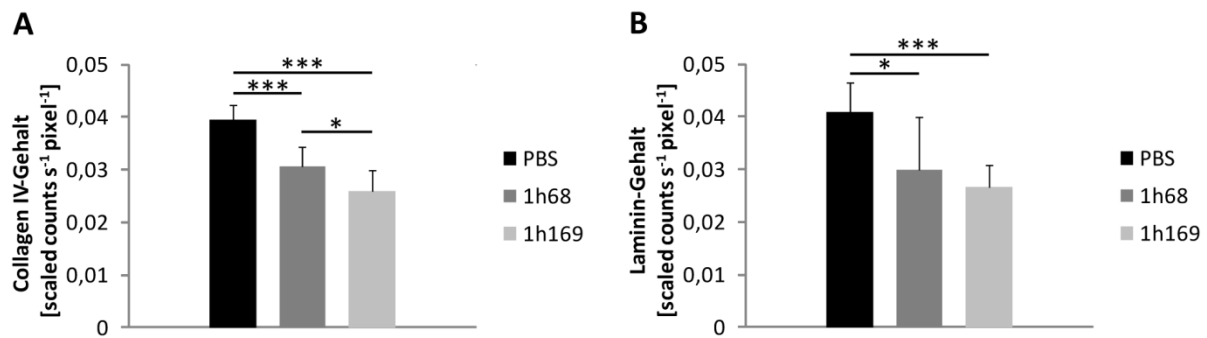


**Abbildung 15. Expression von GLV-1h169 codiertem Relaxin 1 in DU145-Tumoren.**

Immunhistochemische Färbung von viral codiertem Relaxin 1 in 100 µm Agaroseschnitten aus DU145-Tumoren 7 dpi. Die Darstellung zeigt die Expression des viralen Markerproteins GFP (grün) sowie die mittels Hoechst-Färbung visualisierten Nuclei (blau). Relaxin 1 (rot) wurde mittels einem polyklonalen Relaxin 1 Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz) und einem Cy3-konjugiertem anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

#### **4.1.1.4 Analyse der rVACV-vermittelten Veränderungen der extrazellulären Matrix und der viralen Ausbreitung in DU145-Tumorgewebe**

Es wurde untersucht, ob es durch die Infektion mit den Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 zu Veränderungen des Gehalts von EZM-Proteinen in DU145-Tumoren kommt. Zu diesem Zweck wurden Tumorschnitte zum Zeitpunkt 7 dpi erstellt und auf ihren Collagen IV- und Laminin Gehalt hin untersucht. Durch Relaxin wird eine Induktion der MMP-9-Expression erwartet. Sowohl Collagen IV als auch Laminin sind Substrate dieser Metalloproteinase. Collagen IV ist u.a. in der Basalmembran von Blutgefäßen zu finden, Laminin ist ebenfalls eine Komponente von Basalmembranen. Der Collagen IV-Gehalt (Abbildung 16 A) war in GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten signifikant niedriger als in uninfizierten Tumorschnitten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Relaxin 1 den Collagen IV-Gehalt in GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten signifikant im Vergleich zu GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten erniedrigte. Der Laminin-Gehalt (Abbildung 16 B) war in GLV-1h68- und in GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten vergleichbar, jedoch signifikant niedriger als jener in uninfizierten Tumorschnitten.



**Abbildung 16. Quantifizierung des Collagen IV- und Laminin-Gehalts in DU145-Tumoren zum Zeitpunkt 7 dpi.**

Zur Quantifizierung des Collagen IV- (A) und des Laminin-Gehalts (B) wurden jeweils zwei nicht aufeinander folgende 100 µm Agarose-Tumorschnitte aus vier Tieren pro Gruppe verwendet. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und der Maestro-Software ausgewertet. Die Daten wurden für Zeit (s) und Fläche (pixel) normiert. Die Signifikanz wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Um zu untersuchen, ob diese Veränderungen der EZM einen Einfluss auf die virale Ausbreitung haben, wurde zum einen die GFP-Expression in DU145-Tumorschnitten untersucht (Abbildung 17) und zum anderen der Virustiter aus GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumoren bestimmt (Abbildung 18).

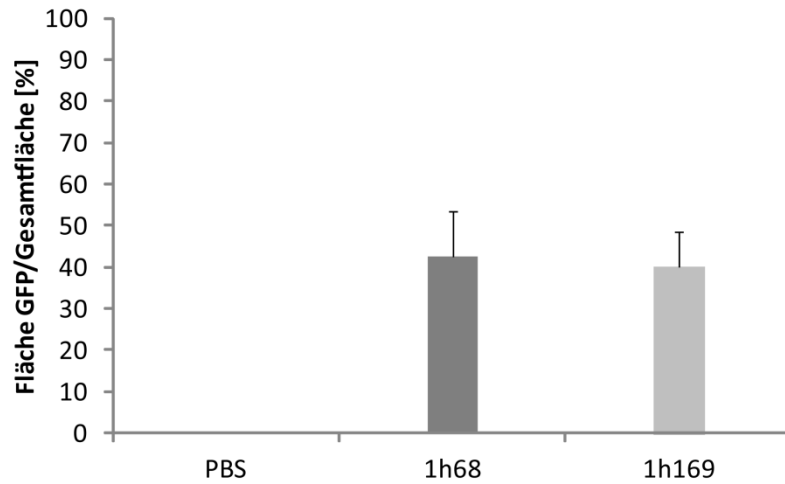
Bei der Analyse der viralen Ausbreitung mittels Imaging der GFP-Expression in Tumorschnitten konnte zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Mittels Plaque Assay wurden weiterhin die Virustiter (PFU/g Gewebe) von DU145-Tumoren zu den Zeitpunkten 7, 21 und 28 dpi ermittelt. Es ist zu beobachten, dass die Virustiter zum Ende des Versuchs im Vergleich zu 7 dpi absanken. Zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumoren gab es aber keine auffälligen Unterschiede.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass es zum Zeitpunkt 7 dpi ein statistisch signifikant geringeren Collagen IV- und Laminin-Gehalt in GLV-1h68- und in GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten im Vergleich zu uninfizierten Tumorschnitten gab. Dieser beeinflusste die virale Ausbreitung jedoch nicht.

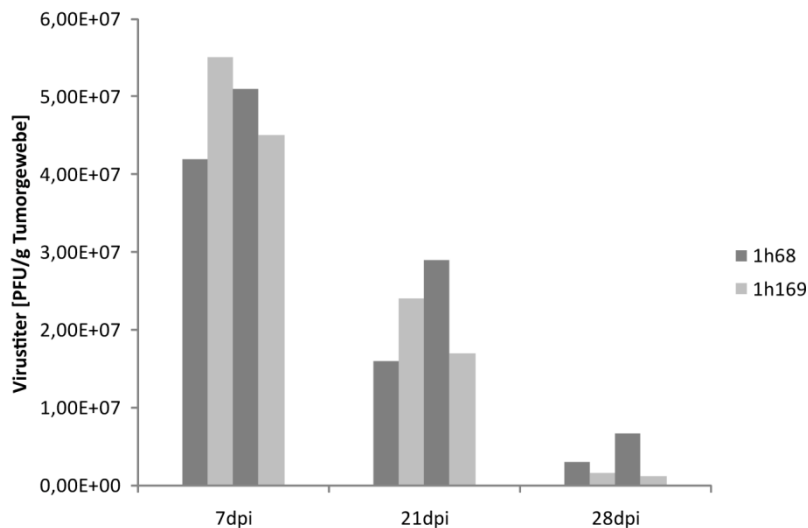
Bei der Analyse der onkolytischen Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 in DU145-Tumoren wurden keine Unterschiede bei der *in vitro* Replikation und der Tumorregression festgestellt. Weiterhin konnte eine spezifische Expression von Relaxin 1 in GLV-1h169-infizierten Bereichen gezeigt werden. Ein statistisch signifikant geringerer Collagen IV- und Laminin-Gehalt in GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten im Ver-

gleich zu uninfizierten Tumorschnitten zeigte keinen Einfluss auf die virale Ausbreitung und die Virustiter in den untersuchten Tumoren.



**Abbildung 17. Quantifizierung der GFP-Expression in DU145-Tumorschnitten.**

Für die GFP-Quantifizierung in DU145-Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi wurden jeweils zwei nicht aufeinander folgende 100 µm Agarose-Tumorschnitte aus vier Tieren pro Gruppe verwendet. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und mit der Maestro-Software ausgewertet. Es wurde jeweils die Fläche der GFP-Expression und die Tumorschnittgesamtfläche ermittelt und zur Berechnung des Prozentwerts verwendet.



**Abbildung 18. Bestimmung der Virustiter aus DU145-Tumoren.**

Die Virustiterbestimmung (PFU/g Tumorgewebe) aus DU145-Tumoren erfolgte zu den Zeitpunkten 7, 21 und 28 dpi. Pro Zeitpunkt wurden jeweils zwei Tiere verwendet. Als Puffer für die Herstellung der Tumorschnitte wurde 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid sowie eine Proteinase-Inhibitortablette (Roche complete mini) pro 10 mL eingesetzt. Beim Plaque Assay wurden pro Probe zwei Verdünnungsreihen und pro Verdünnungsreihe Duplikate eingesetzt.

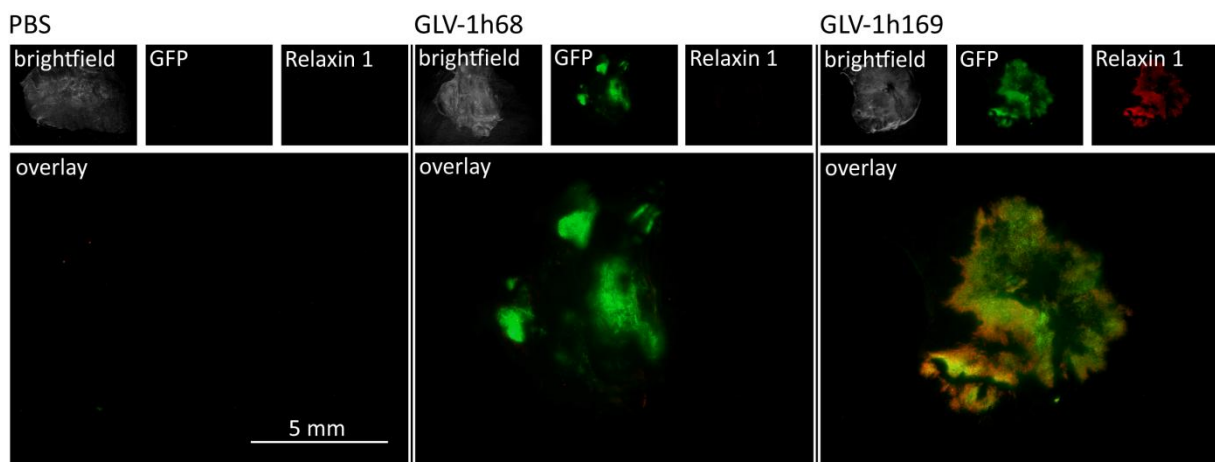


#### 4.1.2 Verwendung von PC3-Tumor-tragenden Mäusen zur Analyse des Einflusses der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf die Metastasierung in renalen und lumbalen Lymphknoten

##### 4.1.2.1 Nachweis von viral exprimiertem Relaxin in Tumorproben

Um zu ermitteln, ob es zu einer spezifischen Expression von viral codiertem Relaxin 1 in GLV-1h169-infizierten Bereichen in PC3-Tumoren kam, wurden immunhistochemische Färbungen von Relaxin 1 in PC3-Tumorschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden 38 dpi hergestellt. Infizierte Bereiche konnten anhand der Expression des viralen Markergens GFP identifiziert werden.

Die Expression von Relaxin 1 kolokalisierte mit GFP-positiven GLV-1h169-infizierten Tumorbereichen und war weder in GLV-1h68-infizierten noch in uninfizierten Kontrolltumoren nachweisbar (Abbildung 19).



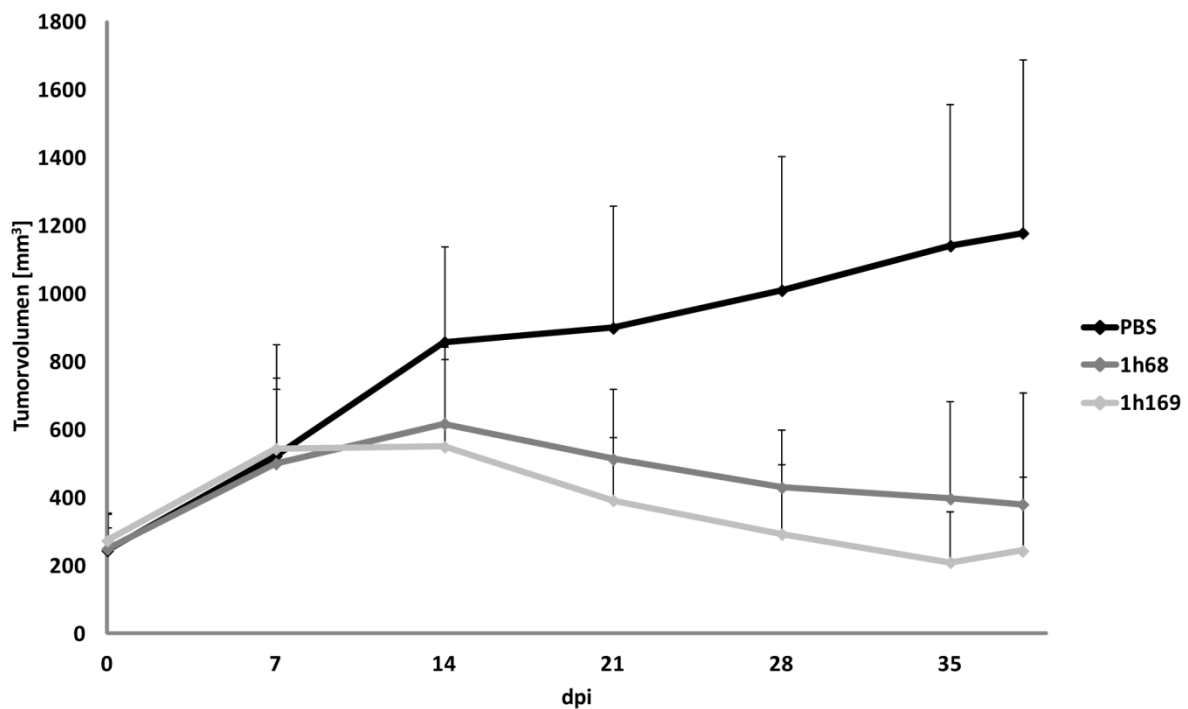
**Abbildung 19. Expression von GLV-1h169-codiertem Relaxin 1 in PC3-Tumoren.**

Immunhistochemische Färbung von viral codiertem Relaxin 1 in 100 µm Agaroseschnitten aus PC3-Tumoren 38 dpi. Die Darstellung zeigt die Expression des viralen Markerproteins GFP sowie Hellfeldaufnahmen der Schnitte. Relaxin 1 wurde mittels eines polyklonalen Relaxin 1 Kaninchen-Antiköpers (Santa Cruz) und eines Cy3-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

##### 4.1.2.2 Einfluss der Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens von PC3-Tumoren in athymischen Nacktmäusen wurden die Tiere mit PBS bzw. den onkolytischen Viren GLV-1h68 oder GLV-1h169 injiziert. Die Größe der Tumore nach der Virus- bzw. PBS-Injektion wurde wöchentlich bis zum Versuchsende aufgezeichnet. In Abbildung 20 ist das durchschnittliche Tumorvo-

lumen über die Zeit aufgetragen. Das Volumen von Tumoren aus GLV-1h169-injizierten Mäusen regredierte tendenziell stärker als jenes von Tumoren aus GLV-1h68-injizierten Mäusen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Bei Tumoren aus PBS-injizierten Mäusen kam es bis zu Versuchsende zu einem ungehinderten Tumorwachstum.



**Abbildung 20. Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren in athymischen Nacktmäusen.**

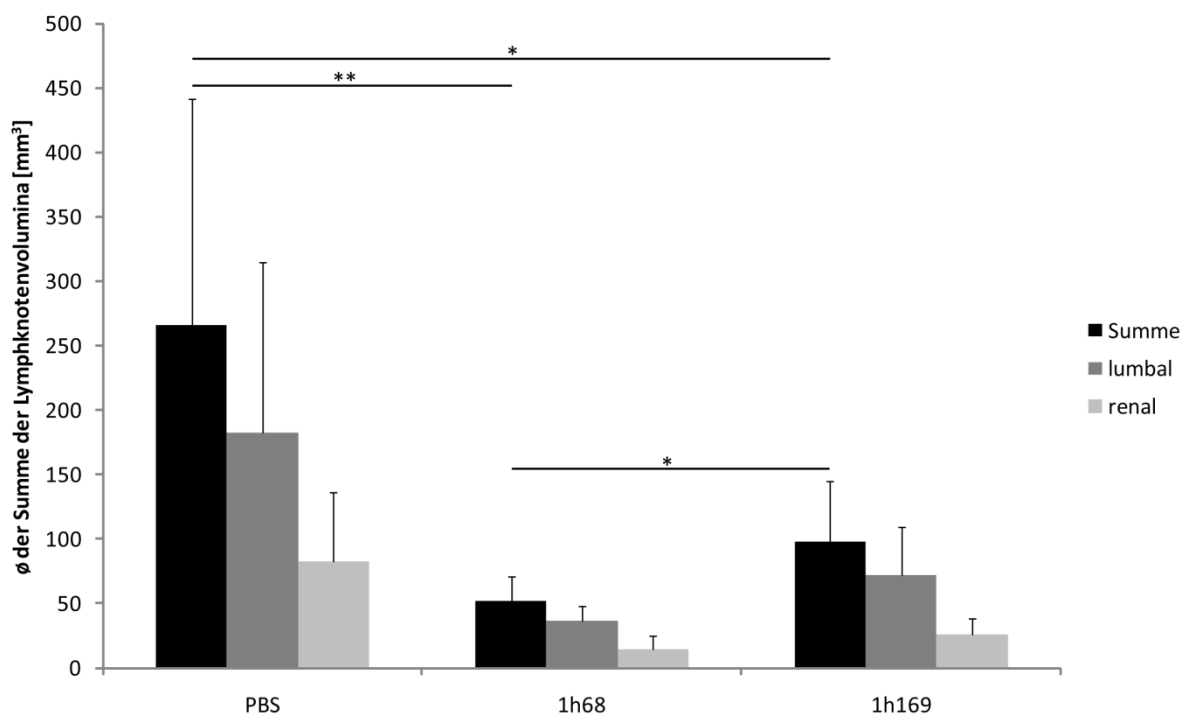
$2 \times 10^6$  PC3-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von athymischen Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmäusen implantiert. Bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumolvolumens von  $250 \text{ mm}^3$  wurde den Tieren  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. In der GLV-1h169-Gruppe wurden 10 Tiere verwendet, in der PBS- und GLV-1h68-Gruppe jeweils 14 Tiere, der Versuch wurde 38 dpi beendet.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Tumorregression zwischen den Volumina von PC3-Tumoren aus GLV-1h68- und GLV-1h169-injizierten Mäusen festgestellt werden.

#### 4.1.2.3 Analyse des Einflusses von GLV-1h68 und GLV-1h169 auf lumbale und renale Lymphknoten-Metastasen

U. Donat konnte bereits zeigen<sup>174</sup>, dass es in athymischen Nacktmäusen nach Implantation eines PC3-Xenograft-Tumors im weiteren Verlauf zu einer Besiedelung der renalen und lumbalen Lymphknoten durch Tumorzellen kommt. Durch das weitere Wachstum dieser Zellen kommt es zu einer Vergrößerung dieser Lymphknoten und letztendlich zur Aus-

bildung von Metastasen. Wurde diesen Mäusen GLV-1h68 injiziert, kommt es wie bei den Primärtumoren zu einem therapeutischen Effekt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Expression von Relaxin 1 die Metastasierung in PC3-Tumor-tragenden Mäusen beeinflusst. Nach Relaxin-Expression ist eine Induktion der MMP-9-Expression zu erwarten. Der MMP-9-medierte enzymatische Abbau von EZM-Komponenten könnte eine Herauslösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor erleichtern und damit die Metastasierung begünstigen. In Abbildung 21 ist das Volumen jeweils für lumbale und renale Lymphknoten sowie die Summe beider dargestellt.

