
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie

Onkolytische Virotherapie:

Virus-vermittelte Expression von MCP-1 oder β -Galaktosidase in Vaccinia-Virus-kolonisierten Tumoren führt zu einer erhöhten Tumorregression



Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Carolin Seubert

aus Schweinfurt

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. T. Dandekar

Erstgutachter:

Prof. Dr. A.A. Szalay

Zweitgutachter:

Prof. Dr. G. Krone

Gesundheit ist nicht alles,
aber ohne Gesundheit ist alles nichts.

Arthur Schopenhauer

**Meinem Freund Carlo
und meiner Familie**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Karzinogenese und traditionelle Therapiekonzepte	1
1.2 Neuartige Therapieansätze in der Onkologie: Onkolytische Viren	3
1.2.1 Historischer Hintergrund	3
1.2.2 Biologische Prinzipien der Virustherapie	4
1.3 Das Vaccinia Virus	5
1.3.1 Das Vaccinia Virus – ein geeigneter Kandidat für onkolytische Virustherapie	6
1.3.2 Taxonomie der Poxviridae	6
1.3.3 Morphologie des Vaccinia Virus	7
1.3.4 Lebenszyklus von Vaccinia Viren	8
1.4 Verstärkung der onkolytischen Effekte von Vaccinia Viren	9
1.4.1 Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)	10
1.4.2 Gezielte Beeinflussung des Chemokin-Netzwerks und Generierung einer anti-Tumor-Immunantwort.....	12
1.4.2.1 Klassifizierung, Struktur und allgemeine Funktionen der Chemokine.....	14
1.4.2.2 Chemokin-Rezeptor-Interaktionen	16
1.4.2.3 Das Chemokin MCP-1	17
1.4.2.4 MCP-1-Expression und pleiotrope Tumor-Effekte	19
1.5 Aspekte der Immuntherapie bei Krebs	20
1.5.1 Die „Cancer Immunosurveillance-Theorie“	21
1.5.2 Das Ying-Yang der tumorassoziierten Makrophagen (TAMs)	23
1.6 Aufgabenstellung	26
2. Materialien	27
2.1 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Enzyme	27
2.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	31
2.3 Verwendete Kits	35
2.4 Zellkulturmedien und verwendete Zelllinien	35
2.4.1 Zelllinien	35
2.4.2 Zellkulturmedien	36
2.5 Verwendete Antikörper	38
2.6 Rekombinante Virusstrukture	39
2.7 Verwendetes Prodrug	40
2.8 Geräte und sonstige Materialien	41
2.9 Versuchstiere	43

2.10 Software	44
<u>3. Methoden</u>	<u>45</u>
3.1 Zellbiologische Methoden	45
3.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzellen	45
3.1.1.1 Kultivierung von CV-1-Zellen	45
3.1.1.2 Kultivierung von GI-101A-Zellen	46
3.1.1.3 Kultivierung von MDA-MB-231-CBG-Zellen	46
3.1.1.4 Kultivierung von HT-29-CBG-Zellen.....	46
3.1.1.5 Kultivierung von J774-Zellen	47
3.1.1.6 Kultivierung von L-929-Zellen zur Gewinnung von L929-konditioniertem Medium	47
3.1.1.7 Isolation und Kultivierung primärer Knochenmarksmakrophagen.....	47
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	48
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	48
3.1.4 Mycoplasmen-Nachweis in Zellkulturen	49
3.1.5 MTT-Proliferations-Assay.....	49
3.2 Virologische Techniken	49
3.2.1 Infektion von Säugerzellen mit Vaccinia-Viren	49
3.2.2 Virusamplifikation und Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten.....	50
3.2.3 Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay	51
3.2.4 Analyse des viralen Replikationsverhaltens in Zellen	52
3.3 Protein-chemische Analysemethoden	52
3.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen	52
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	53
3.3.3 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE) ..	53
3.3.4 Western-Blot: Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen.....	55
3.3.5 Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran	56
3.3.6 Immundetektion mittels ECL-Methode	56
3.3.7 Quantifizierung der MCP-1 Expression mit Hilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	58
3.3.8 Nachweis der Expression sowie der enzymatischen Aktivität des Markerproteins β -Galactosidase	59
3.4 Immunhistochemische Methoden	60
3.4.1 Immunhistochemische Detektion der MCP-1-Expression in infizierten Säugerzellen... 60	60
3.4.2 Immunhistochemische Detektion der MCP-1 Expression in Vaccinia-Virus-infizierten Tumorgewebe	60
3.4.3 Histologie	61

3.5 Nachweis der Genexpression rekombinanter Vaccinia-Viren mittels RNA- und DNA-analytischer Methoden	65
3.5.1 Analyse der Transkription verschiedener Markergene mittels RT-PCR.....	65
3.5.2 RNA-Isolierung aus Säugerzellen	65
3.5.3 DNase-Verdau und Konzentrationsbestimmung	66
3.5.4 cDNA-Synthese.....	66
3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	66
3.5.6.1 Expressionsanalyse mittels RT-PCR	67
3.5.6.2 Analyse der DNA-Proben in Agarose-Gelen	68
3.6 Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten Chemokins MCP-1	68
3.6.1 Untersuchung der Expression des Proteins CD14.....	68
3.6.2 Untersuchung der Expression des Cytokins Tumor Nekrose Faktor- α	69
3.7 Tierexperimentelle Untersuchungen	71
3.7.1 Implantation von humanen Tumorzellen	71
3.7.2 Intravenöse Injektion von rekombinanten Vaccinia Viren	71
3.7.3 Tumor- und Organentnahme.....	72
3.7.4 Herstellung von Protein-Lysaten aus Tumorgewebe und Organen	72
3.7.5 Quantifizierung der MCP-1 Expression in Tumorgewebe und Organen	72
3.7.6 Untersuchung der viralen Replikation im Tumorgewebe und Organen	73
3.7.8 <i>real-time</i> Monitoring der viralen Replikation mittels Bioluminescence Imaging Technologie.....	73
<u>4. Ergebnisse.....</u>	75
4.1 Verstärkung der onkolytischen Effekte mittels „gene-directed prodrug therapy“ im humanen Brustkrebskarzinom-Model GI-101A	75
4.1.1 <i>In-vitro</i> Charakterisierung der rekombinanten Vaccinia Viren GLV-1h68 und GLV-1h43	75
4.1.2 Untersuchung des Wirkungsmechanismus des β -Galactosidase-aktivierbaren Prodrugs.....	79
4.1.3 Die Wirkung Prodrug-aktivierender Zellen auf Nachbarzellen - Der Bystander Effekt..	82
4.1.4 Onkolytische Effekte von rVACV nach Behandlung mit einem enzymatisch aktivierbaren Prodrug	84
4.1.5 Effekte von Prodrug-Behandlung auf die Kolonisierung von Tumoren mit Vaccinia Viren	87

4.2 Immuntherapie durch Einsatz von rVACV GLV-1h80 – Gezielte Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks	90
4.2.1 Analyse und Vergleich des Replikationsverhaltens der rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80	91
4.2.2 Detektion und Quantifikation der MCP-1-Expression in Tumorzellen	99
4.2.3 Lokalisation der Expression von MCP-1 in Tumorzellen.....	108
4.2.4 Untersuchung der funktionellen Aktivität von rekombinantem MCP-1	116
<u>5. Diskussion</u>	<u>127</u>
5.1 Verstärkung der onkolytischen Effekte mittels gene-directed prodrug therapy im humanen Brustkrebskarzinom-Model GI-101A	127
5.2 Immuntherapie durch Einsatz des rVACV GLV-1h80 – Gezielte Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks	131
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>139</u>
<u>7. Anhang.....</u>	<u>154</u>
7.1 Abkürzungsverzeichnis	154
7.2 Primersequenzen	156
7.3 Danksagung.....	157
7.4 Eidesstattliche Erklärung	159
<u>8. Curriculum Vitae</u>	<u>160</u>
<u>9. Publikationen.....</u>	<u>161</u>

Zusammenfassung

Ungeachtet der enormen Entwicklung in Krebsdiagnostik und -Therapie in den letzten Jahren, sind vollständige Heilungsaussichten weiterhin gering und die aktuellen Behandlungsmethoden oftmals mit schwerwiegenden Nebeneffekten verbunden. Aufgrund dessen sind alternative Behandlungsmethoden unbedingt erforderlich und führten zu einer zunehmenden Bedeutung des Vaccinia-Virus als onkolytisches Virus in der Krebstherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei mögliche Therapieansätze zur Verstärkung der onkolytischen Effekte in humanen Tumormodellen untersucht. Die Kombination einer gene-directed enzyme prodrug Therapie (GDEPT) mit dem onkolytischen Vaccinia-Virus GLV-1h68 sollte zur Selektivitätssteigerung eines β -Galaktosidase-aktivierbaren, cytotoxisch-aktiven Drugs führen. Darüber hinaus diente das für MCP-1 codierende Vaccinia-Virus GLV-1h80, zielend auf eine Cytokin-vermittelten Immuntherapie, als Vektor zur spezifischen Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks.

Im Zuge der GDEPT wurde in dieser Arbeit ein, durch enzymatische Deglykosylierung aktivierbares Prodrug, basierend auf dem cytotoxischem Antibiotikum Duocarmycin SA verwendet. Durch eine Infektion mit GLV-1h68 und einer resultierenden Expression des aktivierenden Enzyms β -Galaktosidase, sollte eine Umwandlung des Prodrugs in ein cytotoxisches Drug erfolgen. *In vitro* Infektionsstudien zeigten ein nahezu identisches Replikationsverhalten des Vaccinia-Virus GLV-1h68 und des als Kontrollvirus dienenden rVACV GLV-1h43 in humanen GI-101A-Brustkrebszellen. Die Expression der beiden Reporter-Gene Ruc-GFP sowie β -Galaktosidase konnten auf Protein-Ebene und mittels RT-PCR nach Infektion mit GLV-1h68 nachgewiesen werden. GLV-1h43-Infektion von GI-101A-Zellen führte zu GFP-Expression, jedoch nicht zur Expression des Enzyms β -Galaktosidase. Untersuchung der Enzym-Aktivität in Zelllysaten und Zellkultur-Überständen zeigten nach Infektion mit GLV-1h68 steigende Menge zellulär assoziierter und freier β -Galaktosidase. Des Weiteren wurde durch Koinkubation von GI-101A-Zellen mit Virus-freien, β -Galaktosidase-haltigen Zelllysaten bzw. -überständen und Prodrug eine Aktivierung des Prodrugs durch das Virus-codierte Enzym nachgewiesen. Diese Koinkubation führte zur Abtötung der Zellen. Nach Inkubation mit Proben mock- oder GLV-1h43-infizierter Zellen konnte keiner Veränderung der Proliferationsrate von GI-101A-Zellen gefunden werden. Kombinierte Behandlung von GI-101A-Zellen mit Viren des Stammes GLV-1h68 und Prodrug führte zu starken Synergieeffekten bei der Abtötung der Zellen und wies einen Bystander Effekt der Kombinationstherapie nach. Dieser konnte in 4 weiteren humanen und 2 Hunde-Brustkrebszellen bestätigt werden. Der erzielte Bystander-Effekt zeigt, dass es nach Virus-induzierter β -Galaktosidase-Expression in GLV-1h68-infizierten Zellen zu einer