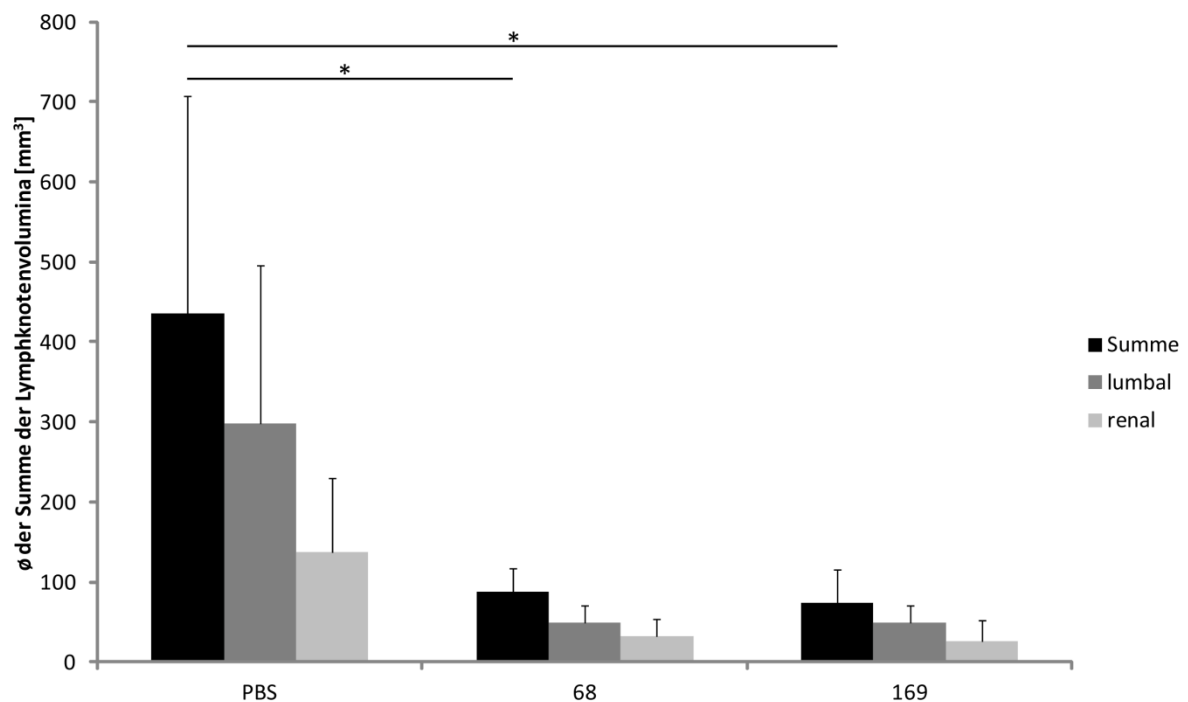


**Abbildung 21. Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.**

Zur Bestimmung der Volumina renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen 57 Tage nach Implantation und 38 dpi wurden  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen implantiert und bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumolvolumens von  $250 \text{ mm}^3$  mit  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Bestimmung der Lymphknotengröße erfolgte nach der Formel: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,5. Es wurden sieben GLV-1h169 injizierte Tiere, sowie zehn PBS- bzw. GLV-1h68-injizierte Tieren verwendet. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001.

Die Lymphknoten der GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-injizierten Tiere sind signifikant kleiner als jene von PBS-injizierten Tieren, jedoch in GLV-1h169-injizierten Tieren signifikant größer als in GLV-1h68-injizierten Tieren.

Um die Reproduzierbarkeit dieses Unterschieds zu überprüfen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.**

Zur Bestimmung der Volumina renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen 53 Tage nach Implantation und 35 dpi wurden  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen implantiert und bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumolvolumens von  $250 \text{ mm}^3$  mit  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Bestimmung der Lymphknotengröße erfolgte nach der Formel: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,5. Es wurden vier GLV-1h68 injizierte Tiere, sowie sechs PBS- bzw. GLV-1h169-injizierte Tieren verwendet. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet. *p*-Werte: \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001.

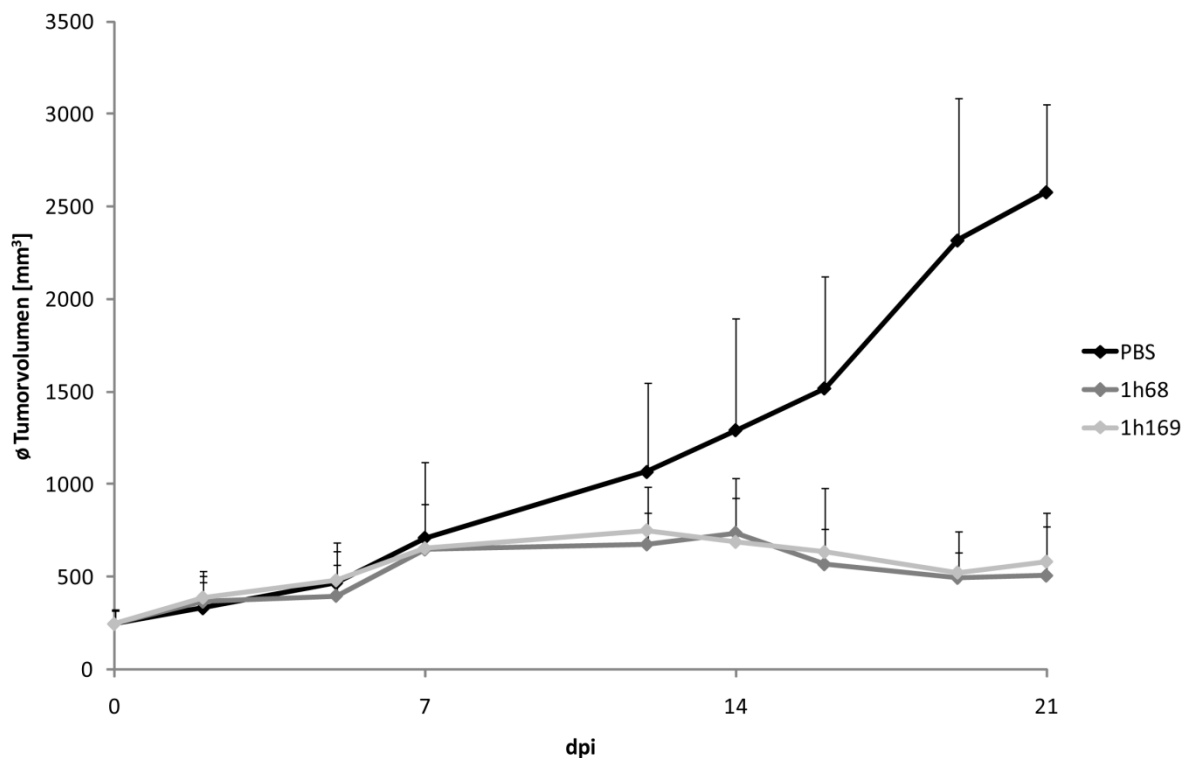
Bei diesem Experiment wurde wiederum eine signifikant geringere Lymphknotengröße bei GLV-1h68- und GLV-1h169-injizierten Tieren als bei PBS-injizierten festgestellt. Zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169-injizierten Tieren wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Wie bereits in DU145-Tumoren konnte auch im PC3-Tumoren eine spezifische Expression von Relaxin 1 in GLV-1h169-infizierten Bereichen gezeigt werden. Beide Viren zeigten einen vergleichbaren therapeutischen Effekt. Weiterhin konnten in GLV-1h68- und in GLV-1h169-injizierten Tieren gegenüber PBS-injizierten Tieren renal und lumbale Lymphknoten von signifikant geringerer Größe nachgewiesen werden.

### 4.1.3 Einsatz von C33A-Tumor-tragenden Mäusen zur Analyse der Tumorregression und viralen Ausbreitung von GLV-1h68 und GLV-1h169

#### 4.1.3.1 Einfluss von GLV-1h68 und GLV-1h169 auf das Wachstum von C33A-Xenograft-Tumoren

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von C33A-Tumoren in athymischen Nacktmäusen wurden diese mit PBS, bzw. den rVACV GLV-1h68 oder GLV-1h169 injiziert. Während des Versuchs wurden die Tumorumfänge gemessen. Abbildung 23 zeigt die durchschnittlichen Tumorumfänge über die Zeit.



**Abbildung 23. Wachstum von C33A-Xenograft-Tumoren in athymischen Nacktmäusen.**

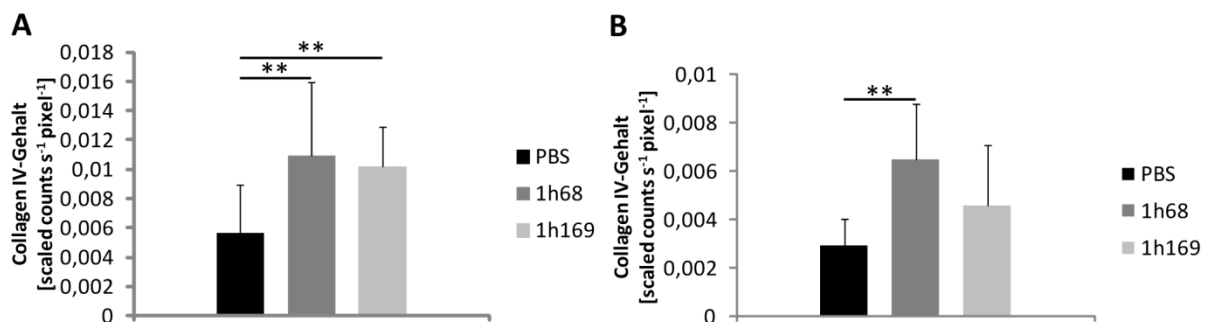
$5 \times 10^6$  C33A-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von athymischen Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmäusen implantiert. Bei Erreichen eines Tumorumfanges von  $250 \text{ mm}^3$  wurden den Tieren  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. In der GLV-1h169-Gruppe wurden fünf Tiere verwendet, in der PBS- und GLV-1h68-Gruppe jeweils vier Tiere, der Versuch wurde 21 dpi beendet.

Bei den Tumoren von GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-injizierten Mäusen kam es zu einer deutlichen Regression, während die Volumina von Tumoren aus PBS-injizierten Mäusen zugenommen haben.

#### 4.1.3.2 Quantifizierung von Komponenten der extrazellulären Matrix und der MMP-9-Expression in GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 infizierten C33A-Tumoren

Es wurde untersucht, ob es durch die Infektion mit den Viren GLV-1h68 und GLV-1h169 zu Veränderungen des Gehalts von EZM-Proteinen in C33A-Tumoren kommt. Zu diesem Zweck wurden Tumorschnitte zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi erstellt und auf ihren Collagen IV-Gehalt hin untersucht. Durch die Relaxin-Expression wird eine Induktion der MMP-9-Expression erwartet. Collagen IV ist ein Substrat dieser Metalloproteinase und ist u.a. in der Basalmembran von Blutgefäßen zu finden.

Zum Zeitpunkt 7 dpi wurde ein signifikant höherer Collagen IV-Gehalt in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten als in uninanzierten Tumorschnitten ermittelt (Abbildung 24 A). Bei 14 dpi wurde in GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten ein signifikant höherer Collagen IV-Gehalt als in uninanzierten Tumorschnitten gefunden (Abbildung 24 B).

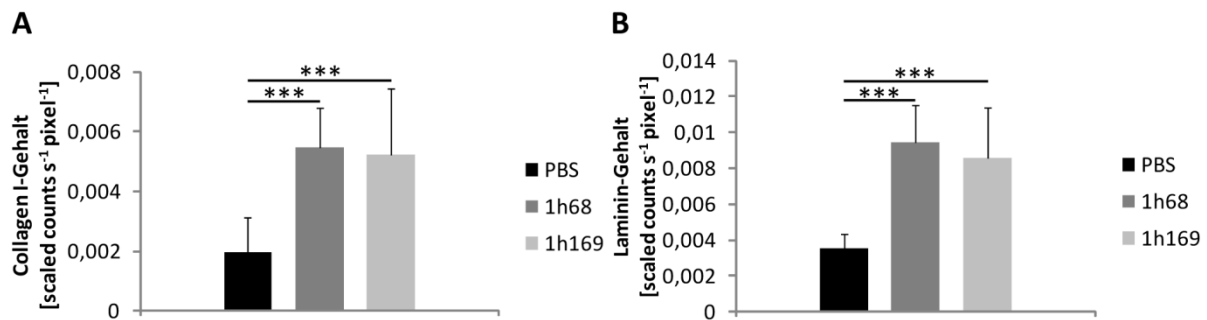


**Abbildung 24. Quantifizierung des Collagen IV-Gehalts in C33A-Tumoren.**

Es wurden jeweils drei nicht aufeinander folgende 100 µm Agarose-Tumorschnitte aus vier Tumoren pro Gruppe verwendet. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und der Maestro-Software ausgewertet. Die Daten wurden für Zeit (s) und Fläche (pixel) normiert. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001. Die Quantifizierung des Collagen IV-Gehalts in DU145 Tumorschnitten wurde zu den Zeitpunkten 7 (A) und 14 dpi (B) durchgeführt.

Als weitere Komponenten der EZM wurden Collagen I und Laminin untersucht. Collagen I ist das am häufigsten vorkommende Collagen und kein Substrat von MMP-9. Laminin ist eine Komponente der Basalmembran und kann durch MMP-9 gespalten werden. Für Collagen I und Laminin wurde ein signifikant erhöhter Gehalt in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten gegenüber uninanzierten Tumorschnitten gefunden

(Abbildung 25). Da Collagen IV und Laminin Substrate von MMP-9 sind wurde dessen Expression zum Zeitpunkt 14 dpi untersucht.

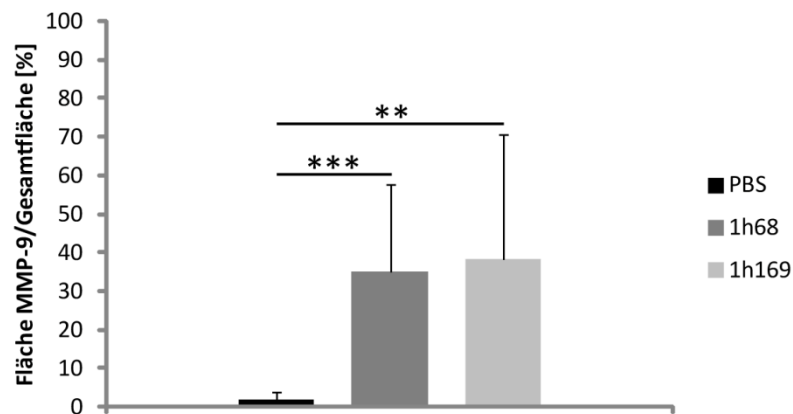


**Abbildung 25. Quantifizierung des Collagen I- und Laminin-Gehalts in C33A-Tumoren.**

Es wurden jeweils drei nicht aufeinander folgende 100 µm Agarose-Tumorschnitte aus vier Tieren pro Gruppe verwendet. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und der Maestro-Software ausgewertet. Die Daten wurden für Zeit (s) und Fläche (pixel) normiert. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, \*\*\* *p* < 0,001. Die Quantifizierung des Collagen I- (A) und Laminin-Gehalts (B) in DU145-Tumorschnitten wurde zum Zeitpunkt 14 dpi durchgeführt.

Abbildung 26 zeigt, dass es in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten zu einer signifikanten Erhöhung der MMP-9 Expression gegenüber uninfizierten Tumorschnitten kam. Im Zuge der viral-bedingten Inflammation kommt es zu einer Erhöhung der MMP-9 Expression. Durch die Expression von viral codiertem Relaxin kam es jedoch nicht zu der erwarteten weiteren Erhöhung, bedingt durch eine Relaxin-induzierte Expression von MMP-9.

Zusammenfassend konnte bei der Analyse des Collagen I-, IV- und Laminin-Gehalts in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten eine signifikante Erhöhung gegenüber uninfizierten Tumorschnitten ermittelt werden. Ebenso war die MMP-9 Expression in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten signifikant höher als in der uninfizierten Tumorschnitten. Zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169- infizierten Tumorschnitten zeigten sich keine Unterschiede im Expressionslevel von MMP-9 und dem Gehalt der EZM-Proteine.



**Abbildung 26. Quantifizierung der MMP-9-Expression in C33A-Tumoren, 14 dpi.**

Es wurden drei nicht aufeinander folgende 100  $\mu\text{m}$  Agaroseschnitte pro Tumor aus jeweils vier Tieren pro Gruppe verwendet und mit einem polyklonalen Ziege Anti-MMP-9 Antikörper (Neuromics) und einem Cy5-konjugiertem Anti-Ziege (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. 10x Aufnahmen (Leica MZ16FA) der Schnitte wurden mittels der Software ImageJ ausgewertet. Dazu wurde jeweils die Gesamtschnittfläche mittels Hoechst-Signal und die Fläche des MMP-9 Signals überhalb des Schwellenwertes (ImageJ Threshold 9/255) bestimmt und daraus der Prozentwert (Fläche MMP-9/Gesamtfläche) berechnet. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

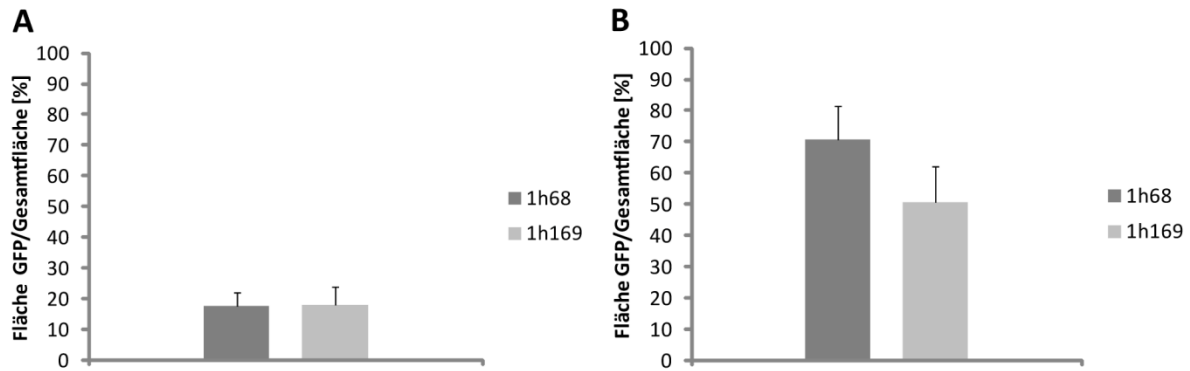
#### 4.1.3.3 Analyse der viralen Ausbreitung und der Virustiter in C33A-Tumoren

Die Expression des viralen Markerproteins GFP erlaubt es, infizierte und nicht-infizierte Bereiche in Tumoren zu unterscheiden. Für die Untersuchung der viralen Ausbreitung zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi in C33A-Tumoren wurde daher eine Quantifizierung der GFP-Expression durchgeführt. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede in der GFP-Expression zwischen GLV-1h68- und der GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten festgestellt werden (Abbildung 27).

Zusätzlich wurden die Virustiter (PFU/g Gewebe) von GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten C33A-Tumoren zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi bestimmt. Zwischen den Virustitern der GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumoren konnten zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 28).

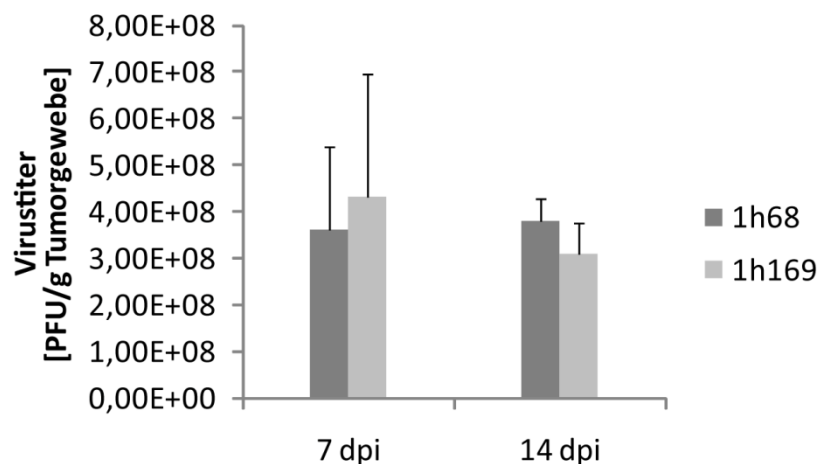
Sowohl bei der viralen Ausbreitung, als auch bei den Virustitern gab es zu den Zeitpunkten 7 und 14 dpi zwischen GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumoren keine signifikanten Unterschiede.





**Abbildung 27. Quantifizierung der GFP-Expression in C33A-Tumoren.**

Es wurden jeweils drei nicht aufeinander folgende 100 µm Agarose-Tumorschnitte aus drei Tieren pro Gruppe verwendet. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und mit der Maestro-Software ausgewertet. Es wurde jeweils die Fläche der GFP-Expression und die Tumorschnittgesamtfläche ermittelt und zur Berechnung des Prozentwerts (Fläche GFP/Gesamtfläche) verwendet. Die Quantifizierung der GFP-Expression in C33A Tumoren wurde zu den Zeitpunkten 7 dpi (A) und 14 dpi (B) durchgeführt.



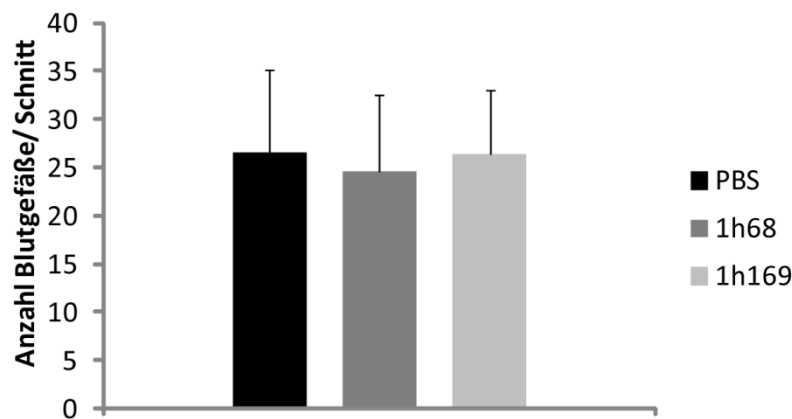
**Abbildung 28. Bestimmung der Virustiter aus C33A-Tumoren.**

Es wurden Lysate von GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumoren in PBS hergestellt. Mittels Plaque Assay wurden die Virustiter (PFU/g Tumorgewebe) der jeweiligen Proben ermittelt. Pro Gruppe wurden jeweils vier Tiere verwendet. Die Titerbestimmung wurde 7 und 14 dpi durchgeführt.

#### 4.1.3.4 Bestimmung der Blutgefäßdichte und -permeabilität in C33A-Tumoren

Um zu ermitteln, ob die Virus-mediierte Expression von Relaxin 1 einen Einfluss auf die Angiogenese hat, wurde die Blutgefäßdichte in C33A-Tumoren bestimmt. Es wird erwartet, dass es durch die Relaxin-Expression zu einer Induktion der VEGF- und MMP-9-Expression kommt. Durch den MMP-9 vermittelten Abbau von Matrixkomponenten kann ebenfalls VEGF freigesetzt werden. Abbildung 29 zeigt die Mittelwerte der Blutge-

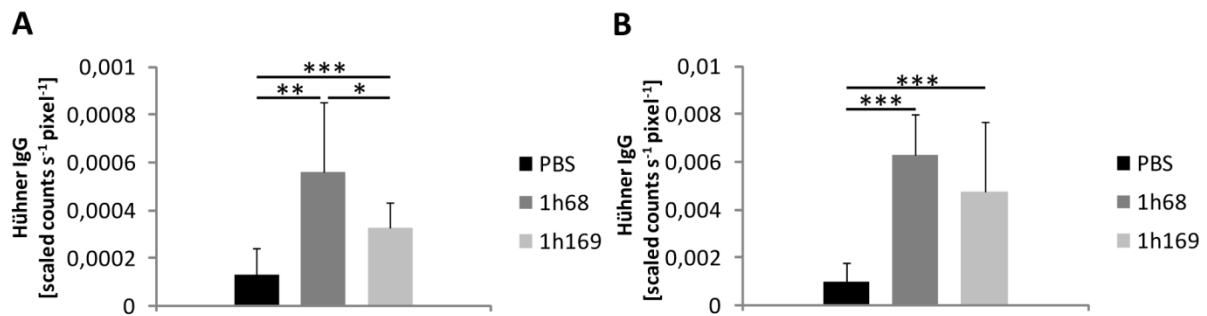
fäße pro Tumorschnitt aller Gruppen, zwischen denen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Weiterhin wurde die Permeabilität der Blutgefäße mittels der Extravasation von Hühner IgG untersucht, da die Basalmembran von Blutgefäßen Collagen IV enthält und dieses ein Substrat von MMP-9 ist. Zum Zeitpunkt 7 dpi war die Extravasation von IgG in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169- infizierten Tumorschnitten höher als in uninfizierten Tumorschnitten, aber zugleich in GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten signifikant niedriger als in GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten (Abbildung 30 A). Bei 14 dpi war die Extravasation in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169- infizierten Tumorschnitten signifikant gegenüber uninfizierten Tumorschnitten erhöht (Abbildung 30 B).



**Abbildung 29. Bestimmung der Blutgefäßdichte in C33A-Tumoren, 7 dpi.**

Zum Ermitteln der Blutgefäßdichte wurden jeweils drei nicht aufeinander folgende Schnitte aus drei Tumoren pro Gruppe verwendet. Von jedem Schnitt wurden drei Bilder in 100x Vergrößerung (Leica MZ16FA) erstellt. Es wurden jene Gefäße gezählt, die sieben in gleichem Abstand zueinander eingezeichnete Linien kreuzten. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels eines monoklonalen Hamster-CD31-Antikörpers (Millipore) und eines DyLight 649-konjugiertem anti-Hamster-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch).

Die Experimente zeigten keine Unterschiede der Blutgefäßdichte, allerdings zeigte sich eine signifikante erhöhte Permeabilität der Blutgefäße in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten gegenüber uninfizierten Tumorschnitten.

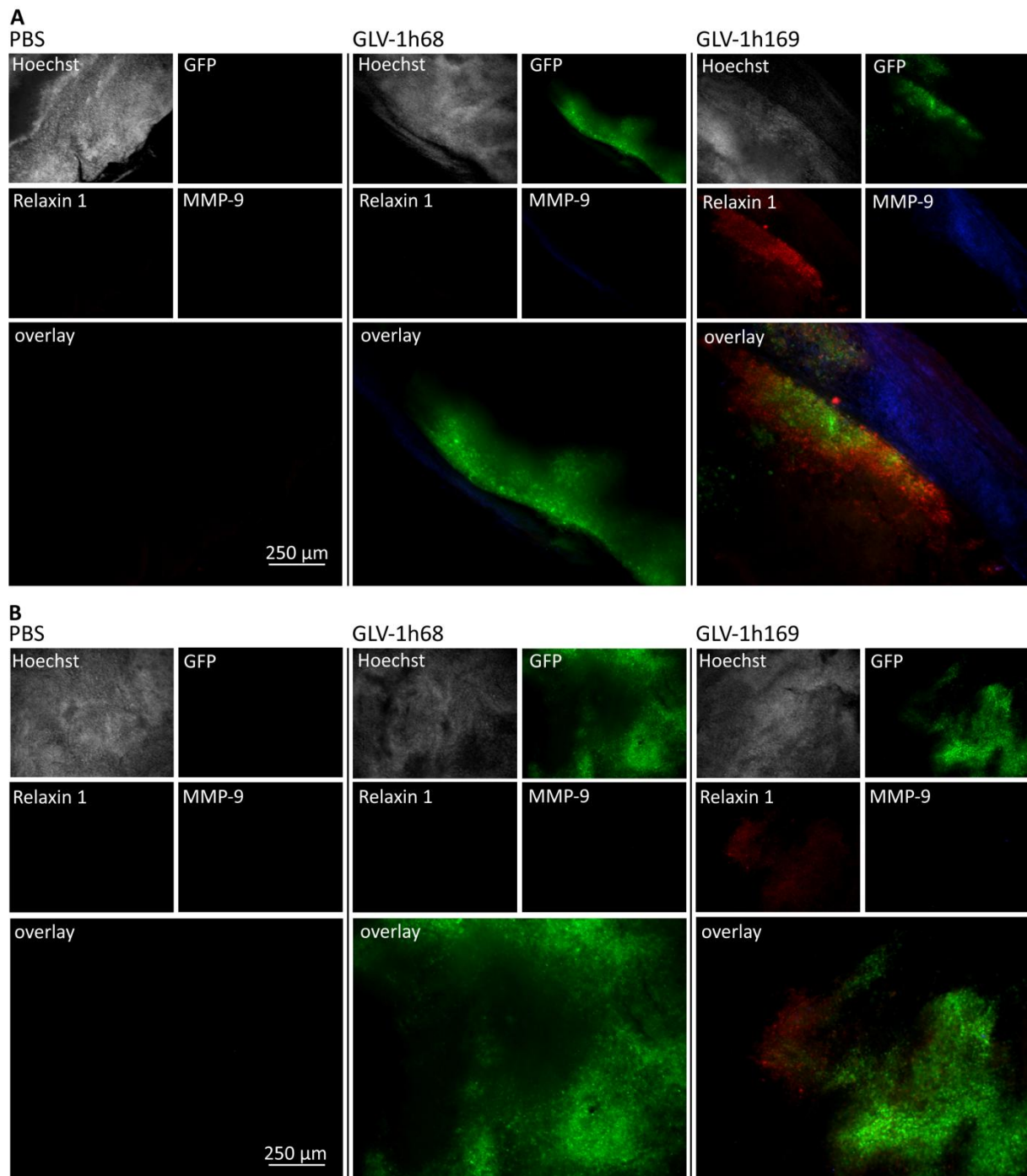


**Abbildung 30. Extravasation von Hühner IgG in C33A-Tumoren.**

Zur Analyse der Extravasation wurden sechs Stunden vor dem Töten der Tiere je 0,18 mg Hühner IgG in 100 µL PBS i.v. injiziert. Es wurden drei nicht aufeinander folgende Schnitte pro Tumor aus jeweils vier Tieren pro Gruppe verwendet und mit einem Cy3-konjugiertem Anti-Hühner-Antikörper gefärbt. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Maestro-Imaging System erstellt und mit der Maestro-Software ausgewertet. Die Daten wurden für Zeit (s) und Fläche (pixel) normiert. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Extravasation wurde zu den Zeitpunkten 7 (A) und 14 dpi (B) untersucht.

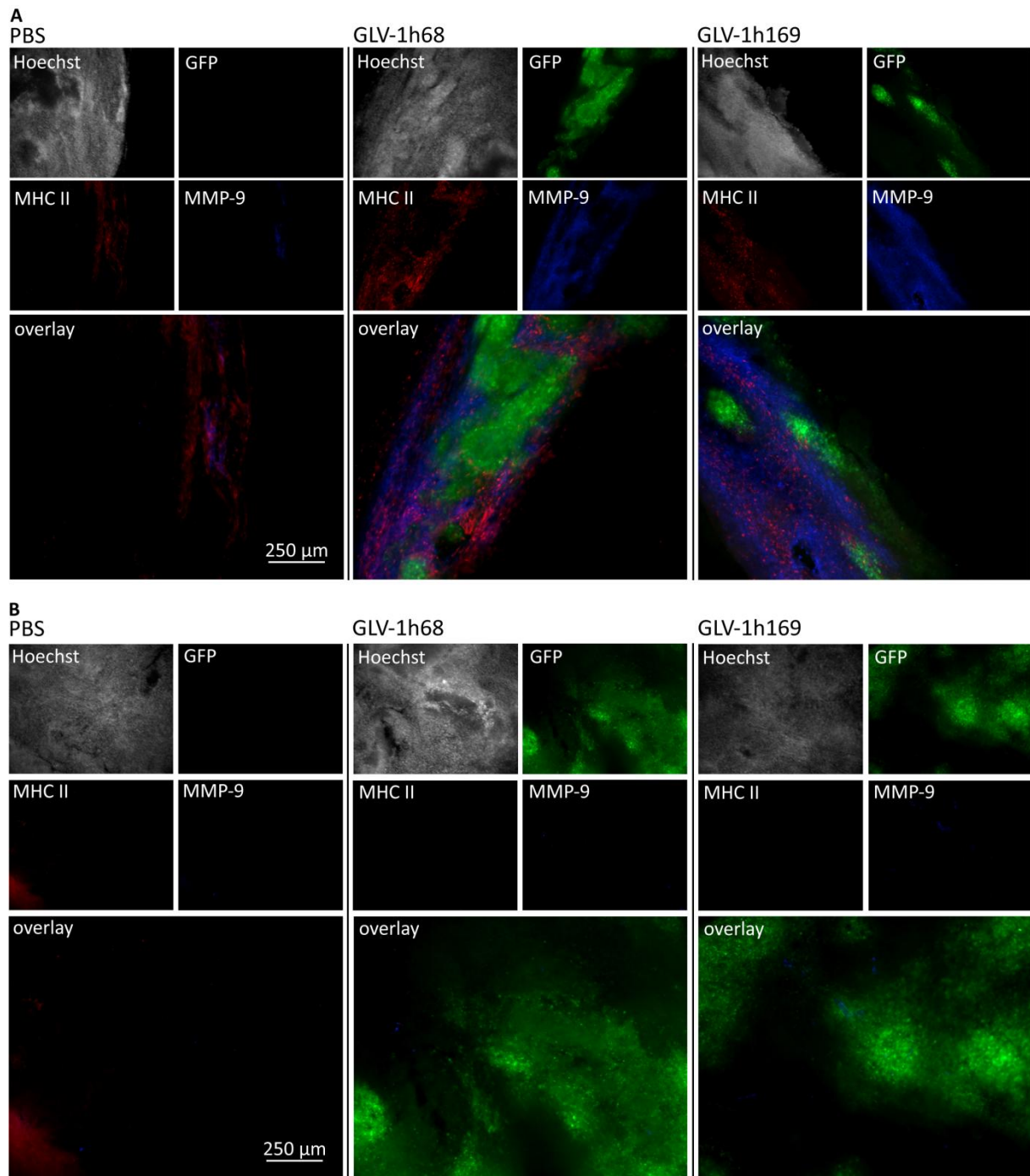
#### 4.1.3.5 Expression von Relaxin 1, MMP-9 und MHC II in Randbereichen und inneren Bereichen von C33A-Tumoren

Wie bereits in DU145- und PC3-Tumoren konnte auch in C33A-Tumoren gezeigt werden, dass Relaxin 1 spezifisch in GLV-1h169-infizierten Bereichen exprimiert wird (Abbildung 31). In C33A-Tumorschnitten wurden aber noch zusätzlich Färbungen für MMP-9 und MHC II durchgeführt (Abbildung 31, Abbildung 32). MHC II wird von B-Zellen, Monocyten, Macrophagen und dendritischen Zellen produziert. Diese Zellen sind für die Expression von MMPs, wie z.B. MMP-9 von Bedeutung. In Abbildung 31 sind Randbereiche und innere Bereiche von Tumoren dargestellt. In beiden Bereichen wird in GLV-1h169-infizierten Zonen Relaxin 1 exprimiert, während eine Expression von MMP-9 nur in den Tumorrandbereichen festgestellt werden konnte, dies jedoch in allen Gruppen, wobei in GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten ein ausgeprägteres Signal gefunden wurde. In Abbildung 32 wird eine Doppelfärbung von MMP-9 und MHC II gezeigt. In diesem Fall konnte eine deutliche Überlappung zwischen der MMP-9-Expression und MHC II-positiven Zellen in den Tumorrandbereichen nachgewiesen werden, während im inneren Bereich nur vereinzelte MMP-9-exprimierende bzw. MHC II-positive Zellen gefunden wurden.



**Abbildung 31. Expression von Relaxin 1 und MMP-9 in C33A-Tumoren.**

Expression von Relaxin 1 und MMP-9 in Randbereichen (A) und inneren Bereichen (B) von C33A-Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi. Für die immunohistochemischen Färbungen wurden 100  $\mu$ m Agaroseschnitte verwendet. Relaxin 1 (rot) wurde mit einem polyklonalen Kaninchen Relaxin 1-Antikörper (Santa Cruz) und einem Cy3-konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson ImmunoResearch), MMP-9 (blau) mit einem polyklonalen Ziege MMP-9 Antikörper (Neuromics) und einem Cy5-konjugiertem anti-Ziege-Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Nuclei (weiß) wurden mittels Hoechst-Färbung visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.



**Abbildung 32. Expression von MHC II und MMP-9 in C33A-Tumoren.**

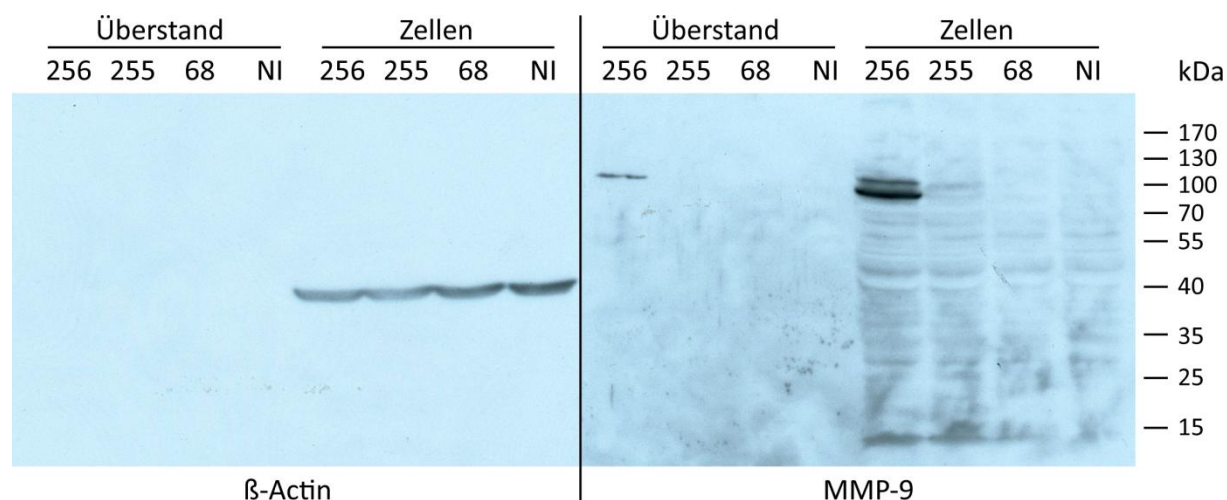
Expression von MHC II und MMP-9 in Randbereichen (A) und inneren Bereichen (B) von C33A-Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 100  $\mu\text{m}$  Agaroseschnitte verwendet. MHC II (rot) wurde mit einem polyklonalen Ratte MHC II-Antikörper (eBioscience) und einem Cy3-konjugiertem anti-Ratte-Antikörper (Jackson ImmunoResearch), MMP-9 (blau) mit einem polyklonalen Ziege MMP-9 Antikörper (Neuromics) und einem Cy5-konjugierten anti-Ziege-Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Nuclei (weiß) wurden mittels Hoechst-Färbung visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

In C33A-Tumoren zeigten GLV-1h68 und GLV-1h169 einen vergleichbaren therapeutischen Effekt. Bei der Analyse des Collagen I-, IV- und Laminin Gehalts zeigte sich eine signifikante Erhöhung in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten gegenüber uninfizierten Tumorschnitten. Ebenso zeigte das Expressionslevel von MMP-9 eine signifikante Erhöhung in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten gegenüber uninfizierten Tumorschnitten. In der viralen Ausbreitung und den Virustitern zeigten sich zu den untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede, ebenso in der Blutgefäßdichte. Die Extravasation von Hühner IgG war jedoch in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumorschnitten signifikant höher als in uninfizierten Tumorschnitten. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine spezifische Relaxin 1-Expression in GLV-1h169-infizierten Bereichen, sowie eine Korrelation zwischen der MMP-9-Expression und MHC II-positiven Zellen in Tumorrandbereichen.