enzymatischen Spaltung des Prodrugs in das cytotoxische seco-Analogon des Antibiotikums Duocarmycin SA kommt. Durch die Membrangängigkeit des Drugs konnte auch in angrenzenden uninfizierten Zellen eine Wirkung erzielt werden. Anhand von Expressionsanalysen an Apoptose-assoziierten Proteinen, wie PARP und Caspasen, wurde eine Wirkung des Prodrugs über den intrinsischen Apoptose-Signalweg nachgewiesen.

In athymischen Nude-Mäusen durchgeführte Replikationsanalysen und X-Gal-Färbungen GLV-1h68-infizierter Tumore nach Prodrug-Behandlung zeigten, dass GLV-1h68 ungeachtet der simultanen Behandlung mit Prodrug im Tumorgewebe repliziert und es nicht zur Anreicherung *lacZ*-negativer Virusmutanten kommt. Es konnten, durch Prodrug-Behandlung und einer simultanen Expression aktiver β -Galaktosidase, starke synergistische Effekte und eine signifikante Steigerung der Tumorregression erzielt werden. Da die Kombinationstherapie zu keinerlei Unterschieden in Gewicht und Gesundheitszustand behandelter Versuchstiere führte, konnte eine systemische Toxizität außerhalb des Tumorgewebes ausgeschlossen werden.

Verschiedene Zelllinien weisen Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber der onkolytischen Aktivität von Vaccinia-Virus GLV-1h68 auf. Während einige Zelllinien trotz Virus-Behandlung unverändertes Proliferationsverhalten zeigen (*non-* oder *poor-responder*), führt diese Behandlung in anderen Zelllinien zu einer vollständigen Tumorregression (*responder*). In Anbetracht dieser Unterschiede wurden in dieser Arbeit die Effekte einer induzierten Expression des murinen Chemokins MCP-1 in GI-101A-Tumoren (*responder*) und HT29-CBG-Tumoren (*poor-responder*) untersucht. MCP-1 zeichnet sich durch seine chemotaktischen Eigenschaften gegenüber mononukleärer Zellen aus und führt zu pleiotropen Tumor-Effekten. Replikationsstudien am Virus GLV-1h80 und des als Kontrollvirus dienenden rVACV GLV-1h68 zeigten, dass aus der Expression des Fremd-Gens *mcp-1* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keinerlei negative Effekte auf das Replikationsverhalten in humanen GI-101A- und HT29-CBG-Zellen resultieren. Durch Real-time Monitoring der GFP-Expression im Tumorgewebe lebender Tiere konnte zunächst eine mit dem Infektionsverlauf zunehmende Signalstärke beobachtet werden, welche dann 42 dpi an Intensität verlor. Toxizität und schädliche Nebeneffekte durch Infektion mit den beiden rVACV konnten anhand der viralen Titer in den Organen der Maus ausgeschlossen werden. Die Titer wiesen auf eine ausschließlich auf das Tumorgewebe begrenzte Replikation der Viren nach Injektion in Tumor-tragende Tiere hin. Die Expression des Chemokins MCP-1 wurde sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene in GLV-1h80-infizierten Zellen und im Tumorgewebe GLV-1h80-injizierter Mäuse nachgewiesen. Nach Infektion mit GLV-1h80 konnte eine mit dem Infektionsverlauf zunehmende MCP-1-Expression gezeigt werden. Dabei wurde zudem deutlich, dass nicht nur eine GLV-1h80-