## 4.2 Charakterisierung von GLV-1h255 in PC3-Tumor-tragenden Mäusen

### 4.2.1 Expression von viral codiertem MMP-9 in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten PC3-Zellen

Die Expression von MMP-9 in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten PC3-Zellen wurde *in vitro* mittels Western Blot überprüft. Bei GLV-1h255 befindet sich das humane MMP-9 Gen unter Kontrolle des synthetischen *early* Promotors, bei GLV-1h256 unter der des synthetischen *late* Promotors. Beide Promotoren unterscheiden sich in ihrer Expressionsstärke, weshalb beim *late* Promotor eine höhere Proteinmenge als beim *early* Promotor zu erwarten ist. Da MMP-9 ein sezerniertes Protein ist, wurden sowohl Zelllysate als auch Überstandspuren untersucht. Das Protein hat eine molekulare Masse von 92 kDa. Zur Kontrolle der Gelbeladung wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Abbildung 33 zeigt, dass im Western Blot MMP-9 in Lysaten von GLV-1h255- bzw. GLV-1h256-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde konnte eine geringe Menge MMP-9 Protein im Überstand von GLV-1h256 infizierten Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 33. MMP-9 Expression in virusinfizierten PC3-Zellen.**

Western Blot für MMP-9 und  $\beta$ -Actin. PC3-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit den Viren GLV-1h68, GLV-1h255 und GLV-1h256 infiziert. Die Zellysate und Überstände wurden nach 1 d Inkubation in serumfreiem Medium gewonnen. Für die SDS-PAGE wurde ein 10%iges SDS-Gel verwendet. Die Überstände wurden sterilfiltriert, um Viruspartikel zu entfernen. NI: nicht infizierte Kontrolle. MMP-9 ist ein Protein von 92 kDa,  $\beta$ -Actin hat eine molekulare Masse von 42 kDa.

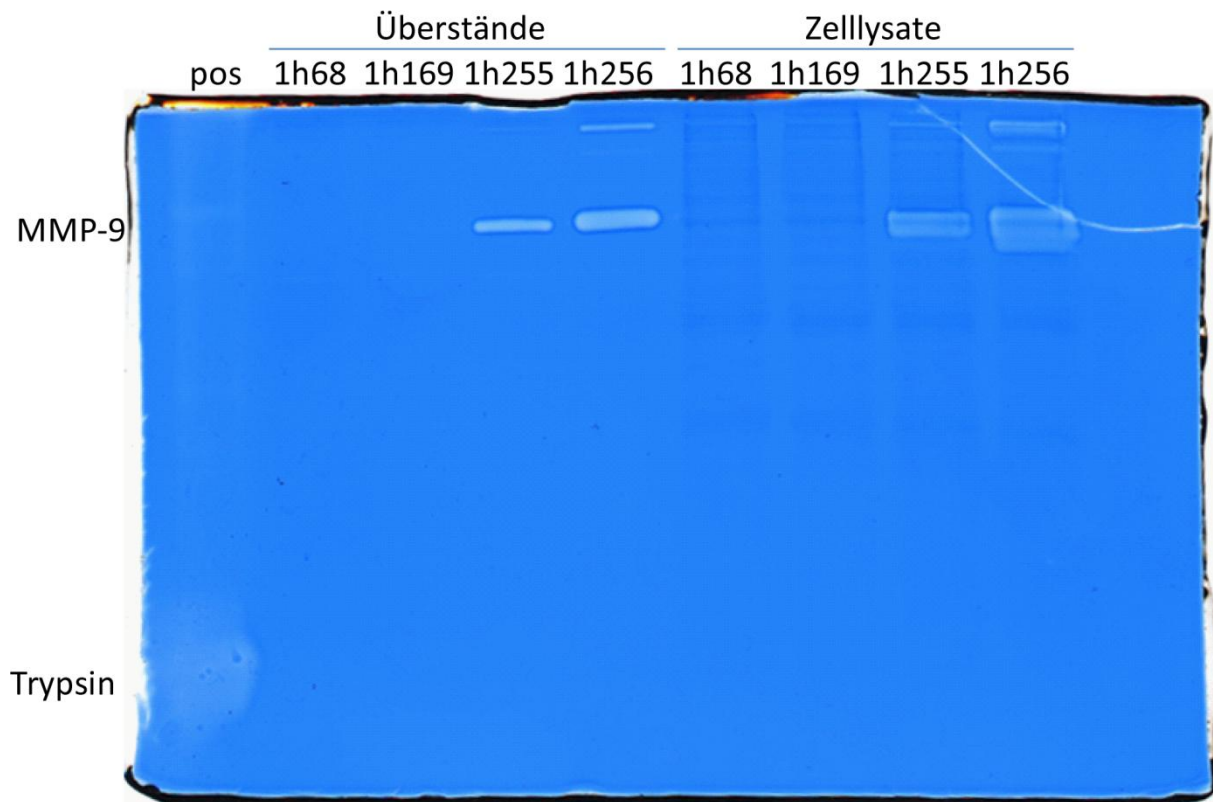
#### 4.2.2 Nachweis der enzymatischen Aktivität von MMP-9 in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten A549-Zellen und deren Überständen

Zusätzlich zur Proteinexpression in Virus-infizierten PC3-Zellen konnte die enzymatische Aktivität von viral überexprimiertem MMP-9 mittels Gelatine-Zymographie gezeigt werden. Bei diesem Experiment wurden A549-Zellen verwendet, da diese für die Proteinüberexpression nach rVACV-Infektion besonders geeignet sind.

In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass es nur bei den Proben der beiden MMP-9-Viren und bei der Positivkontrolle Trypsin zu einer enzymatischen Spaltung des Gelatins kam. Weiterhin wurde eine Zymographie mit PC3-Proben durchgeführt (nicht gezeigt), dabei konnten, neben den spezifischen MMP-9 Banden weitere Banden durch den proteolytischen Abbau der Gelatine gefunden werden, die jedoch in sowohl in Proteinproben von GLV-1h256-, GLV-1h255-, GLV-1h68- bzw. nicht infizierten Zellen auftraten.

Mittels Western-Blot konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* zu einer Expression von viral codiertem MMP-9 in PC3-Zellen kommt und dass in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten A549-Zellen exprimiertes MMP-9 enzymatisch aktiv ist.





**Abbildung 34. Funktionsnachweis für MMP-9.**

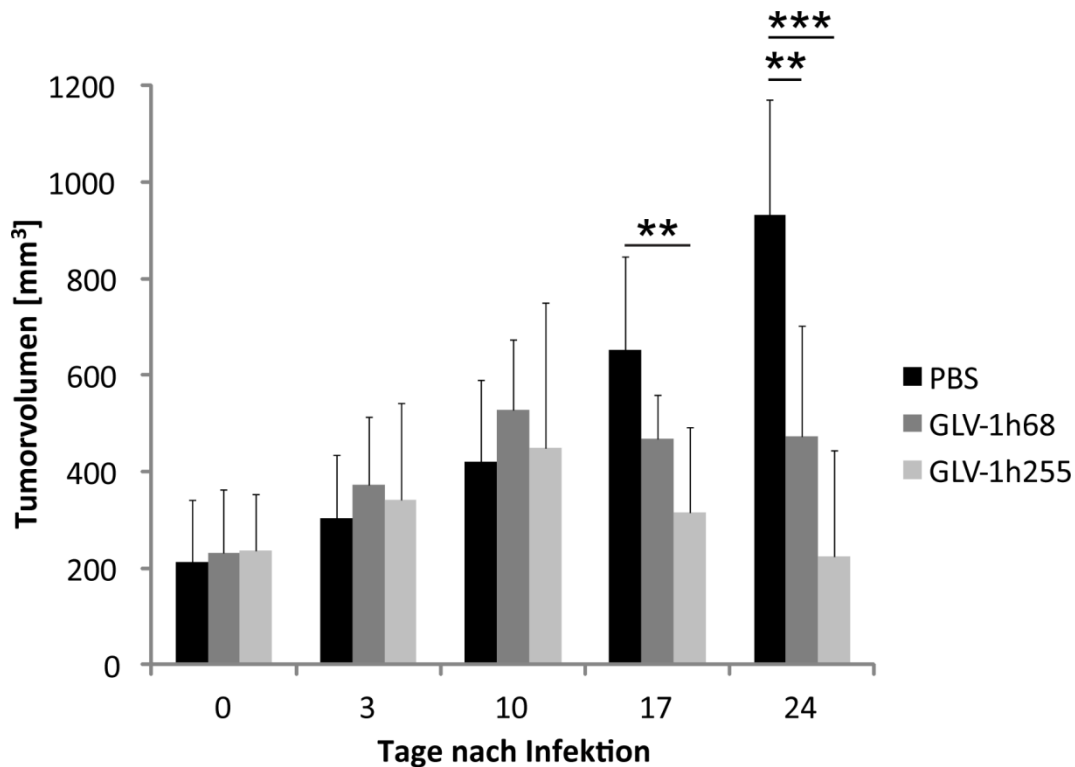
Gelatine-Zymographie mit Zelllysaten und Überständen infizierter A549-Zellen. Die Zellen wurden mit MOI 0,1 mit den Viren GLV-1h68, GLV-1h169, GLV-1h255 bzw. GLV-1h256 infiziert. Die Proteinlysate wurden nach 1 d Inkubation hergestellt und unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (10%iges SDS-Gel mit 1 mg/mL Gelatine). Pos: Positiv-Kontrolle Trypsin (PAA).

#### 4.2.3 Einfluss der onkolytischen Viren GLV-1h68 und GLV-1h255 auf das Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens von PC3-Tumoren in athymischen Nacktmäusen wurden die Tiere mit PBS bzw. den onkolytischen Viren GLV-1h68, GLV-1h255 oder GLV-1h256 injiziert. Die Größe der Tumore nach der Virus- bzw. PBS-Injektion wurde wöchentlich bis zum Versuchsende aufgezeichnet. Tumore in GLV-1h256-injizierten Mäusen zeigten gegenüber Tumoren in GLV-1h68-injizierten Mäusen keine verbesserte Regression (nicht gezeigt). Daher wurde bei den nachfolgenden Experimenten ausschließlich GLV-1h255 verwendet. Tumore aus GLV-1h255-injizierten Mäusen zeigten eine tendenziell stärkere Regression als solche aus GLV-1h68-injizierten Mäusen. Zum Zeitpunkt 24 dpi wurde mittels Student's *t*-test ein *p*-Wert von 0,06 zwischen den Volumina von Tumoren aus GLV-1h255-injizierten Mäusen und jenen aus GLV-1h68-injizierten Mäu-



sen erhalten (Abbildung 35). Tumore in PBS-injizierten Mäusen zeigten ein ungehindertes Wachstum.

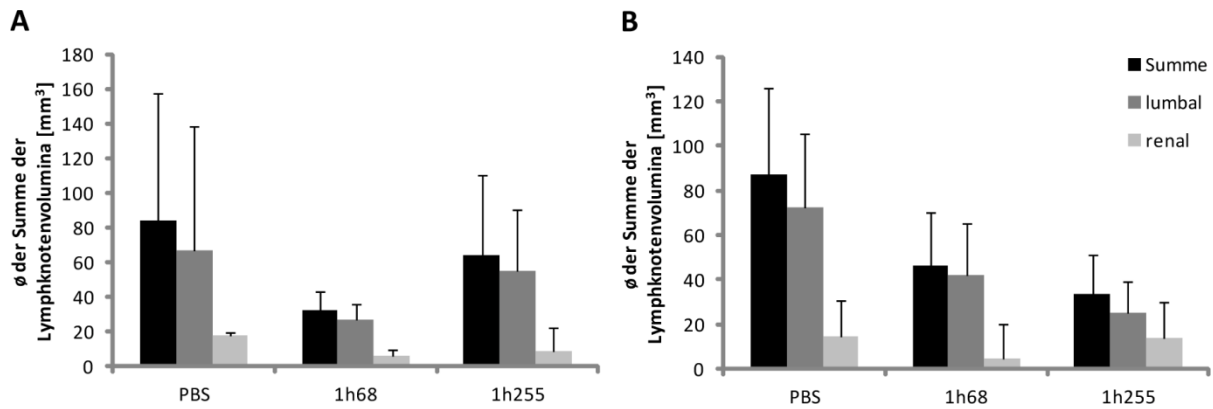


**Abbildung 35. Wachstum von PC3-Xenograft-Tumoren in athymischen Nacktmäusen.**

$2 \times 10^6$  PC3-Zellen wurden subkutan in die rechte Flanke von athymischen Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmäusen implantiert. Bei Erreichen eines Tumolvolumens von  $250 \text{ mm}^3$  wurden den Tieren  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h255 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. In der PBS-Gruppe wurden sechs Tiere verwendet, in den beiden rVACV-Gruppen jeweils sieben Tiere, der Versuch wurde 24 dpi beendet. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

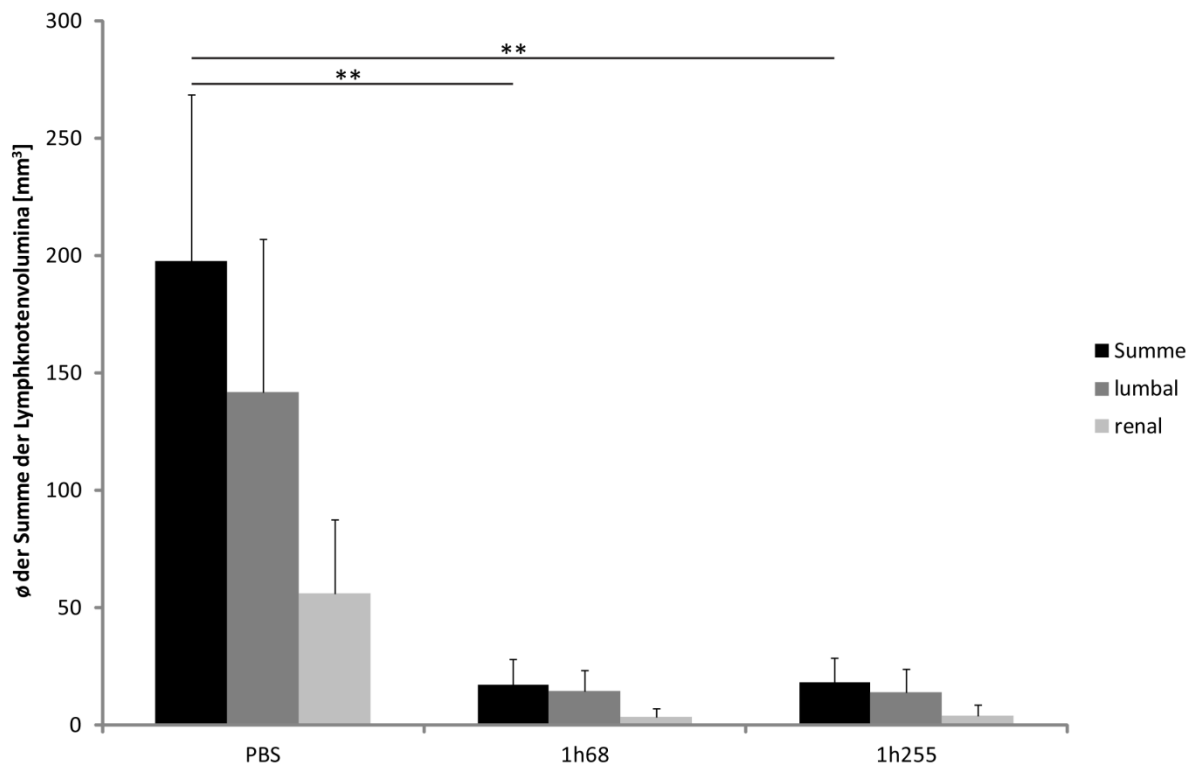
#### 4.2.4 Analyse des Einflusses der Viren GLV-1h68 und GLV-1h255 auf lumbale und renale Lymphknoten-Metastasen in PC3-tumortragenden Mäusen

Um zu überprüfen, ob viral exprimiertes MMP-9 einen Einfluss auf die Metastasierung in PC3-Tumor-tragenden Mäusen hat, wurden die Volumina der renalen und lumbalen Lymphknoten untersucht. Durch die MMP-9 Aktivität kommt es zum Abbau von EZM-Proteinen und einem erleichterten Herauslösen von Zellen aus dem Primärtumor. Diese können die Bildung von Metastasen begünstigen. Zu den Zeitpunkten 7 und 16 dpi, bzw. 30 und 39 Tage nach Implantation, konnten zwischen den Volumina der Lymphknoten von GLV-1h68-, GLV-1h255- bzw. PBS-injizierten Mäusen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 36).



**Abbildung 36. Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.**

Zur Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-tumortragenden Mäusen 7 (A) und 16 dpi (B) (30 und 39 d nach Implantation) wurden  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen implantiert und bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumorumfanges von  $250 \text{ mm}^3$  mit  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. Die Bestimmung der Lymphknotengröße erfolgte nach der Formel: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,5. In der PBS-Gruppe wurden jeweils drei Tiere und in den rVACV-Gruppen jeweils vier Tiere pro Zeitpunkt verwendet.



**Abbildung 37. Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen.**

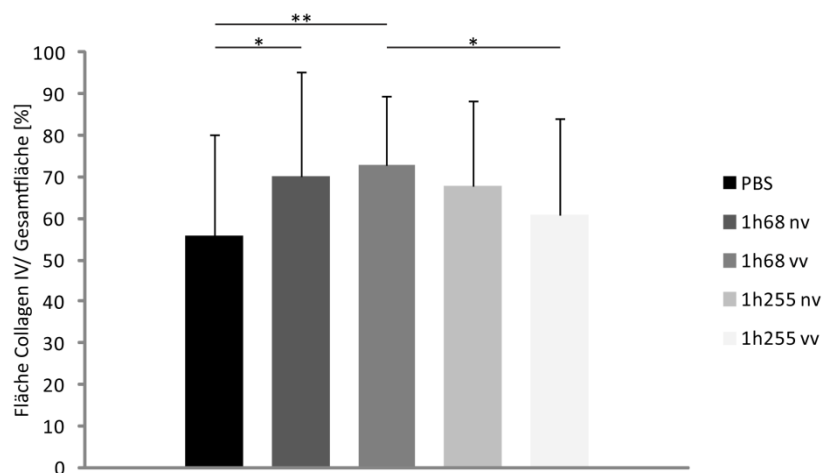
Zur Bestimmung des Volumens renaler und lumbaler Lymphknoten in PC3-tumortragenden Mäusen 24 dpi (48 d nach Implantation) wurden  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan in die rechte Flanke von athymischen Nacktmäusen implantiert und bei Erreichen eines durchschnittlichen Tumorumfanges von  $250 \text{ mm}^3$  mit  $5 \times 10^6$  PFU GLV-1h68 bzw. GLV-1h169 intravenös in eine laterale Schwanzvene injiziert. Die Bestimmung der Lymphknotengröße erfolgte nach der Formel: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,5. In der PBS-Gruppe wurden sechs Tiere, in den rVACV-Gruppen jeweils sieben Tiere eingesetzt. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

48 Tage nach Implantation und 24 dpi wurden in GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-injizierten Mäusen Lymphknoten von signifikant geringer Größe als in PBS-injizierten Mäusen gefunden (Abbildung 37).

GLV-1h255-infizierte Tumoren zeigten eine gegenüber GLV-1h68-infizierten Tumoren tendenziell verstärkte Tumorregression. Weiterhin führte die Überexpression von MMP-9 in GLV-1h255-infizierten Tumorzellen zu keinem negativen Effekt auf Metastasierung in renale und lumbale Lymphknoten PC3-Tumor-tragender Mäuse.

#### 4.2.5 Analyse der Veränderungen der extrazellulären Matrix und der MMP-9-Expression in GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-infizierten PC3-Tumoren

Um zu ermitteln, ob es durch eine Virus-vermittelte Überexpression von MMP-9 zu Veränderungen der extrazellulären Matrix kommt, wurde der Collagen IV-Gehalt in PC3-Tumorschnitten bestimmt. Collagen IV kommt u.a. in der Basalmembran von Blutgefäßen vor und wird durch MMP-9 gespalten. Bei der Quantifizierung (Abbildung 38) wurde



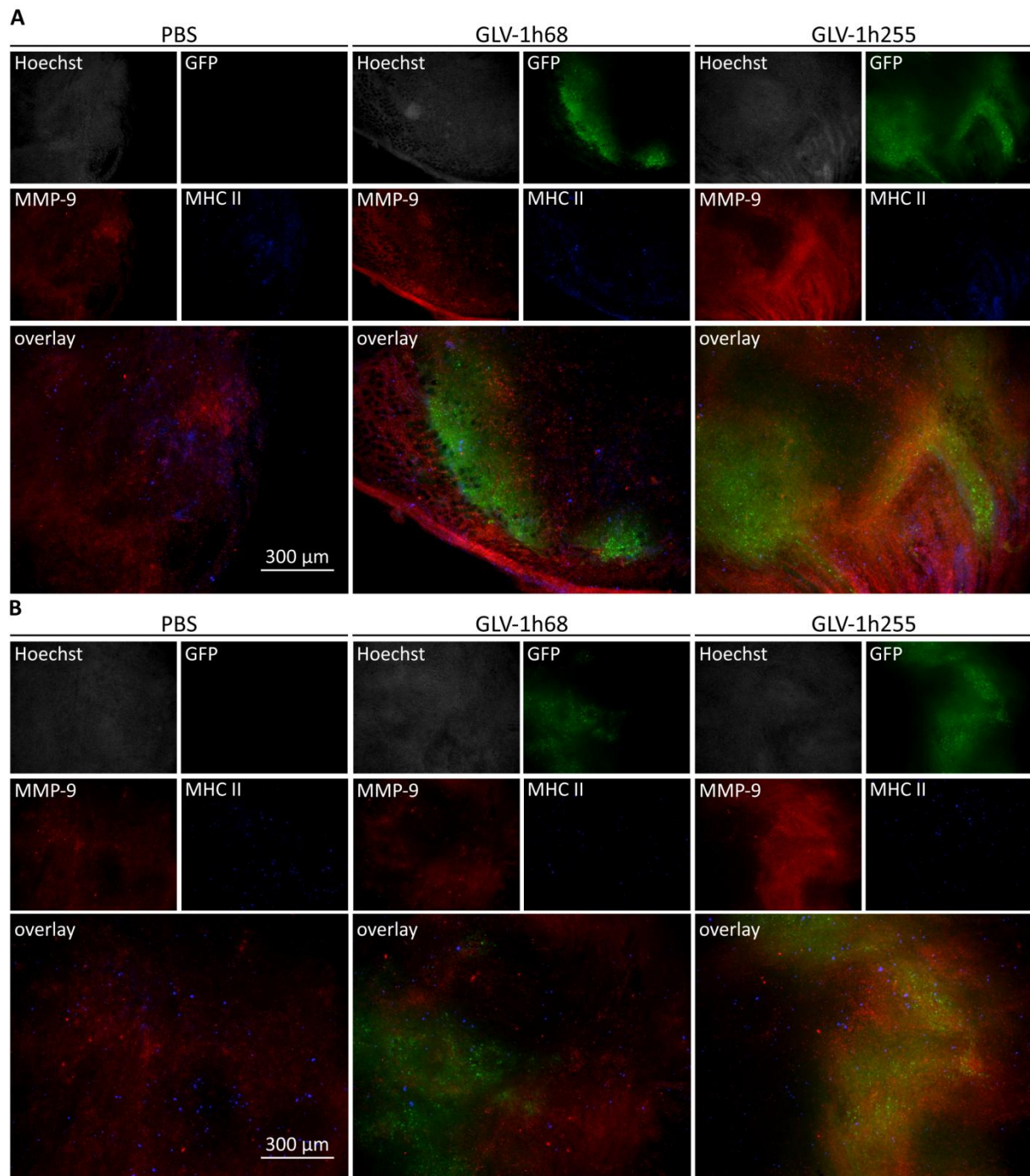
**Abbildung 38. Quantifizierung des Collagen IV-Gehalts in PC3-Tumoren, 7 dpi.**

Es wurden je drei Aufnahmen aus infizierten (vv) und nicht-infizierten (nv) Bereichen (100x, Leica MZ16FA) pro Schnitt von je drei nichtaufeinanderfolgenden Schnitten aus je drei Tumoren pro Gruppe verwendet. Zur Ermittlung der Prozentwerte wurde die Software ImageJ eingesetzt (Threshold für Quantifizierung für Collagen IV 8/255). Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet.  $p$ -Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

in GLV-1h255-infizierten Bereichen ein signifikant geringerer Collagen IV-Gehalt als in GLV-1h68-infizierten Bereichen gefunden. Ebenfalls wurde in Tumorschnitten der PBS-Gruppe ein gegenüber GLV-1h68-infizierten und nicht-infizierten Bereichen signifikant niedrigerer Collagen IV-Gehalt ermittelt.

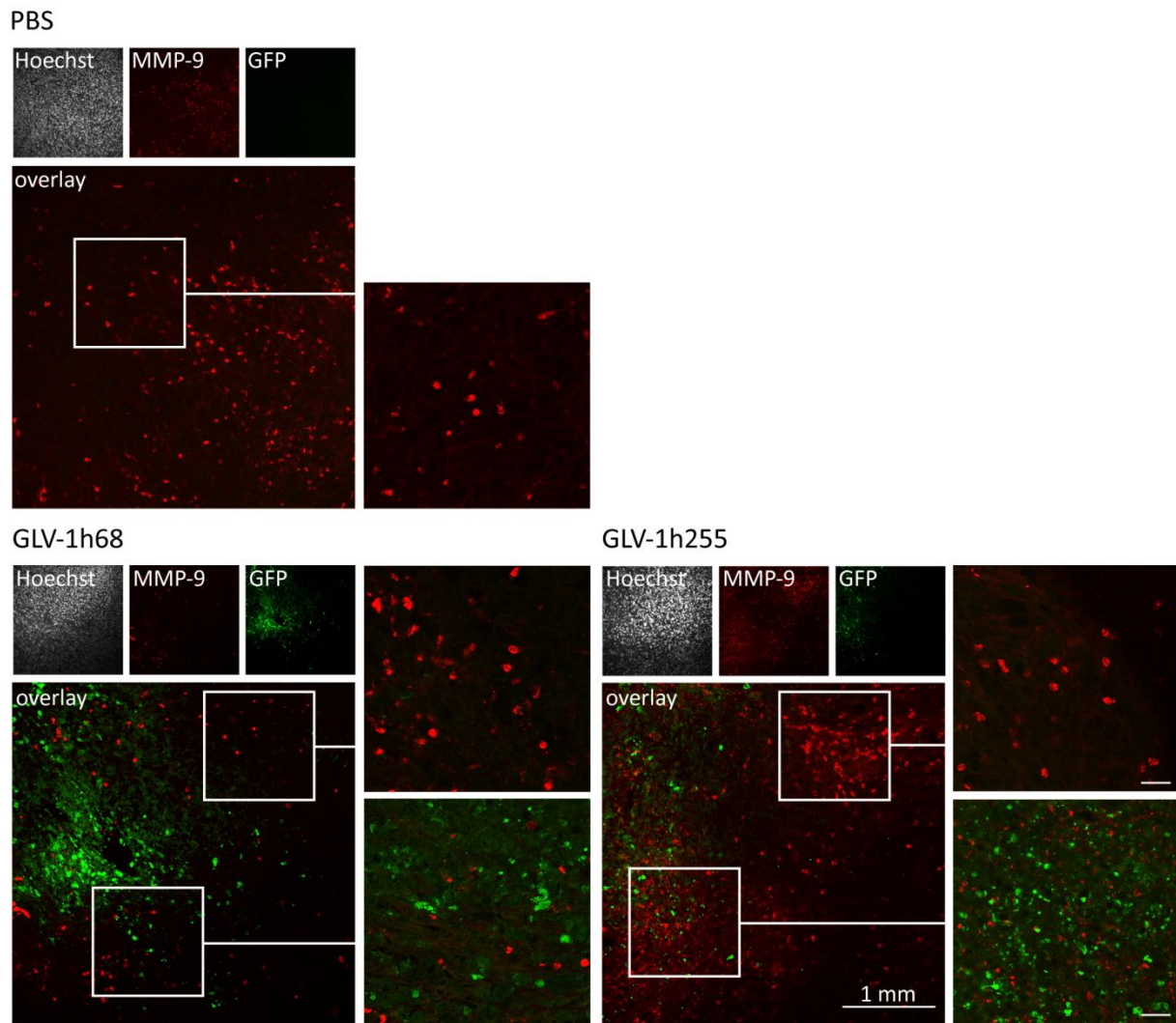
Weiterhin wurde geprüft, ob es zu einer spezifischen Expression von MMP-9 in GLV-1h255 infizierten Tumorbereichen kommt. Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Färbungen von PC3-Tumoragaroseschnitten durchgeführt. Abbildung 39 zeigt, dass bereits in unbehandelten PC3-Tumoren ein hohes Expressionslevel von MMP-9 vorliegt. Dennoch war in GLV-1h255 infizierten Bereichen ein signifikant erhöhtes MMP-9-Level gegenüber nicht-infizierten Bereichen nachzuweisen (Abbildung 41). In Abbildung 39 wurde wie für C33A (4.1.3.5), eine getrennte Darstellung für Tumorrandbereiche und –inneres gewählt. Im Gegensatz zur Verteilung von MHC II-positiven Zellen in C33A-Tumorschnitten konnten bei der MHC II-Färbung in PC3-Tumorschnitten keine Unterschiede in der Verteilung MHC II positiver Zellen zwischen Tumorrandbereichen und –innerem festgestellt werden.

Zusätzlich wurden Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop hergestellt (Abbildung 40). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich in GLV-1h255-infizierten Tumorschnitten die Zellmorphologie zwischen infizierten und nicht-infizierten Bereich unterscheidet. In nicht-infizierten Bereichen liegen größere, vereinzelte Zellen vor, während in infizierten Bereichen kleinere und dichtgedrängtere Zellen vorherrschen. Bei den größeren Zellen könnte es sich um Makrophagen handeln, bei den kleinen um infizierte Tumorzellen. Um dies zu bestätigen, müssten spezifische Färbungen für Makrophagen und humane Zellen durchgeführt werden. In GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden. In PBS-Tumorschnitten glich die Zellmorphologie jener in den nicht-infizierten Bereichen beider rVACV-Gruppen. Weiterhin wurden die MMP-9 Expressionslevel untersucht. Abbildung 41 zeigt, dass die MMP-9 Expression in GLV-1h255-infizierten Bereichen signifikant höher war als in nicht-infizierten Bereichen, während in der GLV-1h68 Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Bereichen vorlag. Ebenso war die MMP-9-Expression in GLV-1h255-infizierten Bereichen tendenziell ( $p$ -Wert 0,056) höher als in GLV-1h68-infizierten Bereichen.



**Abbildung 39. Expression von MHC II und MMP-9 in PC3-Tumoren.**

Expression von MHC II und MMP-9 in Randbereichen (A) und inneren Bereichen (B) von PC3-Tumorschnitten 7 dpi. Für die Immunhistochemischen Färbungen wurden 100  $\mu\text{m}$  Agaroseschnitte verwendet. MHC II (blau) wurde mit einem polyklonalen Ratte-MHC II-Antikörper (eBioscience) und einem Cy3-konjugiertem anti-Ratte Antikörper (Jackson ImmunoResearch), MMP-9 (rot) wurde mit einem polyklonalen Ziege MMP-9-Antikörper (Neuromics) und einem Cy5-konjugierten anti-Ziege Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Nuclei (weiß) wurden mittels Hoechst-Färbung visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

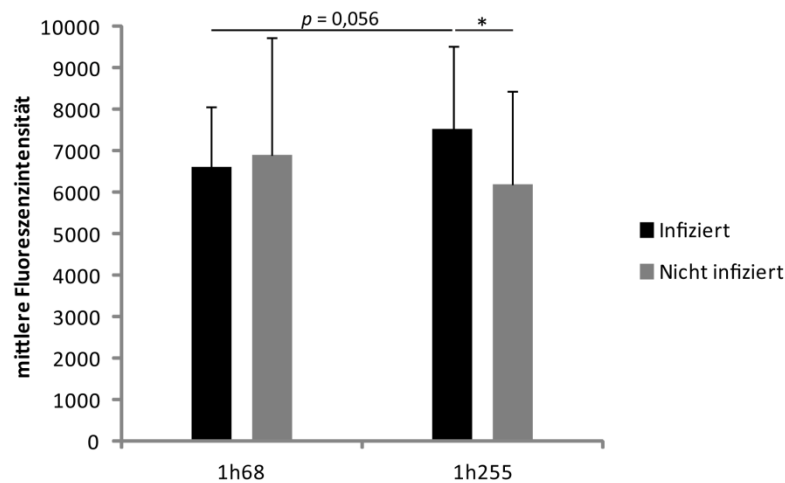


**Abbildung 40. Expression von MMP-9 in PC3-Tumoren. Vergleich infizierter und nicht-infizierter Bereiche.**

Expression von MMP-9 in PC3-Tumorschnitten 7 dpi. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden 100  $\mu\text{m}$  Agarosechnitte verwendet. MMP-9 (rot) wurde mit einem polyklonalen Ziege MMP-9 Antikörper (Neuromics) und einem Cy5 konjugiertem anti-Ziege Antikörper (Jackson ImmunoResearch) gefärbt. Nuclei (weiß) wurden mittels Hoechst-Färbung visualisiert. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Die Resultate zeigen, dass in GLV-1h255-infizierten Bereichen ein signifikant geringerer Collagen IV-Gehalt als in GLV-1h68-infizierten Bereichen vorliegt. Ebenso wurde in GLV-1h255-infizierten Bereichen eine signifikant erhöhte Expression von MMP-9 gegenüber nicht infizierten Bereichen ermittelt, nicht jedoch zwischen GLV-1h68-infizierten und nicht-infizierten Bereichen. Auch konnten bei MMP-9 exprimierenden Zellen morphologische Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Bereichen in GLV-1h255-infizierten Tumorschnitten, nicht jedoch in GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten, gefunden werden.





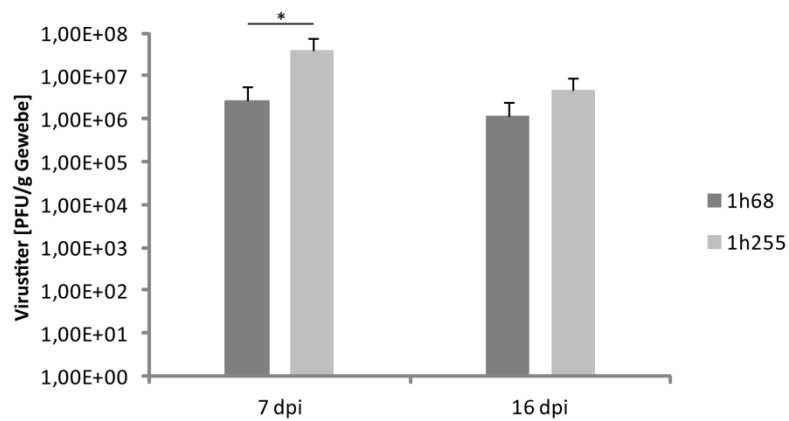
**Abbildung 41. Expression von MMP-9 in PC3 Tumoren.**

Quantifizierung der MMP-9 Expression in infizierten und nicht infizierten Bereichen von PC3 Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi. Es wurden jeweils drei Bilder (150x, Leica MZ16FA) aus infizierten und nicht-infizierten Bereichen pro Schnitt von je drei nicht aufeinander folgenden Schnitten aus je drei Tumoren pro Gruppe verwendet. Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ (mittlere Intensität) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.6 Analyse der GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-Virustiter in PC3-Tumoren

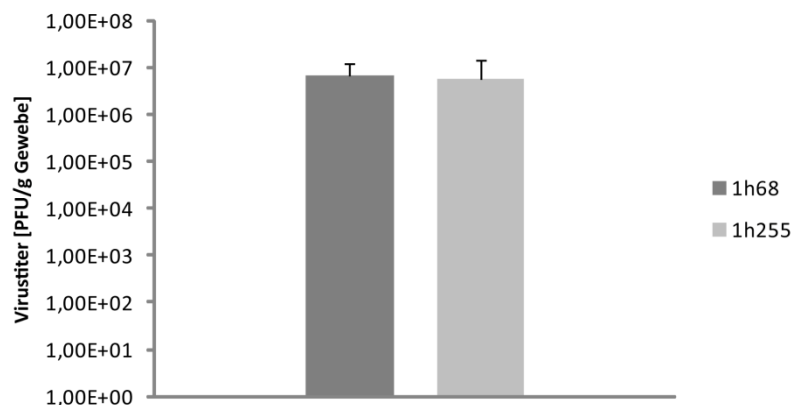
Um zu ermitteln, ob es durch die Virus-vermittelte Überexpression von MMP-9 zu Veränderungen der Virustiter kommt, wurden Plaque Assays mit Tumoren aus GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-injizierten Tieren durchgeführt.

Die Virustiter (PFU/g Gewebe) von GLV-1h68- bzw. GLV-1h255-infizierten Tumoren wurden zu den Zeitpunkten 7, 16 dpi und 24 dpi bestimmt (Abbildung 42 und Abbildung 43). Zum Zeitpunkt 7 dpi konnte in Tumoren der GLV-1h255-Gruppe ein signifikant höherer Titer als in Tumoren der GLV-1h68-Gruppe ermittelt werden, bei 16 bzw. 24 dpi glichen sich die Virustiter an. Weiterhin wurden durch Plaque Assays die Virustiter von verschiedenen Organen zu den Zeitpunkten 7 und 16 dpi ermittelt. 7 dpi (Tabelle 3) konnte Virus in den Ovarien GLV-1h68-injizierter Mäuse nachgewiesen werden. In Lebern, Nieren und Ovarien von GLV-1h255-injizierten Mäusen konnte ebenfalls Virus gefunden werden. 16 dpi konnte kein Virus in den untersuchten Organen nachgewiesen werden. Für Ovarien lag die Detektionsgrenze bei  $1 \times 10^3$  PFU/g Gewebe, für die restlichen Organe bei  $1 \times 10^2$  PFU/g Gewebe.



**Abbildung 42. Bestimmung der Virustiter in PC3-Tumoren.**

Virustiter (PFU/g Tumorgewebe) in PC3-Tumoren zu den Zeitpunkten 7 und 16 dpi. Pro Gruppe wurden jeweils vier Tiere verwendet. Die Lysate wurden in Dulbecco's PBS (PAA) mit einer Proteinaseinhibitortablette (Roche complete mini)/ 50 mL hergestellt. Die Signifikanz wurde mittels Quadratwurzeltransformation und Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abbildung 43. Bestimmung der Virustiter von PC3-Tumoren.**

Virustiter (PFU/g Tumorgewebe) in PC3-Tumoren zum Zeitpunkt 24 dpi. Pro Gruppe wurden sieben Tiere verwendet. Die Lysate wurden in Dulbecco's PBS (PAA) mit einer Proteinaseinhibitortablette (Roche complete mini)/ 50 mL hergestellt.