Infektion *in vivo* zu einer Zunahme der intratumoralen MCP-1-Expression führte, sondern eine Vaccinia-Virus-Infektion allein einen Anstieg des Chemokins zu bewirken vermag. Eine Quantifizierung durch ELISA machte Konzentrationsunterschiede von MCP-1 zwischen den Tumormodellen GI-101A und HT29-CBG deutlich. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte eine GLV-1h80-Infektion zu deutlich niedrigeren Konzentrationen im HT29-CBG-Kolon-Adenokarzinommodell. Ein Nachweis murinen MCP-1 in Blutseren Tumor-tragender Tiere zeigte eine für therapeutische Effekte erwünschte systemische Freisetzung des intratumoral durch die Infektion mit GLV-1h80 gebildeten Chemokins MCP-1. Durch immunhistologische Untersuchungen GLV-1h80-infizierter Zellen und Tumoren konnte diese, mit dem Infektionsverlauf zunehmende MCP-1-Expression bestätigt werden. Die funktionelle Aktivität des rekombinanten Proteins wurde anhand TNF- α -spezifischer ELISA-Analysen überprüft. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression dieses proinflammatorischen Cytokins in GI-101A-Tumoren nach Infektion mit GLV-1h80. Dagegen konnte keine Steigerung der Expression im HT29-CBG-Tumorgewebe nachgewiesen werden. Ein Nachweis des durch proinflammatorische Immunzellen exprimierten Oberflächenproteins CD14 zeigte ebenfalls einen Anstieg nach Infektion mit GLV-1h80. Auch diese veränderte Expression blieb im *poor-Responder*-Modell HT29-CBG aus. Die steigende intratumorale Expression der beiden Proteine in GI-101A-Tumoren nach GLV-1h80-Infektion lässt auf eine Zunahme proinflammatorischer Immunzellen, basierend auf einer Virus-induzierten MCP-1-Expression schließen. Ein Monitoring der Tumorprogression nach Implantation von GI-101A-Zellen und Injektion der rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 bzw. einer PBS-Injektion führte nach einer anfänglichen Zunahme des Tumorwachstums schließlich bei beiden Viren zu einer Tumorregression. Jedoch konnte durch die GLV-1h80-vermittelte MCP-1-Expression eine Verstärkung der onkolytischen Effekte erzielt werden, welche sich durch eine signifikante Abnahme des Tumolvolumens zeigte. Im HT29-CBG-Modell führten die therapeutischen Effekte durch rVACV GLV-1h80 zwar zu keiner Regression des Tumors, jedoch zeigte sich auch in diesem humanen Tumormodell eine Verstärkung der onkolytischen Effekte nach GLV-1h80-Infektion im Vergleich zu einer GLV-1h68-Behandlung. Durch die GLV-1h80-induzierte Expression des Chemokins MCP-1 konnte somit eine Hemmung des Tumorwachstums auch im *poor-Responder*-Modell HT29-CBG erzielt werden.

Sowohl die Verwendung eines β -Galaktosidase-aktivierbaren Prodrugs im Zuge einer GDEPT, als auch die Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks durch Expression des Chemokins MCP-1 führten in dieser Arbeit zu positiven Synergismus-Effekten in der onkolytischen Virustherapie. Durch künftige Konstruktion eines rVACV, welches sowohl die Expression des Chemokins MCP-1, als auch des prodrug-aktivierenden Enzyms β -Galaktosidase im Tumorgewebe induziert, könnte in Kombination mit einer Prodrug-Behandlung eine zusätzliche Verstärkung der Effekte erzielt und möglicherweise

eine erfolgreiche Virustherapie in bisher schwach ansprechenden *poor-* bzw. *non-Responder*-Modellen ermöglicht werden.

Summary

Irrespective of enormous developments in cancer diagnostics and therapy in the last few years, complete recovery from cancer still occurs rarely. Moreover, conventional therapy is attendant on unspecific side effects. Consequently, novel, well-tolerated and more efficient therapies are required in order to reduce the number of cancer-related deaths. Among several strategies to improve currently applied treatments, the use of oncolytic viruses may turn out to be a highly promising therapeutic approach.

In this thesis two different therapeutic approaches were investigated to enhance oncolytic effects of vaccinia virus in human xenografts. First, the *lacZ*-carrying oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 was used in combination with a β -galactosidase activatable prodrug to increase selectivity of a cytotoxic drug. Second, based on a cytokine-mediated immunotherapy, MCP-1-encoding vaccinia virus GLV-1h80 was used as a vector with a specific impact on the intratumoral chemokine network.

In the first approach, an enzymatic activatable prodrug, based on a cytotoxic seco-analogue of the antibiotic duocarmycin SA was used for gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). An activation of the cytotoxic prodrug was to be achieved by infection with GLV-1h68 and the resulting expression of the prodrug activating enzyme β -galactosidase. Cell culture experiments revealed a comparable replication rate of GLV-1h68 and of the control virus strain GLV-1h43 lacking the *lacZ* gene insert. Expression of the reporter genes *Ruc-GFP* and *β -galactosidase* after infection of GI-101A cells with GLV-1h68 was proven on the protein level and by RT-PCR. Infection of cells with GLV-1h43 resulted in GFP-expression only, confirming the absence of *lacZ* in GLV-1h43. Analysis of β -galactosidase concentrations in cell lysates and supernatants revealed an increase of the enzyme during infection of GLV-1h68. Activation of the prodrug by the virus-encoded enzyme was achieved by co-incubation of GI-101A-cells with virus-depleted, β -galactosidase-containing cell lysates or supernatants and prodrug. This co-incubation resulted in killing of GI-101A cells. Conversely, incubation with samples obtained from mock- or GLV-1h43-infected cells and prodrug did not change overall survival of GI-101A-cells.

In order to find out whether an additional effect could be achieved in neighboring uninfected cells, called bystander effect, GLV-1h68-infected cells were treated with prodrug. This experiment demonstrated strong synergistic effects in terms of cell killing. Similar results were obtained with 4 other human and with 2 canine breast cancer cell lines. The achieved bystander effect revealed that upon GLV-1h68 infection the virus-mediated β -galactosidase-

expression resulted in enzymatic cleavage of the prodrug and release of the cytotoxic drug. Furthermore it proved the ability of the activated drug to penetrate cell membranes. Expression analysis on apoptosis-associated proteins, e.g. PARP and caspases, revealed induction of apoptosis via the intrinsic pathway after prodrug activation in GLV-1h68-infected cells.

In vivo replication analysis and X-Gal staining of GLV-1h68-infected tumors revealed that GLV-1h68 can replicate within tumor tissue and no enrichment of mutants in *lacZ* occurred, regardless of simultaneous prodrug treatment. Thus, prodrug treatment and expression of β -galactosidase resulted in synergistic effects leading to significantly enhanced tumor regression. Since no sign of malaise or weight loss was observed in prodrug-treated mice when compared to the respective control mice, we concluded that no toxic side effects occurred and active β -galactosidase released from the tumor was negligible.

Different human cell lines reveal varied sensitivity to the oncolytic activity of vaccinia virus GLV-1h68, some cell lines continue growth (non- or poor-responder), while others show complete regression (responder). Considering these differences, the second aspect of this thesis was the analysis of the chemokine MCP-1 in GI-101A-xenografts (responder) and in the poor-responding HT29-CBG tumors. MCP-1 is characterized by chemotactic properties against mononuclear cells and has pleiotropic effects on cancer. Replication studies on GLV-1h80 and the control virus strain GLV-1h68 revealed that expression of the inserted *mcp-1*-gene had no negative effects on viral replication *in vitro* as well as *in vivo* in human GI-101A- or HT-29-CBG-cells. Real-time monitoring of GFP-expression in tumors of infected mice showed increasing amounts of GFP in tumors during the infection process until 21 dpi, followed by a decrease in intensity to 42 dpi. By determining the viral titers in organs of infected mice, toxicity and harmful side effects resulting from infection with both virus strains were excluded. The viral titers demonstrate, that viral replication occurs exclusively in tumor tissue. Expression of MCP-1 in GLV-1h80-infected cells and tumors was detected on transcriptional as well as on translational level. The concentration of the chemokine increased during infection of GLV-1h80. Additionally, the increase of intratumoral MCP-1-concentrations was not only limited on GLV-1h80-infected tumors. On the contrary, vaccinia virus infection itself resulted in increasing amounts of this chemokine. Quantifying MCP-1-expression by ELISA assay revealed differences in concentrations between tumors derived from GI-101A and HT-29-CBG cells. In case of the HT-29-CBG coloncarcinoma, infection with GLV-1h80 resulted in lower concentrations of MCP-1 *in vitro* as well as *in vivo*. Confirmation of murine MCP-1 in blood samples of tumor-bearing mice revealed a systemic release of intratumoral MCP-1 predicated on the infection with GLV-1h80. This systemic

release is required for therapeutic effects. The increased expression of MCP-1 in GLV-1h80-infected cells and tumors during infection was verified by immunohistochemical analysis. Functional activity of the recombinant protein was checked by a TNF- α -specific ELISA assay, demonstrating increased expression of this proinflammatory cytokine in GI-101A tumors after infection with GLV-1h80. In contrast, no increase was observed in HT-29-CBG tumors. Likewise, the quantification of proinflammatory expressed surface protein CD14 showed higher concentrations in GI-101A-tumors after GLV-1h80-infection. Again, this increase was missing in xenografts of poor-responder HT-29-CBG. The increased expression of these two proteins in GI-101A xenografts after GLV-1h80-infection suggested an accumulation of proinflammatory immune cells, resulting from virus-mediated MCP-1-expression. Moreover, monitoring of tumor progression after implantation of GI-101A cells revealed an initially swelling of the tumors, followed by enhanced tumor regression after infection with GLV-1h80, as well as after GLV-1h68-infection. However, GLV-1h80-mediated MCP-1 expression resulted in an enhancement of oncolytic effects, followed by significant reduced tumor volumes compared to GLV-1h68-colonized tumors. In case of HT-29-CBG tumors MCP-1 induced indeed no regression of tumors. However, even in this poor-responding tumors oncolytic effects could be amplified by GLV-1h80 infection. Hence, inhibition of tumor growth in poor-responder model HT-29-CBG could be achieved by GLV-1h80-induced expression of the chemokine MCP-1.

Taken together, both, the use of a β -galactosidase activatable prodrug in GDEPT and the modulation of the intratumoral chemokine network by expression of MCP-1 resulted in positive synergistic effects during oncolytic virus therapy. Future construction of a recombinant VACV, co-expressing the prodrug-activating enzyme β -galactosidase as well as MCP-1 in tumor tissue has the potential to induce even stronger synergistic effects and might also lead to a more efficient treatment of up to now poor- or non-responding tumors.