Quantifizierung der CD31-Expression, Bestimmung der Blutgefäßdurchmesser und -dichte, sowie Analyse der Extravasation von Hühner-IgG in PC3-Tumoren

Um zu ermitteln, ob die Virus-vermittelte Überexpression von MMP-9 einen Einfluss auf die CD31-Expression hat, wurden Agaroseschnitte mit einem monoklonalen Hamster CD31 Antikörper gefärbt, als Sekundärantikörper wurde ein DyLight 649-konjugierter anti-Hamster-Antikörper verwendet. Es konnte eine signifikant erhöhte mittlere Fluores-

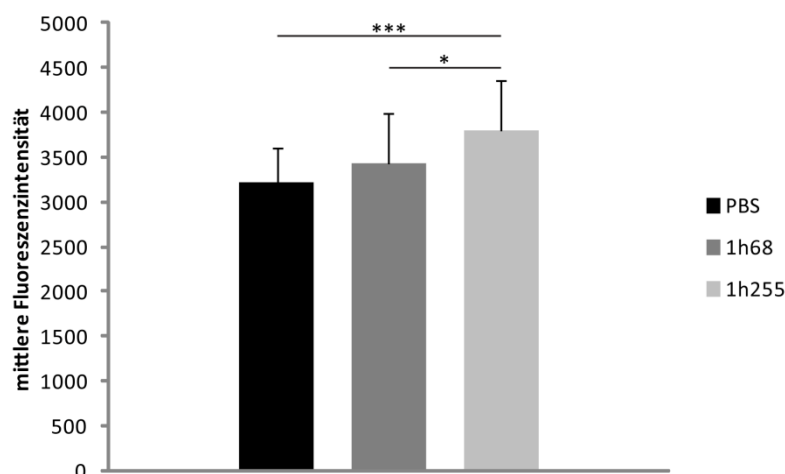


zenzintensität der GLV-1h255-Gruppe gegenüber der GLV-1h68- und der PBS-Gruppe gemessen werden (Abbildung 44).

**Tabelle 3. Bestimmung der viralen Titer aus verschiedenen Organen PC3-tumortragender Mäuse.**

Organ	GLV-1h68		GLV-1h255	
	7 dpi	16 dpi	7 dpi	16 dpi
Leber	0	0	$4,5 \times 10^1$	0
Lunge	0	0	0	0
Milz	0	0	0	0
Nieren	0	0	$3,6 \times 10^4$	0
Ovarien	$3,6 \times 10^4$	0	$6,6 \times 10^3$	0

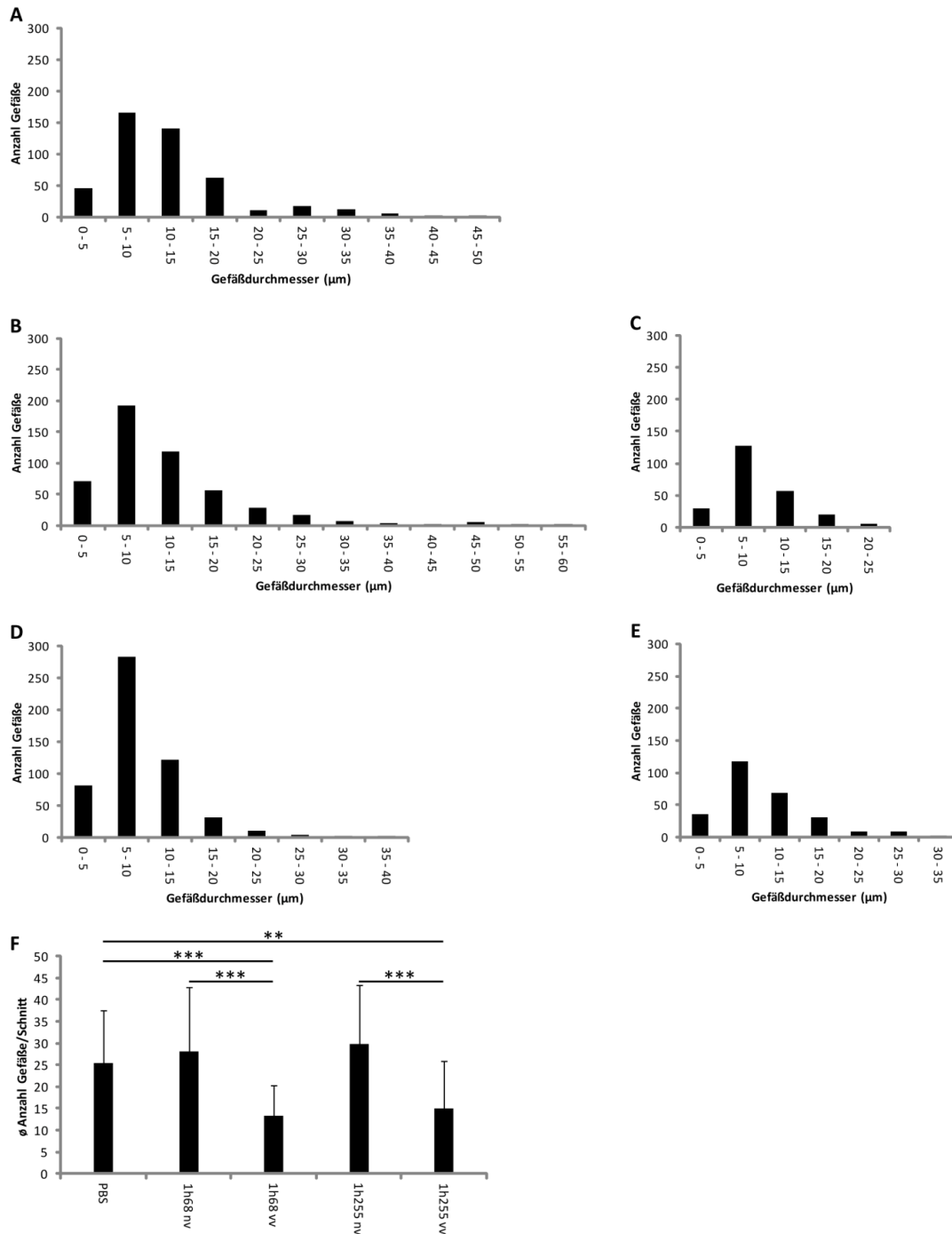
Plaque-Assay zur Bestimmung des viralen Titers (PFU/g Gewebe) in verschiedenen Organen von PC3-tumortragenden Mäusen. Pro Gruppe wurden vier Tiere verwendet. Für Ovarien lag die Detektionsgrenze bei  $1 \times 10^3$  PFU/g Gewebe, für die restlichen Organe bei  $1 \times 10^2$  PFU/g Gewebe. Die Lysate wurden in Dulbecco's PBS (PAA) mit einer Proteinase-Inhibitortablette (Roche complete mini)/ 50 mL hergestellt.



**Abbildung 44. Intensität der CD31-Expression in PC3-Tumoren.**

Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD31 in PC3-Tumorschnitten zum Zeitpunkt 7 dpi. Es wurden je drei Aufnahmen (100x, Leica MZ16FA) pro Schnitt von je drei nicht aufeinander folgenden Schnitten aus je drei Tumoren pro Gruppe verwendet. Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ (mittlere Intensität) durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet. *p*-Werte: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

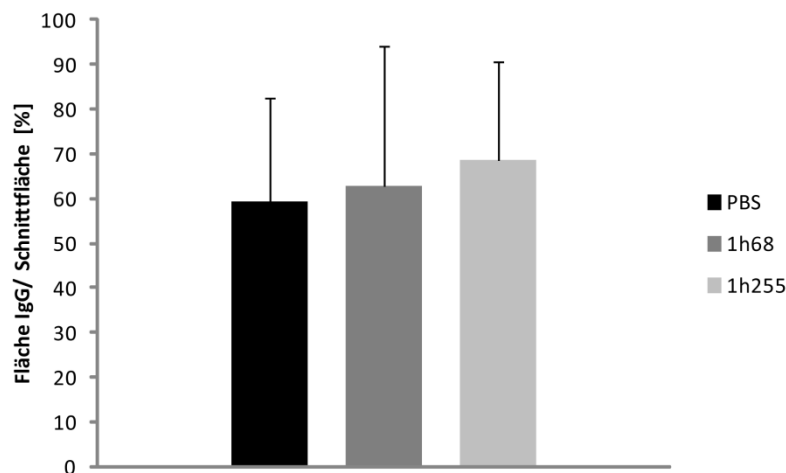
Weiterhin wurde die Verteilung der Blutgefäßdurchmesser und -dichte untersucht (Abbildung 45). Bei der Verteilung der Blutgefäßdurchmesser gab es keine auffälligen Unterschiede. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Blutgefäßdichte in infizierten Bereichen signifikant niedriger ist als in nicht-infizierten Bereichen und in der PBS-Gruppe (Abbildung 45 F).



**Abbildung 45. Verteilung der Blutgefäßdurchmesser und der Anzahl der Blutgefäße in infizierten und nicht-infizierten Bereichen.**

A – E. Anzahl der Blutgefäße gegen den Gefäßdurchmesser in µm. (A) PBS, (B) GLV-1h68 nicht-infizierte Bereiche, (C) GLV-1h68 infizierte Bereiche, (D) GLV-1h255 nicht-infizierte Bereiche, (E) GLV-1h255 infizierte Bereiche, (F) durchschnittliche Anzahl der Blutgefäße pro Schnitt. nv: nicht-infizierte Bereiche, vv: infizierte Bereiche. Färbung mit CD31 Antikörper. Es wurden jeweils drei Bilder (200x, Leica MZ16FA) aus infizierten und nicht-infizierten Bereichen pro Schnitt von je drei nicht-aufeinanderfolgenden Schnitten aus je drei Tumoren pro Gruppe verwendet. Zur Bestimmung der Blutgefäßdurchmesser wurden die Aufnahmen mittels Leica IM1000 Software skaliert und in Adobe Illustrator die Gefäßdurchmesser jener Gefäße gemessen, die fünf in gleichem Abstand verteilten Linien kreuzen. In infizierten Bereichen wurden jeweils signifikant weniger Gefäße als in nicht-infizierten Bereichen und in der PBS-Gruppe gefunden (F).

Abschließend wurde untersucht, ob die Permeabilität der Blutgefäße durch die Virusvermittelte Überexpression von MMP-9 beeinflusst wird. Collagen IV in der Basalmembran von Blutgefäßen könnte durch MMP-9 abgebaut werden und dadurch die Permeabilität erhöhen. Zur Analyse der Gefäßpermeabilität wurde die Extravasation von Hühner-IgG in PC3-Tumorschnitten quantifiziert (Abbildung 46).



**Abbildung 46. Extravasation von Hühner-IgG in PC3-Tumoren.**

Extravasation von Hühner-IgG in PC3-Tumoren zum Zeitpunkt 7 dpi. Sechs Stunden vor dem Töten der Tiere wurden je 0,25 mg Hühner-IgG in 100  $\mu$ L PBS i.v. injiziert. Es wurden drei nicht aufeinander folgende Schnitte pro Tumor aus jeweils vier Tieren pro Gruppe verwendet und mit einem Cy3-konjugierten Anti-Hühnchen Antikörper gefärbt. Aufnahmen der gesamten Schnitte wurden mit dem Leica MZ16FA Mikroskop erstellt und mit ImageJ Software ausgewertet. Es wurde jeweils die Gesamtschnittfläche und für IgG die Fläche oberhalb des Schwellenwerts bestimmt (ImageJ Threshold 0/15).

Dabei konnten zum Zeitpunkt 7 dpi keine signifikanten Unterschiede in der Extravasation von Hühner-IgG zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* zu einer Expression von viral codiertem MMP-9 in PC3-Zellen kommt und dass in GLV-1h255- und GLV-1h256-infizierten A549-Zellen exprimiertes MMP-9 enzymatisch aktiv ist. *In vivo* konnte in GLV-1h255-infizierten Tumoren eine gegenüber GLV-1h68-infizierten Tumoren tendenziell verstärkte Tumorregression gezeigt werden. Weiterhin konnte ein negativer Effekt des viral überexprimierten MMP-9 auf die Metastasierung in PC3-Tumor-tragenden Mäusen ausgeschlossen werden. Ebenso wurde in GLV-1h255-infizierten Bereichen eine signifikant erhöhte Expression von MMP-9 gegenüber nicht infizierten Bereichen ermittelt, nicht jedoch zwischen GLV-1h68-infizierten und nicht-infizierten Bereichen. Schließlich konnten bei MMP-

9 exprimierenden Zellen morphologische Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Bereichen in GLV-1h255-infizierten Tumorschnitten, nicht jedoch in GLV-1h68-infizierten Tumorschnitten, gefunden werden. Zusätzlich konnte in GLV-1h255 infizierten Bereichen ein signifikant geringerer Collagen IV-Gehalt als in GLV-1h68 infizierten Bereichen ermittelt werden. Abschließend wurde bei der Analyse der Blutgefäße eine signifikant geringere Gefäßdichte in infizierten Bereichen gegenüber nicht-infizierten Bereichen festgestellt.

## 5 Diskussion

Global ist Krebs nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache<sup>15</sup>. Aus diesem Grund ist es notwendig, neben den konventionellen Therapieformen wie z.B. Chemotherapie, Bestrahlung, Operation, Behandlung mit Hormonen oder Antikörpern weitere Methoden zur Krebsheilung zu erforschen und zu etablieren. Einer dieser Versuche ist die Behandlung mit onkolytischen Viren. Dabei werden verschiedene Virus-typen eingesetzt, wie Adeno-, Herpes simplex-, Reo-, Polio-, Vesicular Stomatitis-, Marnern-, Newcastle Disease- und Vaccinia-Viren<sup>175</sup>. Letztere wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Um die Effizienz onkolytischer Viren bei der Krebstherapie zu erhöhen, werden in deren Genom Gene für therapeutisch wirksame Proteine inseriert. Diese ektopisch exprimierten Proteine können z.B. die Angiogenese blockieren<sup>117</sup>, Tumorzellen durch die Aktivierung von *Prodrugs* abtöten<sup>115</sup>, die Immunantwort stimulieren<sup>176-179</sup>, die Virus-vermittelte Onkolyse unterstützen oder positive systemische Effekte auslösen. Für eine effiziente Lyse von Tumorzellen ist es notwendig, dass sich die Viren möglichst rasch im Tumorgewebe ausbreiten können. Die extrazelluläre Matrix kann ein Hindernis für die Virusausbreitung darstellen<sup>48,49</sup>. In dieser Arbeit wurden die onkolytischen Viren GLV-1h68 und GLV-1h255, in deren Genom die Gene für Relaxin 1 bzw. Matrixmetalloproteinase 9 inseriert wurden, verwendet. Die Expression dieser viral-codierten Proteine im infizierten Tumorgewebe sollte zu einem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix führen und somit die virale Ausbreitung erleichtern und den therapeutischen Effekt verbessern.

### 5.1 Therapeutischer Effekt der Viren GLV-1h169 und GLV-1h255

Zur Analyse eines möglichen Einflusses auf das Wachstum von Xenograft-Tumoren in athymischen Nacktmäusen durch die Expression von viral-codiertem Relaxin 1 bzw. MMP-9 wurden die Tumormodelle PC3, DU145 und C33A verwendet. Die PC3- und DU145-Zelllinien wurden aus Metastasengewebe von männlichen Patienten mit Prostatakrebs isoliert. PC3 ist von Knochenmetastasen und DU145 ist von Hirnmetastasen abge-

leitet. Die PC3-Zelllinie hat ein hohes, die DU145-Zelllinie ein moderates metastatisches Potential (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). Die Prostata ist ein Relaxin-exprimierendes Gewebe<sup>180,181</sup> und bei Prostatakrebs kann Relaxin das Tumorwachstum begünstigen und die Metastasierung fördern<sup>157,159</sup>. Die C33A-Zelllinie wurde aus einer Biopsieprobe einer Frau mit Zervixkarzinom gewonnen (ATCC). Im Zervixgewebe vermittelt Relaxin während der Schwangerschaft das *Remodeling* der EZM<sup>136,142</sup>. Relaxin-codierende Adenoviren wurden bereits erfolgreich zur Therapie von Prostata- und Zervixkarzinom-Xenograft-Tumoren eingesetzt<sup>48,49</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein möglicher therapeutischer Effekt der Viren GLV-1h169 und GLV-1h255 in den untersuchten Tumormodellen analysiert. Bei DU145-, PC3- und C33A-Tumor-tragenden Mäusen kam es nach der intravenösen Injektion von GLV-1h169, ebenso wie bei GLV-1h68 injizierten Mäusen, zu einer signifikanten Tumorregression. Für die Studien mit GLV-1h255 wurden ausschließlich PC3-Tumor-tragende Mäuse verwendet. Bereits 17 dpi kam es bei GLV-1h255-injizierten Mäusen zu einer signifikanten Tumorregression, nicht jedoch bei GLV-1h68 injizierten Mäusen. Weiterhin zeigten Tumore in GLV-1h255-injizierten Tieren 24 dpi eine stärkere Regression ( $p < 0,001$ ) als jene in GLV-1h68-injizierten Tieren ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu PBS-injizierten Tieren.

## **5.2 Expression von Relaxin 1 und MMP-9, Veränderungen der EZM, der Vaskulatur und der Einfluss auf die Ausbreitung der Viren**

Der die Zellen eines Gewebes umgebende extrazelluläre Raum enthält ein Netzwerk aus Makromolekülen, welches als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet wird. Hauptbestandteile der EZM sind Glykosaminoglykane und fibrilläre Proteine wie Collagen, Elastin, Fibronectin und Laminin<sup>149</sup>. Diese Matrix kann die Beweglichkeit von Viren<sup>41,47</sup> und Immunzellen behindern. Frühere Studien zeigten, dass Expression von Relaxin einen Abbau von EZM-Komponenten und eine beschleunigte Virusausbreitung bzw. Infiltration von Antitumor-Immunzellen im Tumorgewebe ermöglicht<sup>48,49,173</sup>. Der Abbau von EZM-Komponenten geschieht im Falle von Relaxin über die Induktion der MMP-9 Expression. MMP-9 gehört gemeinsam mit MMP-2 zur Enzymklasse der Gelatinasen. Gelatine ist die

denaturierte Form von Collagen und wurde bei der Zymographie zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität von viral-überexprimiertem MMP-9 verwendet. Im einzelnen werden durch MMP-9 die Substrate Decorin, Elastin, Fibrillin, Laminin, Collagen (IV, V, XI, XVI) sowie die Wachstumsfaktoren proTGF $\beta$  und proTNF $\alpha$  gespalten<sup>182</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Collagen I, Collagen IV und Laminin untersucht. Collagen I wird nicht von MMP-9 gespalten, aber von MMP-2<sup>183</sup>. Der Collagen I-Gehalt in Tumoren wurde untersucht, um zu ermitteln, ob dieser durch die Virus-induzierte Inflammation beeinflusst werden kann. Durch die Inflammation rekrutierte Immunzellen oder Fibroblasten können die Zusammensetzung der Matrix durch die Expression von MMPs bzw. die Ablagerung von Matrixproteinen verändern<sup>165,184</sup>.

In GLV-1h68- und GLV-1h169-behandelten DU145-Xenograft-Tumoren wurde zum Zeitpunkt 7 dpi ein signifikant verringerter Collagen IV- und Lamingehalt gemessen. In GLV-1h68- und GLV-1h169-behandelten C33A-Xenograft-Tumoren wurde zum Zeitpunkt 7 dpi ein signifikant erhöhter Collagen IV-Gehalt und zum Zeitpunkt 14 dpi ein signifikant erhöhter Collagen I- und Lamingehalt ermittelt. PC3-Tumore aus GLV-1h68-injizierten Tieren zeigten zum Zeitpunkt 7 dpi eine signifikante Erhöhung des Collagen IV-Gehalts gegenüber Tumoren aus PBS-behandelten Tieren. Auch wurde in GLV-1h255 infizierten Tumorbereichen ein signifikant niedriger Collagen IV-Gehalt als in nicht infizierten Bereichen dieser Tumore gefunden.

Die erhöhte Collagenablagerung in C33A- und PC3-Tumoren könnte durch eine Wundheilungsreaktion auf die Virus-induzierte Inflammation zu erklären sein. Dvorak<sup>185</sup> fand Parallelen in der Zusammensetzung des Tumorstromas und heilenden Hautwunden. Da der Heilungsprozess in Tumoren nicht zeitlich begrenzt ist, bezeichnete er Tumore als Wunden, die nicht heilen. Während der Wundheilung bilden Fibroblasten große Mengen an EZM-Proteinen. Die Aktivität der Fibroblasten ist dabei zeitlich begrenzt und es kommt durch ein *Remodeling* der EZM zur Narbenbildung und Verheilung der Wunde. Anhaltende Aktivität von Fibroblasten kann zu einer überschießenden Collagenablagerung und letztendlich zu einer Fibrose führen<sup>184</sup>.