1. Einleitung

1.1 Karzinogenese und traditionelle Therapiekonzepte

Krebserkrankungen sind, nach Erkrankungen des Herzens, die zweithäufigste Todesursache und nahmen im Jahr 2006 einen Anteil von 23,1% aller Todesfälle in den USA ein [1]. Dabei ist Lungenkrebs die häufigste krebsverursachte Todesursache, gefolgt von Brustkrebs bei den Frauen sowie Krebserkrankungen der Prostata bei den Männern. Laut American Cancer Society werden allein in den USA im Jahr 2009 1,5 Millionen neue Erkrankungen hinzukommen.

Unter dem allgemeinen Begriff Krebs versteht man eine Gruppe von mehr als 100 verschiedenen Erkrankungen, denen eine unkontrollierte Zellteilung sowie erhöhte Migrationsfähigkeiten dieser Zellen zugrunde liegen. Hierbei können die verschiedenen Erkrankungen in grobe Kategorien eingegliedert werden. Krebsarten, welche in Haut oder Epithelien der Organe beginnen werden als Karzinome bezeichnet wohingegen Sarkome ihren Ursprung in Knochen, Knorpel, Blutgefäßen, Muskel oder Stütz- und Bindegewebe haben. Als Leukämien werden sämtliche Krebserkrankungen des blutbildenden Gewebes, zum Beispiel des Knochenmarks bezeichnet. Lymphome und Myelome sind Erkrankungen von Immunzellen.

All diesen verschiedenen Krebsarten liegt immer eine genetische Veränderung einzelner Zellen zugrunde, die meist schon viele Jahre vor der eigentlichen Detektion der Erkrankung stattfindet. Diese Mutationen erfolgen oftmals in 2 spezifischen Hauptgenklassen, den Proto-Onkogenen und den Tumor-Suppressor-Genen. Durch Mutationen und dadurch verbundene vermehrte Aktivierung können Proto-Onkogene zu karzinogenen Onkogenen transformiert werden. Tumor-Suppressor-Gene dagegen tragen durch mutationsbedingte Inaktivierung zur Krebsentstehung bei, indem zum Beispiel wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus gestört werden. Durch Anhäufung solcher Mutationen und durch Fehler in den DNA-Reparaturmechanismen kann es schließlich zu einer Krebserkrankung kommen.

Die möglichen Ursachen derartiger Mutationen sind sehr vielseitig und reichen von chemischen Karzinogenen, wie zum Beispiel Tabakrauch, über ionisierende Strahlung, hormonellen Schwankungen bis hin zu erblichen Vorbelastungen. Eine weitere häufige Ursache sind chronische virale sowie bakterielle Infektionen. So sind

virale Infektionen für 12,1 % aller Krebsarten weltweit verantwortlich [2, 3]. Hierbei sind die häufigsten Viren, die in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen gebracht werden, das Humane Papillomavirus, das Hepatitis B und C Virus, das Epstein-Barr Virus sowie das humane T-lymphotrope Virus. Eine weitere Ursache, die eine Anhäufung von Mutationen begünstigt, sind Fehlfunktionen des Immunsystems. Auch diese können wiederum durch Infektionen, wie zum Beispiel im Fall einer HIV-Erkrankung, hervorgerufen werden.

Zu den traditionellen Therapiekonzepten zählen zunächst Operationen zur Entfernung des Tumorgewebes, die jedoch meist als palliative Maßnahme dienen, um die Symptome der Krebserkrankung zu behandeln. Der Nachteil hierbei ist, dass Metastasen durch diese Behandlungsmethode meist nicht entfernt werden. Dies stellt ein großes Problem dar, in Anbetracht der Tatsache, dass eine Mehrheit der Krebspatienten nicht an den Folgen des Primärtumors stirbt, sondern zumeist an dessen Metastasen in verschiedenen lebenswichtigen Organen [4]. In der Radiotherapie werden ionisierende Strahlungen zur Zerstörung von Krebszellen verwendet, jedoch fördert diese Therapieform eine Vielzahl an Nebenwirkungen wie unter anderem Haarverlust, Fibrose und Ermüdungserscheinungen. Darüber hinaus kann diese Therapieform selber zur Neubildung von Tumoren führen. Bei der Chemotherapie erfolgt der therapeutische Ansatz unter Verwendung cytotoxischer Drogen, deren Ziel generell sich schnell teilende Zellen sind. Auch diese Therapieform ist mit vielen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden. Durch zielgerichtete Therapie erfolgt dagegen eine meist effektivere Therapie, die vor allem weniger schädlich für gesundes Gewebe ist. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen HER2/neu, ein Rezeptormolekül, welches in 15-20 % aller Brustkrebserkrankungen überexprimiert wird [5]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Immuntherapie, welche durch Einsatz von Cytokinen, Antikörpern oder Vakzinen das Immunsystem des Patienten stimuliert, gegen die malignen Zellen vorzugehen. Bei einigen Krebsarten ist zudem eine hormonelle Behandlung möglich. Auch der Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren findet Anwendung in der Tumorthherapie [6]. So wird zum Beispiel ein monoklonaler Antikörper gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) unter dem Handelsnamen Avastin® eingesetzt [7]. Meist werden diese Angiogenese-Inhibitoren jedoch in Kombination mit einer Chemotherapie angewendet.

1.2 Neuartige Therapieansätze in der Onkologie: Onkolytische Viren

Trotz des enormen Entwicklungsprozesses in Krebsdiagnostik und Therapie in den letzten Jahren verbleiben die Sterblichkeitsraten bei den meisten Krebserkrankungen extrem hoch. Vor allem Patienten in fortgeschrittenem Stadium haben nahezu keine Chance auf Heilung. Zudem zeigen die aktuellen Behandlungsmethoden meist enorme Nebeneffekte und geringe Effizienz. Oftmals kann der primäre Tumor selbst durch radikale Kombinationen mehrerer traditioneller Therapiekonzepte, wie Operationen kombiniert mit Chemo- und Radiotherapie, nicht vollständig entfernt werden. Erneute Wiedererkrankungen sind die Folge. Weitere Schwierigkeiten liegen in der Detektion und Therapie von Metastasen. Die weltweit steigenden Zahlen an Krebserkrankungen machen die Entwicklung innovativer Therapeutika und gezielter Behandlungsmethoden dringend erforderlich.

1.2.1 Historischer Hintergrund

Die Beobachtung dass Viren onkolytische Eigenschaften zeigen können, geht bereits auf das frühe 20. Jahrhundert zurück [8]. In den darauffolgenden Jahren wurden mehrere klinische Studien mit verschiedenen Viren durchgeführt, jedoch waren diese meist wenig erfolgreich, aufgrund von geringer Effizienz und erhöhter Morbidität durch unerwünschte Infektionen von gesundem Gewebe. Erst die Entwicklung der Zellkultur ermöglichte in den Jahren 1950 – 1960 zu einer Vielzahl von vorklinischen, aber auch klinischen Studien mit verschiedenen Viren. Unter anderem wurde das Rabiesvirus, der klassische Tollwut-Erreger, in 30 Krebspatienten getestet [9]. Aber auch Adenoviren erweckten bereits zu diesem Zeitpunkt Interesse für den Einsatz als onkolytische Viren [10]. Obwohl es sich bei diesen Studien um bahnbrechende Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der onkolytischen Viren handelte, führten die schwerwiegenden Nebeneffekte und eine oftmals geringe Effizienz zunächst in den folgenden Jahren zu einer Vernachlässigung dieser Forschungsrichtung. Erst die innovativen Möglichkeiten der Biotechnologie und neue Konzepte der Gen-Therapie ab 1990 führten zu einer „Renaissance“ der Therapie mit onkolytischen Viren und zum ersten Einsatz eines attenuierten Herpes simplex-Virus [11].

1.2.2 Biologische Prinzipien der Virustherapie

Eine Vielfalt verschiedener Viren findet bereits heute Anwendung in klinischen Studien oder werden in naher Zukunft in Studien getestet werden (Abb. 1.1). Hierzu zählt das Adenovirus, welches erstmals 1953 aus adenoidem Drüsengewebe isoliert und in Zellkultur amplifiziert werden konnte [12]. Ein weiterer Vertreter der DNA-Viren ist das Herpes simplex-Virus 1 (HSV1), welches 1991 zum ersten Mal im Zusammenhang mit der Krebstherapie beschrieben wurde [11]. Obwohl die Entwicklung und der Einsatz dieser beiden Viren in der Virustherapie am weitesten fortgeschritten sind, finden auch Vertreter der Poxviridae, das Vaccina Virus oder das Myxoma Virus, Anwendungen in klinischen Untersuchungen. Unter den RNA-Viren befindet sich ausschließlich das Masernvirus (MV) sowie das Newcastle-Disease-Virus (NDV) in klinischen Studien. Ein genetisch veränderter Stamm des Poliovirus und des Vesicular stomatitis Virus (VSV) befinden sich auch bereits in vorklinischen Studien.

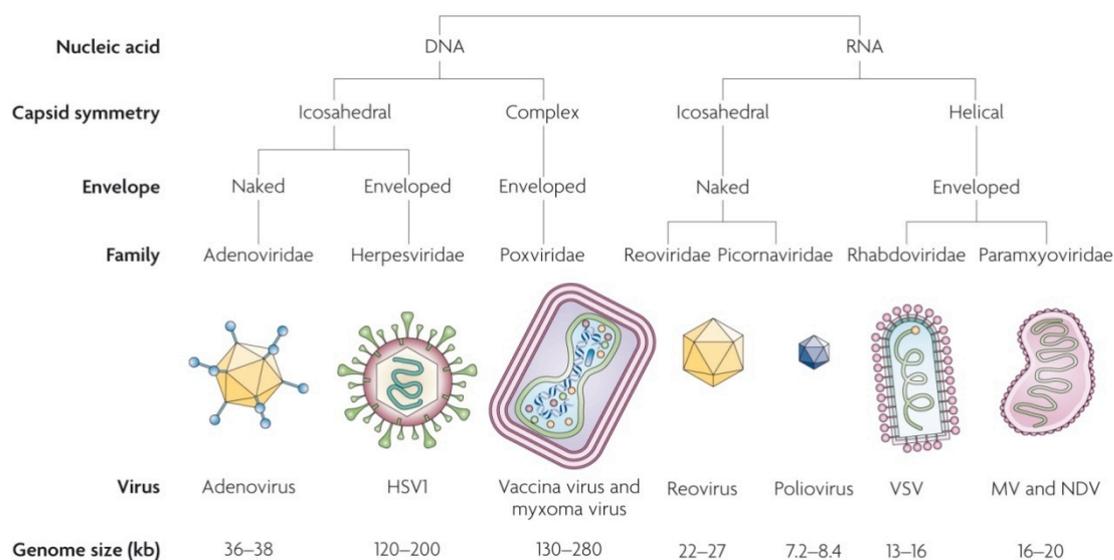


Abbildung 1.1 Die 7 Familien onkolytischer DNA- sowie RNA-Viren die derzeit Anwendung in klinischen Studien finden [13].