In DU145-Tumoren der PBS-injizierter Mäuse wurde eine ausgeprägte Flüssigkeitsbildung beobachtet, während es in Virus-infizierten Tumoren zu einer starken Eiterbildung ab 10

dpi kam. Diese Tumore enthalten viele Neutrophile (J. Sturm, persönliche Mitteilung), welche durch Macrophagen abgebaut werden. Dabei entsteht als Abbauprodukt Eiter. Zusätzlich wurde in VACV-infizierten Tumoren ein signifikant niedrigerer Collagen IV- und Laminin Gehalt als in Tumoren PBS-behandelter Tiere gefunden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Expression von Elastase durch Neutrophile sein. Elastase ist eine Serinprotease, die während der Inflammation Bakterien abtöten kann<sup>186</sup>. Allerdings kann dieses Enzym eine Vielzahl von Substraten spalten (u.a. auch Collagen IV und Laminin)<sup>187</sup>, wodurch es zu einer Zerstörung des Gewebes, bzw. der EZM kommen kann.

Es ist zu erwarten, dass es nach der Infektion mit GLV-1h169 durch eine Relaxin-induzierte MMP-9-Expression zum EZM *Remodeling* kommt. Nach der Infektion mit GLV-1h255 soll dies direkt durch das viral codierte MMP-9 erfolgen. Durch immunhistochemische Färbungen konnte in C33A-Tumoren eine spezifische Expression von Relaxin 1 in GLV-1h169-infizierten Bereichen nachgewiesen werden. Eine Expression von MMP-9 konnte jedoch nur in Tumorrandbereichen gezeigt werden. Diese Expression könnte durch MHC II-positive Zellen, zu denen B-Zellen, Monocyten, Macrophagen und dendritische Zellen gehören<sup>188</sup>, geschehen, da diese für die Expression von MMPs, wie z.B. von MMP-9, von Bedeutung sind<sup>184</sup>. Im Gegensatz zum Tumorrinneren konnten in Tumorrandbereichen MHC II-positive Zellen sowie eine Expression von MMP-9 nachgewiesen werden. Das vermehrte Vorkommen MHC II-positiver Zellen in den Tumorrandbereichen könnte auf die Virus-bedingte Inflammation zurückzuführen sein, die zu einer Rekrutierung von Immunzellen, wie Macrophagen führt<sup>50</sup>. Es wurde beobachtet, dass es zwischen Tumoren Unterschiede in der Anzahl von Macrophagen gibt, die auch als Tumor-assoziierte Macrophagen (TAM) bezeichnet werden. Dabei ist eine erhöhte Anzahl an TAMs oft mit einer für den Patienten schlechten Prognose und einem invasivem Tumorwachstum sowie einer verstärkten Metastasierung verbunden<sup>189</sup>.

Die Analyse der MMP-9-Expressionslevel zeigte in GLV-1h68- bzw. GLV-1h169-infizierten Tumoren eine signifikante Erhöhung gegenüber PBS-behandelten Tumoren, während es zwischen GLV-1h68- und GLV-1h169-infizierten Tumoren keinen Unterschied der MMP-9 Expression zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass die MMP-



---

9-Expression durch MHC II-positive Zellen und nicht durch die Expression von Relaxin vermittelt wurde.

PC3-Tumore zeigten bereits im nicht-infizierten Zustand einer ausgeprägten MMP-9-Expression, die auf MHC II-positive Zellen zurückzuführen sein könnte. Weiterhin konnte in PC3-Zelllysaten mittels Zymographie eine starke proteolytische Aktivität nachgewiesen werden, die möglicherweise auf die Aktivität von MMPs zurückzuführen ist. Trotz des hohen basalen MMP-9-Expressionslevels konnte in GLV-1h255-infizierten Tumorbereichen eine signifikante Überexpression von MMP-9 gegenüber nicht-infizierten Bereichen nachgewiesen werden. Dies könnte erklären, warum der Collagen IV-Gehalt in GLV-1h255-infizierten Tumorbereichen signifikant niedriger ist als in GLV-1h68-infizierten.

Anders als in C33A-Tumoren wurden in PC3-Tumoren keine Unterschiede in der Verteilung und Anzahl MHC II-positiver Zellen ermittelt. Zusätzlich zeigten sich in GLV-1h255-infizierten Tumoren Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen infizierten und nicht-infizierten Tumorbereichen. In nicht-infizierten Tumorbereichen konnte gezeigt werden, dass eher größere, vereinzelte Zellen vorliegen, während in infizierten Tumorbereichen kleinere und dichtgedrängtere Zellen beobachtet wurden. Die größeren Zellen dürften Macrophagen sein, die kleinen hingegen infizierte Tumorzellen. In GLV-1h68-Tumoren zeigte sich dieser Unterschied nicht.

Um Unterschiede im Ausbreitungsverhalten der Viren GLV-1h169 bzw. GLV-1h255 und GLV-1h68 zu ermitteln, wurde die Fläche GFP-exprimierender Zellen in Bezug auf die Tumorschnittgesamtfläche gemessen. Der virale Marker GFP diente als Indikator für infizierte Zellen. Zwischen GLV-1h169- und GLV-1h68-infizierten Tumoren konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Bei der Quantifizierung der Virusausbreitung anhand des viralen Markerproteins GFP muss beachtet werden, dass Zellen nach der Infektion zunächst GFP-negativ, aber infiziert sind. Erst nach dem Einsetzen der GFP-Expression kann eine Zelle über das GFP-Signal als infiziert identifiziert werden. Weiterhin kann GFP aufgrund seiner langen Halbwertszeit<sup>190</sup> auch in bereits nekrotischen Berei-

chen detektiert werden. Alternativ könnte die Quantifizierung der Virusausbreitung nach einer immunhistochemischen Färbung von Vaccinia-Virus durchgeführt werden. Weiterhin wurden die viralen Titer im Tumorgewebe bestimmt. Zum Zeitpunkt 7 dpi konnte hierbei ein signifikant höherer Titer in GLV-1h255-infizierten Tumoren gegenüber GLV-1h68-infizierten ermittelt werden. Dies könnte die beschleunigte Tumorregression bei GLV-1h255-injizierten Mäusen gegenüber GLV-1h68-injizierten erklären.

Die intratumorale Expression von Relaxin 1 bzw. MMP-9 infolge der Infektion mit GLV-1h169 oder GLV-1h255 führte nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Ausbreitung der Viren gegenüber dem parentalen Virus GLV-1h68. Im Vergleich dazu konnte die Ausbreitung von Adenoviren durch die intratumorale Expression von Relaxin gegenüber dem parentalen Virus verstärkt werden<sup>48,49</sup>. Bei Adenoviren erfolgt die Infektion über den Coxsackie Adenovirus Receptor (CAR)-Rezeptor<sup>191</sup>. Das variable Vorkommen des CAR-Rezeptors kann die virale Ausbreitung erschweren. Wurden Adenoviren so modifiziert, dass sie an den häufig vorkommenden CD46-Rezeptor binden konnten, kam es zu einer deutlichen Verstärkung der Ausbreitung der Viren<sup>192</sup>. Ein weiterer Ansatz war die Generierung eines Relaxin-codierenden Adenovirus<sup>48,49</sup>. Hier kam es ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung des therapeutischen Effekts, wobei einschränkend angemerkt werden muss, dass sehr hohe Titer für die Infektion notwendig waren und das parentale Virus eine sehr ineffiziente Ausbreitung der Viren zeigte. Vaccinia-Virus hingegen benötigt keinen Rezeptor für die Infektion und kann ein breites Spektrum von Wirtszellen infizieren, da die Replikation im Zytoplasma erfolgt und im Wesentlichen viral codierte Proteine verwendet werden<sup>61,62,65</sup>. Bereits das parentale Virus GLV-1h68 breitet sich sehr effizient im Tumorgebe aus, was in den entsprechenden Tumormodellen (z.B. DU145, C33A und PC3) gezeigt werden konnte und zu in einer starken Tumorregression führt. Im Vergleich zu Adenoviren kann die Infektion direkt von Zelle zu Zelle geschehen, in dem Viruspartikel durch Aktinschwänze von der Zelloberfläche weggeschoben werden und benachbarte Zellen penetrieren<sup>193</sup>. Ein weiterer Mechanismus zur schnellen Virusausbreitung wurde von Doceul *et al.*<sup>101</sup> beschrieben. In infizierten Zellen wird der Proteinkomplex A33/A36 exprimiert. Treten CEV/EEV Partikel mit diesem in Kontakt, wird die Bildung von Aktinschwänzen induziert, welche Viruspartikel an nichtinfizierte Zellen wei-

terreichen können. Trotz der bereits sehr effizienten Tumorerkrankung durch GLV-1h68 konnte die Ausbreitung der Viren durch die intratumorale, GLV-1h255 vermittelte Expression von MMP-9 weiter beschleunigt werden. Dies spiegelte sich in einer früheren und verstärkten Tumorerkrankung wider.

Alternativ, bzw. zusätzlich sollte in künftigen Studien versucht werden, die initiale Infektion des Tumors zu erhöhen. Blutgefäße im Tumor zeigen eine höhere Permeabilität als gesunde Vaskulatur<sup>165</sup>. Die Basalmembran von Blutgefäßen enthält Collagen IV<sup>50</sup>. Möglicherweise könnte durch die Gabe eines Collagen-degradierenden Agens vor der Infektion die Gefäßpermeabilität weiter erhöht werden und so der Austritt von Viruspartikeln erleichtert werden.

Durch die Expression von Relaxin kann die Expression von MMP-9 und VEGF induziert werden<sup>132-134</sup>. Weiterhin wird die Verfügbarkeit von VEGF über MMP-9 reguliert<sup>165</sup>. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Aspekte untersucht. Auf der einen Seite könnte es durch VEGF zur Angiogenese kommen und auf der anderen könnte MMP-9 Collagen IV in der Basalmembran der Blutgefäße spalten und dadurch deren Permeabilität erhöhen. In GLV-1h169-infizierten Tumoren wurden keine Unterschiede in der Blutgefäßdichte gefunden, aber eine signifikant erhöhte Extravasation von Hühner IgG in den rVACV-infizierten Tumoren. Die Extravasation war jedoch in GLV-1h169-behandelten Tumoren nicht höher als in GLV-1h68-behandelten. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Expression von Relaxin nicht zu einer zusätzlichen Erhöhung der MMP-9 Expression führt. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität könnte bei einer Kombinationstherapie aus Virus und Chemotherapeutikum hilfreich sein oder es könnte versucht werden, durch eine erste Infektion die Gefäßpermeabilität zu erhöhen, um bei einer zweiten Infektion den Austritt der Viruspartikel aus den Gefäßen zu erleichtern.

Zwischen GLV-1h255- und GLV-1h68-behandelten Tumoren wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Extravasation gefunden, was durch das hohe Grundexpressionslevel von MMP-9 in PC3-Tumoren erklärt werden könnte. Außerdem erfolgte die Virus-vermittelte Überexpression von MMP-9 in den GLV-1h255 infizierten Tumorbereichen. Dort wurden aber signifikant weniger Blutgefäße als in nicht infizierten Tumorbereichen.

reichen gefunden. Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass die zusätzliche MMP-9 Expression nicht zu einer erhöhten Extravasation führte.

### **5.3 Einfluss der Viren GLV-1h169 und GLV-1h255 auf die Metastasierung lumbaler und renaler Lymphknoten in PC3-Tumor-tragenden Mäusen**

Die besten Heilungschancen für Krebspatienten bestehen dann, wenn es gelingt, den Primärtumor früh und ohne zurückbleibendes malignes Gewebe operativ zu entfernen. Meist wird dieser jedoch erst detektiert, nachdem bereits eine Metastasenbildung erfolgte. Annähernd 90 % der Krebspatienten sterben an den Folgen der Metastasierung<sup>194,195</sup>. Daher ist es ein großer Vorteil, wenn ein Agens einen therapeutischen Einfluss sowohl auf den Primärtumor als auch auf die Metastasen hat. Es konnte bereits gezeigt werden, dass GLV-1h68 einen solchen Effekt auf Lymphknoten-Metastasen in PC3-Tumor-tragenden Mäusen hat<sup>174</sup>. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Expression der viral-codierten Gene für Relaxin 1 und MMP-9 in PC3-Xenograft-Tumoren einen Einfluss auf die Metastasierung in die renalen und lumbalen Lymphknoten von athymischen Nacktmäusen hat. Über den Einfluss von MMPs in der Tumorgenese und metastatischen Kaskade gibt es eine umfangreiche Literatur, wobei sowohl positive als auch negative Effekte beobachtet wurden<sup>170</sup>.

Zur Analyse der Metastasierung wurden PC3-tumortragenden Mäusen GLV-1h169 oder GLV-1h255 injiziert. Unter Verwendung von GLV-1h169 wurden zwei separate Experimente durchgeführt. In beiden Experimenten konnte eine signifikante Verringerung der Volumina renaler und lumbaler Lymphknoten in VACV-behandelten PC-3-Tumor-tragenden Mäusen gegenüber PBS-behandelten Mäusen festgestellt werden. Die signifikante Erhöhung der Lymphknotenvolumina in GLV-1h169- gegenüber GLV-1h68-injizierten Mäusen im ersten Experiment wurde im zweiten Experiment nicht reproduziert. Im Falle von GLV-1h255 wurden die Lymphknotenvolumina zu den Zeitpunkten 7, 16 und 24 dpi untersucht. Bei den frühen Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede der Lymphknotenvolumina zwischen VACV- und PBS-injizierten Mäusen

festgestellt werden. 24 dpi wurde eine signifikante Verringerung der Lymphknoten-Volumina in VACV- gegenüber PBS-injizierten Mäusen gefunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden Viren GLV-1h169 und GLV-1h255 den gleichen positiven therapeutischen Effekt auf lumbale und renale Lymphknotenmetastasen in PC3-tumortragenden Mäusen haben, wie GLV-1h68.

## 6 Referenzen

1. Pressemitteilung, M.-P.-G. BRUCE - wichtiger Gegenspieler des programmierten Zelltods (<http://www.mpg.de/490928/pressemitteilung20040716>). (2004).
2. Statistisches Bundesamt Deutschland.
3. Thoma, F. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* **18**, 6585-6598 (1999).
4. Kaufman, E.R. Replication of DNA containing 5-bromouracil can be mutagenic in Syrian hamster cells. *Mol Cell Biol* **4**, 2449-2454 (1984).
5. Weinberg, R.A. *the biology of cancer*, (Garland Science, 2007).
6. Moore, P.S. & Chang, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* **10**, 878-889 (2010).
7. Li, H.P., Leu, Y.W. & Chang, Y.S. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Res* **15**, 262-271 (2005).
8. Ziech, D., *et al.* The role of epigenetics in environmental and occupational carcinogenesis. *Chem Biol Interact* **188**, 340-349 (2010).
9. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**, 138-141 (1993).
10. Negrini, S., Gorgoulis, V.G. & Halazonetis, T.D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220-228 (2010).
11. Characteristics of Cancer Cells (<http://www.microbiologyprocedure.com/viruses-and-cancer/characteristics-of-cancer-cells.htm>).
12. Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* **7**, 737-749 (2007).
13. Suzuki, M., Mose, E.S., Montel, V. & Tarin, D. Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *Am J Pathol* **169**, 673-681 (2006).
14. Braun, S. & Pantel, K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev* **18**, 75-90 (1999).
15. Global cancer facts and figures, 2nd edition. *American Cancer Society* (2008).
16. Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314-322 (2011).
17. The Merck Manual  
(<http://www.merckmanuals.com/home/sec15/ch182/ch182h.html>).
18. American Cancer Society  
(<http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/TreatmentTypes/Surgery/surgery-and-cancer>).
19. chemotherapy.com  
([http://www.chemotherapy.com/treating\\_with\\_chemo/treating\\_with\\_chemo.html](http://www.chemotherapy.com/treating_with_chemo/treating_with_chemo.html)).
20. Strahlentherapie und Nuklearmedizin: Biologische Grundlagen  
(<http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/behandlung/strahlentherapie-biologie.php>).
21. American Cancer Society  
([http://our.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_4\\_4X\\_Androgen\\_Suppression\\_Hormone\\_Therapy\\_36.asp](http://our.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_4X_Androgen_Suppression_Hormone_Therapy_36.asp)).

22. Feldman, B.J. & Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 34-45 (2001).
23. Adams, G.P. & Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**, 1147-1157 (2005).
24. Mayo Clinic (<http://www.mayoclinic.com/health/monoclonal-antibody/CA00082/NSECTIONGROUP=2>).
25. Perry N. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis 4th edition. (2006).
26. World Health Organization (<http://www.who.int/cancer/detection/en/>).
27. Kelly, E. & Russell, S.J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **15**, 651-659 (2007).
28. G, D. The influence of complicating diseases upon leukemia. *AM J Med Sci* **127**, 563-592 (1904).
29. De Pace, N.G. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza chura chirurgica. *Ginecologia* **9**, 82-88 (1912).
30. Southam, C.M. Present status of oncolytic virus studies. *Trans N Y Acad Sci* **22**, 657-673 (1960).
31. Hoster, H., Zanes, R., von Haam, E. The association of "viral" hepatitis and Hodgkin's disease. *Cancer Res* **9**, 473-480 (1949).
32. Southam, C.M. & Moore, A.E. Clinical studies of viruses as antineoplastic agents with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer* **5**, 1025-1034 (1952).
33. Georgiades, J., Zielinski, T., Cicholska, A. & Jordan, E. Research on the oncolytic effect of APC viruses in cancer of the cervix uteri; preliminary report. *Biul Inst Med Morsk Gdansk* **10**, 49-57 (1959).
34. Asada, T. Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer* **34**, 1907-1928 (1974).
35. Vaha-Koskela, M.J., Heikkila, J.E. & Hinkkanen, A.E. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* **254**, 178-216 (2007).
36. Bilbao, R., *et al.* A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Ther* **7**, 1824-1832 (2000).
37. Ebert, O., *et al.* Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer Res* **63**, 3605-3611 (2003).
38. Fechner, H., *et al.* Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* **6**, 1520-1535 (1999).
39. Harrison, D., *et al.* Wild-type adenovirus decreases tumor xenograft growth, but despite viral persistence complete tumor responses are rarely achieved--deletion of the viral E1b-19-kD gene increases the viral oncolytic effect. *Hum Gene Ther* **12**, 1323-1332 (2001).
40. Ikeda, K., *et al.* Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant. *J Virol* **74**, 4765-4775 (2000).

41. Li, Z.Y., Ni, S., Yang, X., Kiviat, N. & Lieber, A. Xenograft models for liver metastasis: Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction. *Mol Ther* **9**, 650-657 (2004).
42. Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ni, S. & Lieber, A. Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res* **62**, 1063-1068 (2002).
43. Jain, R.K. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 149-168 (2001).
44. Minchinton, A.I. & Tannock, I.F. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**, 583-592 (2006).
45. Stohrer, M., Boucher, Y., Stangassinger, M. & Jain, R.K. Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res* **60**, 4251-4255 (2000).
46. Tanaka, T., Yamanaka, N., Oriyama, T., Furukawa, K. & Okamoto, E. Factors regulating tumor pressure in hepatocellular carcinoma and implications for tumor spread. *Hepatology* **26**, 283-287 (1997).
47. McKee, T.D., *et al.* Degradation of fibrillar collagen in a human melanoma xenograft improves the efficacy of an oncolytic herpes simplex virus vector. *Cancer Res* **66**, 2509-2513 (2006).
48. Ganesh, S., *et al.* Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice. *Cancer Res* **67**, 4399-4407 (2007).
49. Kim, J.H., *et al.* Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* **98**, 1482-1493 (2006).
50. Weibel, S., *et al.* Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection. *BMC Cancer* **11**, 68 (2011).
51. 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).
52. Haddad, D., Gentschev, I., Stritzker, J., Szalay, A.A. Cancer therapy and diagnostics (theranostics) following treatment with recombinant oncolytic vaccinia virus strains. *Res. Adv. in Biotech. & Bioengg.* **1**(2010).
53. Tulman, E.R., *et al.* Genome of horsepox virus. *Journal of virology* **80**, 9244-9258 (2006).
54. Hopkins, D.R. Princes and Peasants: Smallpox in History. *Chicago: University of Chicago Press* (1983).
55. Barquet, N., Domingo, P. Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med* **127**(8 Pt 1), 635-642 (1997).
56. Gross, C.P. & Sepkowitz, K.A. The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **3**, 54-60 (1998).
57. Willis, N.J. Edward Jenner and the eradication of smallpox. *Scott Med J* **42**, 118-121 (1997).



58. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **18**, 21-25 (2005).
59. Fenner, F., Arita, I., Ladnyi, I. Smallpox and its eradication. *World Health Organization Geneva* (1988).
60. Downie, A.W. Immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus. *Br. J. Exp. Pathol* **20**, 158–176 (1939).
61. Moss, B. *Poxviridae : the Viruses and Their Replication*, (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
62. Shen, Y. & Nemunaitis, J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* **11**, 180-195 (2005).
63. Cyrklaff, M., *et al.* Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2772-2777 (2005).
64. Grunewald, K. & Cyrklaff, M. Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography. *Curr Opin Microbiol* **9**, 437-442 (2006).
65. Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**, 48-54 (2006).
66. Dales, S. & Mosbach, E.H. Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology* **35**, 564-583 (1968).
67. Hollinshead, M., Vanderplasschen, A., Smith, G.L. & Vaux, D.J. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *Journal of virology* **73**, 1503-1517 (1999).
68. Griffiths, G., Roos, N., Schleich, S. & Locker, J.K. Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: thin-section analyses. *Journal of virology* **75**, 11056-11070 (2001).
69. Griffiths, G., *et al.* Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. *Journal of virology* **75**, 11034-11055 (2001).
70. Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M. & Smith, G.L. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *The Journal of general virology* **86**, 1279-1290 (2005).
71. Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S. & Chang, W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* **72**, 1577-1585 (1998).
72. Hsiao, J.C., Chung, C.S. & Chang, W. Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *Journal of virology* **72**, 8374-8379 (1998).
73. Hsiao, J.C., Chung, C.S. & Chang, W. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology* **73**, 8750-8761 (1999).
74. Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G. & Chang, W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of virology* **74**, 3353-3365 (2000).

75. Chung, C.S., Huang, C.Y. & Chang, W. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *Journal of virology* **79**, 1623-1634 (2005).
76. Armstrong, J.A., Metz, D.H. & Young, M.R. The mode of entry of vaccinia virus into L cells. *The Journal of general virology* **21**, 533-537 (1973).
77. Chang, A., Metz, D.H. Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells. *J. Gen. Virol.* **32**, 275– 282 (1976).
78. Dales, S. The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. *The Journal of cell biology* **18**, 51-72 (1963).
79. Earp, L.J., Delos, S.E., Park, H.E. & White, J.M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Current topics in microbiology and immunology* **285**, 25-66 (2005).
80. Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. Viral entry. *Current topics in microbiology and immunology* **285**, 1-23 (2005).
81. Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535 (2008).
82. Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. Dissecting virus entry via endocytosis. *The Journal of general virology* **83**, 1535-1545 (2002).
83. Doms, R.W., Blumenthal, R. & Moss, B. Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *Journal of virology* **64**, 4884-4892 (1990).
84. Ichihashi, Y. Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* **217**, 478-485 (1996).
85. Vanderplasschen, A., Hollinshead, M. & Smith, G.L. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *The Journal of general virology* **79** ( Pt 4), 877-887 (1998).
86. Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M. & Smith, G.L. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5989-5994 (2006).
87. Broyles, S.S. & Kremer, M. An in vitro transcription system for studying vaccinia virus early genes. *Methods in molecular biology* **269**, 135-142 (2004).
88. Boone, R.F. & Moss, B. Sequence complexity and relative abundance of vaccinia virus mRNA's synthesized in vivo and in vitro. *Journal of virology* **26**, 554-569 (1978).
89. Broyles, S.S. Vaccinia virus transcription. *The Journal of general virology* **84**, 2293-2303 (2003).
90. Paoletti, E. & Grady, L.J. Transcriptional complexity of vaccinia virus in vivo and in vitro. *Journal of virology* **23**, 608-615 (1977).
91. Sodeik, B. & Krijnse-Locker, J. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends in microbiology* **10**, 15-24 (2002).
92. Sanderson, C.M., Hollinshead, M. & Smith, G.L. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *The Journal of general virology* **81**, 47-58 (2000).

93. Ploubidou, A., *et al.* Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *The EMBO journal* **19**, 3932-3944 (2000).
94. Smith, G.L., Vanderplassen, A. & Law, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of general virology* **83**, 2915-2931 (2002).
95. Geada, M.M., Galindo, I., Lorenzo, M.M., Perdiguero, B. & Blasco, R. Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *The Journal of general virology* **82**, 2747-2760 (2001).
96. Hollinshead, M., *et al.* Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *The Journal of cell biology* **154**, 389-402 (2001).
97. Ward, B.M. & Moss, B. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *Journal of virology* **75**, 11651-11663 (2001).
98. Ward, B.M. & Moss, B. Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera. *Journal of virology* **75**, 4802-4813 (2001).
99. Payne, L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *The Journal of general virology* **50**, 89-100 (1980).
100. McFadden, G. Poxvirus tropism. *Nature reviews. Microbiology* **3**, 201-213 (2005).
101. Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. & Smith, G.L. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* **327**, 873-876 (2010).
102. Smith, G.L. & Moss, B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* **25**, 21-28 (1983).
103. 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).
104. Zhang, Q., *et al.* Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer research* **67**, 10038-10046 (2007).
105. Lin, S.F., *et al.* Oncolytic vaccinia virotherapy of anaplastic thyroid cancer in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4403-4407 (2008).
106. Lin, S.F., *et al.* Treatment of anaplastic thyroid carcinoma in vitro with a mutant vaccinia virus. *Surgery* **142**, 976-983; discussion 976-983 (2007).
107. Kelly, K.J., *et al.* Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma. *Hum Gene Ther* **19**, 774-782 (2008).
108. 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).
109. Gentschev, I., *et al.* Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Ther* **16**, 320-328 (2009).
110. Izmailyan, R. & Chang, W. Vaccinia virus WR53.5/F14.5 protein is a new component of intracellular mature virus and is important for calcium-independent

- cell adhesion and vaccinia virus virulence in mice. *Journal of virology* **82**, 10079-10087 (2008).
111. Zhang, Q., *et al.* The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation. *Molecular genetics and genomics : MGG* **282**, 417-435 (2009).
112. 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).
113. Buller, R.M., Smith, G.L., Cremer, K., Notkins, A.L. & Moss, B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**, 813-815 (1985).
114. Hengstschlager, M., *et al.* Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *J Biol Chem* **269**, 13836-13842 (1994).
115. Seubert, C.M., *et al.* Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a beta-galactosidase-activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA. *Cancer gene therapy* **18**, 42-52 (2011).
116. Wagenaar, T.R. & Moss, B. Expression of the A56 and K2 proteins is sufficient to inhibit vaccinia virus entry and cell fusion. *Journal of virology* **83**, 1546-1554 (2009).
117. Frentzen, A., *et al.* Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 12915-12920 (2009).
118. Agoulnik, A.I. *Relaxin and related proteins, S. 1 ff*, (Advances in experimental medicine and biology, 2007).
119. Bathgate, R.A., *et al.* Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem* **277**, 1148-1157 (2002).
120. Wilkinson, T.N., Speed, T.P., Tregear, G.W. & Bathgate, R.A. Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC Evol Biol* **5**, 14 (2005).
121. Bedarkar, S., Turnell, W.G., Blundell, T.L. & Schwabe, C. Relaxin has conformational homology with insulin. *Nature* **270**, 449-451 (1977).
122. Isaacs, N., *et al.* Relaxin and its structural relationship to insulin. *Nature* **271**, 278-281 (1978).
123. Eigenbrot, C., *et al.* X-ray structure of human relaxin at 1.5 Å. Comparison to insulin and implications for receptor binding determinants. *J Mol Biol* **221**, 15-21 (1991).
124. Hsu, S.Y., *et al.* Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* **295**, 671-674 (2002).
125. Bathgate, R.A., Ivell, R., Sanborn, B.M., Sherwood, O.D. & Summers, R.J. Receptors for relaxin family peptides. *Ann N Y Acad Sci* **1041**, 61-76 (2005).
126. Ivell, R. & Einspanier, A. Relaxin peptides are new global players. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 343-348 (2002).

127. Braddon, S.A. Relaxin-dependent adenosine 6',5'-monophosphate concentration changes in the mouse pubic symphysis. *Endocrinology* **102**, 1292-1299 (1978).
128. Hsu, C.J., McCormack, S.M. & Sanborn, B.M. The effect of relaxin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentrations in rat myometrial cells in culture. *Endocrinology* **116**, 2029-2035 (1985).
129. Sanborn, B.M., Kuo, H.S., Weisbrodt, N.W. & Sherwood, O.D. The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity. *Endocrinology* **106**, 1210-1215 (1980).
130. Sanborn, B.M. & Sherwood, O.D. Effect of relaxin on bound cAMP in rat uterus. *Endocrine research communications* **8**, 179-192 (1981).
131. Bartsch, O., Bartlick, B. & Ivell, R. Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod* **7**, 799-809 (2001).
132. Dessauer, C.W. & Nguyen, B.T. Relaxin stimulates multiple signaling pathways: activation of cAMP, PI3K, and PKCzeta in THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* **1041**, 272-279 (2005).
133. Ho, T.Y. & Bagnell, C.A. Relaxin induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappa B in human THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* **1041**, 314-316 (2005).
134. Ho, T.Y., Yan, W. & Bagnell, C.A. Relaxin-induced matrix metalloproteinase-9 expression is associated with activation of the NF-kappaB pathway in human THP-1 cells. *J Leukoc Biol* **81**, 1303-1310 (2007).
135. Baccari, M.C. & Bani, D. Relaxin and nitric oxide signalling. *Current protein & peptide science* **9**, 638-645 (2008).
136. Bani, D. Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen Pharmacol* **28**, 13-22 (1997).
137. Bani, D., *et al.* Relaxin up-regulates the nitric oxide biosynthetic pathway in the mouse uterus: involvement in the inhibition of myometrial contractility. *Endocrinology* **140**, 4434-4441 (1999).
138. Bani, D., *et al.* Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension* **31**, 1240-1247 (1998).
139. Danielson, L.A., Sherwood, O.D. & Conrad, K.P. Relaxin is a potent renal vasodilator in conscious rats. *J Clin Invest* **103**, 525-533 (1999).
140. Failli, P., *et al.* Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *FASEB J* **16**, 252-254 (2002).
141. AgoulNIK, A.I. *Relaxin and related proteins*, S.26, (Advances in experimental medicine and biology, 2007).
142. AgoulNIK, A.I. *Relaxin and related proteins*, S. 34 ff, (Advances in experimental medicine and biology, 2007).
143. Conrad, K.P. Unveiling the vasodilatory actions and mechanisms of relaxin. *Hypertension* **56**, 2-9 (2010).
144. AgoulNIK, A.I. *Relaxin and related proteins*, S.49, (Advances in experimental medicine and biology, 2007).

145. Hansell, D.J., Bryant-Greenwood, G.D. & Greenwood, F.C. Expression of the human relaxin H1 gene in the decidua, trophoblast, and prostate. *J Clin Endocrinol Metab* **72**, 899-904 (1991).
146. Ivell, R., Hunt, N., Khan-Dawood, F. & Dawood, M.Y. Expression of the human relaxin gene in the corpus luteum of the menstrual cycle and in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* **66**, 251-255 (1989).
147. Sokol, R.Z., Wang, X.S., Lechago, J., Johnston, P.D. & Swerdloff, R.S. Immunohistochemical localization of relaxin in human prostate. *J Histochem Cytochem* **37**, 1253-1255 (1989).
148. Winslow, J.W., *et al.* Human seminal relaxin is a product of the same gene as human luteal relaxin. *Endocrinology* **130**, 2660-2668 (1992).
149. Alberts, B.J., A.; Lewis, J. *et al.* *Molecular Biology of the Cell, 4th edition Bookshelf ID: NBK26810*, (Garland Science, 2002).
150. Hisaw, F.L. Experimental relaxation of the pubic ligament of guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **23**, 661-663 (1926).
151. Fevold, H.L.H., F.L.; Meyer, R.K. The relaxative hormone of corpus luteum. Its purification and concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 3340-3348 (1930).
152. Samuel, C.S., *et al.* Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney international* **65**, 2054-2064 (2004).
153. Zhao, L., *et al.* Mice without a functional relaxin gene are unable to deliver milk to their pups. *Endocrinology* **140**, 445-453 (1999).
154. Zhao, L., Samuel, C.S., Tregear, G.W., Beck, F. & Wintour, E.M. Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod* **63**, 697-703 (2000).
155. Binder, C., Hagemann, T., Husen, B., Schulz, M. & Einspanier, A. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases. *Mol Hum Reprod* **8**, 789-796 (2002).
156. Binder, C., *et al.* Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **87**, 157-166 (2004).
157. Feng, S., *et al.* Relaxin promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* **13**, 1695-1702 (2007).
158. Hombach-Klonisch, S., *et al.* Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* **169**, 617-632 (2006).
159. Thompson, V.C., *et al.* Relaxin becomes upregulated during prostate cancer progression to androgen independence and is negatively regulated by androgens. *Prostate* **66**, 1698-1709 (2006).
160. Radestock, Y., Hoang-Vu, C. & Hombach-Klonisch, S. Relaxin downregulates the calcium binding protein S100A4 in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* **1041**, 462-469 (2005).
161. Radestock, Y., Hoang-Vu, C. & Hombach-Klonisch, S. Relaxin reduces xenograft tumour growth of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **10**, R71 (2008).
162. Rho, Y.S. & Min, G. Relaxin does not influence the growth of human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells in culture. *Ann N Y Acad Sci* **1041**, 470-480 (2005).

163. Nagase, H. & Woessner, J.F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494 (1999).
164. Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174 (2002).
165. Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52-67 (2010).
166. Ribatti, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leuk Res* **33**, 638-644 (2009).
167. Heljasvaara, R., *et al.* Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res* **307**, 292-304 (2005).
168. Hamano, Y., *et al.* Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* **3**, 589-601 (2003).
169. Nyberg, P., Xie, L. & Kalluri, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* **65**, 3967-3979 (2005).
170. Deryugina, E.I. & Quigley, J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 9-34 (2006).
171. Pozzi, A., *et al.* Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2202-2207 (2000).
172. Kupferman, M.E., *et al.* Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* **157**, 1777-1783 (2000).
173. Li, Z., *et al.* Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood* **113**, 5423-5433 (2009).
174. Donat, U. Detektion und Therapie von Metastasen des humanen Prostatakarzinoms durch das onkolytische Vaccinia-Virus GLV-1h68. (2011).
175. Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E.V. & Barry, M.A. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat Rev Microbiol* **6**, 529-540 (2008).
176. 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).
177. 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).
178. 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).
179. Wong, R.J., *et al.* Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum Gene Ther* **12**, 253-265 (2001).
180. Kohsaka, T., *et al.* Evidence for immunoreactive relaxin in boar seminal vesicles using combined light and electron microscope immunocytochemistry. *Journal of reproduction and fertility* **95**, 397-408 (1992).
181. Weiss, G. Relaxin in the male. *Biol Reprod* **40**, 197-200 (1989).

182. Patil, D.P.K., G.C. MMP-9 (matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa type IV collagenase). in *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. (2006).
183. Xu, J., *et al*. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* **109**, 363-368 (2004).
184. Schafer, M. & Werner, S. Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 628-638 (2008).
185. Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650-1659 (1986).
186. Belaouaj, A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect* **4**, 1259-1264 (2002).
187. Watanabe, H., Hattori, S., Katsuda, S., Nakanishi, I. & Nagai, Y. Human neutrophil elastase: degradation of basement membrane components and immunolocalization in the tissue. *J Biochem* **108**, 753-759 (1990).
188. Janeway, C.A.T., P.; Walport, M.; Shlomchick, M.J. *Immunobiology, 6th edition*, (Churchill Livingstone, 2005).
189. Pollard, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**, 71-78 (2004).
190. Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein engineering* **12**, 1035-1040 (1999).
191. Bergelson, J.M., *et al*. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323 (1997).
192. Reddy, P.S., Ganesh, S. & Yu, D.C. Enhanced gene transfer and oncolysis of head and neck cancer and melanoma cells by fiber chimeric oncolytic adenoviruses. *Clin Cancer Res* **12**, 2869-2878 (2006).
193. Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. & Way, M. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* **378**, 636-638 (1995).
194. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* **6**, 449-458 (2006).
195. Weigelt, B., Peterse, J.L. & van 't Veer, L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* **5**, 591-602 (2005).



## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

%	Prozent
β	beta
μ	mikro
A	Ampère
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	centi
ca.	circa
CMC	Carboxymethylcellulose
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
d	Tag, Tage
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post infection</i>

---

ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virus</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Beschleunigung
GAG	Glycosaminoglykan
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GusA	β-Glucoronidase
h	Stunde, Stunden
hpi	Stunden post Infektion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IEV	<i>intracellular enveloped virus</i>
IMV	<i>intracellular mature virus</i>
i.v.	intravenös
Jhd.	Jahrhundert
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LacZ	β-Galaktosidase
M	Molare Masse
m	milli, Meter
Mg	Magnesium
MHC II	Major Histocompatibility Complex Class II

---

---

min	Minute
Mio.	Millionen
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MV	<i>mature virus</i>
n	Nano
P	Phosphat
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming unit</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RUC	Renilla-Luciferase
rVACV	rekombinantes Vaccinia-Virus
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidin-Kinase
ü.N.	über Nacht
V	Volt

---

v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Danksagung

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. Szalay für die interessante Aufgabenstellung, die fachliche Unterstützung und für die Bereitstellung des Stipendiums während der gesamten Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Grummt für die Unterstützung und konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Krohne bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an Jochen für die tolle Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen. Außerdem hatte er immer eine Idee mit wem man sich in Kontakt setzen kann, wenn mal eine Methode nicht im Labor durchgeführt werden konnte. Besonders möchte ich auch Stefi für großartige Unterstützung bei experimentellen Fragen und bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Ich möchte mich bei meinen lieben Kollegen Johanna, Julie, Rike, Caro, Barbara, Micha, Lorenz, Sandeep, Marion, Elisabeth, Susanne, Anna, Elli, Ivo, Rafael, Stefan, Lisa, Klaas, Viki, Ting, Juliane, Meike, Christina und Prisca für die schöne und oft auch lustige Zusammenarbeit, auch wenn sie bei manchen nur kurz war, ganz herzlich bedanken. Besonders möchte ich Johanna für die Hilfe bei der Histologie und natürlich für die super Organisation im Labor danken. Ich möchte Rike und Julie für die Hilfe im Labor, besonders bei der Arbeit mit den Mäusen und für die Tipps und Ratschläge wenn es mal geklemmt hat danken. Barbara danke ich für die vielen guten Tipps für alle möglichen Techniken im Labor und für die tatkräftige Unterstützung. Micha möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit danken und Caro für die vielen Ratschläge bei der Proteinarbeit.

Für die sorgsame und zuverlässige Pflege der Mäuse möchte ich ganz besonders Marion und Rafael danken. Aber natürlich auch Juliane und Meike für das Autoklavieren der Käfige.

Die C33A-Zelllinie wurde freundlicherweise von Frank Stubenrauch, UKT der Eberhard-Karls Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

Ich danke Tony Yu, Qian Zhang, Nanhai Chen, Terry Trevino, Jason Aquilar, Camha Hoang, Kim Duffy und allen weiteren Mitarbeitern der Firma Genelux. Besonders danke ich Tony, Qian, Nanhai und Jason für die Konstruktion und Bereitstellung der Viruskonstrukte.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Fischer und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie danken, besonders auch Frau Kießling für die Unterstützung in allen organisatorischen Dingen.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben, vor allem auch wenn es mal nicht so gut lief.

### **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 \_\_\_\_\_

---

(Simon Schäfer)

## 9 Publikation

- Vaccinia virus-mediated intra-tumoral expression of matrix metalloproteinase 9 enhances oncolysis of PC-3 xenograft tumors, Schäfer *et al.*, submitted to BMC Cancer