Eine gezielte Krebstherapie mit onkolytischen Viren erfordert eine hohe Tumorspezifität dieser Viren. Das bedeutet, das onkolytische Virus muss nicht nur selektiv humane Krebszellen infizieren, sondern auch in diesen Zellen replizieren und letztendlich zu deren Zerstörung führen. Hierbei unterscheidet man zwischen onkolytischen Viren der ersten Generation, welche sich durch eine natürliche Tumorselektivität auszeichnen (Reovirus, VSV, NDV) [14] sowie onkolytische Viren der zweiten Generation. Diese erhalten eine Tumorselektivität durch gezielte Deletion von Genen (HSV, VV, Adenovirus) [15, 16] und

durch Deletion von Genregionen, die für eine effiziente Replikation in normalen Zellen nötig sind, jedoch in Tumorzellen nicht benötigt werden (Poliovirus) [16]. Auch der Einsatz von tumorspezifischen Promotoren für replikationsspezifische Gene kann eine zusätzliche Selektivität verleihen [17]. Ein weiterer Ansatz, der vorwiegend bei der Verwendung von Adenoviren Anwendung findet, ist die Modifikation der viralen Hülle in einer Form, die eine selektive Aufnahme in Tumorzellen begünstigt [18].

Das jeweils verwendete Virus benötigt zudem genetische Stabilität und sollte in großen Mengen zu amplifizieren und aufzureinigen sein. Eine gezielte Infektion sollte nur milde virale Erkrankungen im Patienten auslösen. Im günstigsten Fall handelt es sich bei dem verwendeten Stamm und einen attenuierten nicht-virulenten Klon des wildtypischen Stammes. Eine Möglichkeit zur Virusinaktivierung im Falle einer Infektion von gesundem Gewebe ist von großem Vorteil. Die Integration viraler DNA in das Genom des Patienten ist auf keinen Fall erwünscht und sollte bei der Wahl des verwendeten Virus beachtet werden [19].

Die Limitierung und derzeitigen Hürden dieser Therapieform sind eine oftmals unzureichende Amplifikation des Virus in soliden Tumoren immunkompetenter Organismen [20]. Oftmals stellen Fibrose oder nekrotische Regionen eine physische Barriere dar. Bei der Therapie mit Viren, die eine rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzelle benötigen, kommt es oft zu einer nicht ausreichenden Rezeptorexpression innerhalb des Tumorgewebes.

1.3 Das Vaccinia Virus

Die Pocken sind eine folgenschwere Erkrankung, die vor allem im 18. Jahrhundert viele Menschenleben forderte. Die akute Krankheit mit hohem Ansteckungspotenzial wird durch das Variola Virus hervorgerufen, ein Mitglied der Familie der Orthopoxviren. Es gibt zwei Hauptvarianten des Pockenerregers: Variola major und Variola minor. Die Letalitätsrate bei Variola major liegt mit 30-40 % deutlich über der von Variola minor [21]. Auf genomischer Ebene sind die beiden Varianten sehr ähnlich, daher müssen die großen Unterschiede in ihrer Letalität auf eine kleine Anzahl von Genen beschränkt sein.

Dem englischen Landarzt Edward Jenner gelang im Jahr 1776 der Durchbruch im Pockenimpfschutz, durch die Beobachtung, dass eine Infektion mit Vaccinia Viren beim Menschen nur eine milde Erkrankung auslöst, jedoch Immunität gegenüber den Pockenerregern verleiht. Daraufhin wurde 1874 weltweit eine allgemeine Impfpflicht

eingeführt. Nach einem im Jahre 1967 durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweit angelegten Impfprogramm, galten die Pocken 1977 schließlich als ausgerottet.

Aufgrund dieses geschichtlichen Hintergrunds zählt das Vaccinia Virus mittlerweile zu dem am besten charakterisierten Mitglied der Pockenvirus-Familie (Poxviridae). Es findet hauptsächlich Anwendung als rekombinanter Vektor für Genexpressionsstudien, dient jedoch auch als Wahlmodell zur Untersuchung der Immunantwort nach einer Virusinfektion. In der Krebstherapie gewinnt das Vaccinia Virus zunehmend als Träger für Tumorantigene sowie als onkolytisches Virus an Bedeutung.

1.3.1 Das Vaccinia Virus – ein geeigneter Kandidat für onkolytische Virustherapie

Aufgrund des geschichtlichen Hintergrunds verfügen wir über ein detailliertes Verständnis der Pathogenese und der Biologie von Vaccinia Viren. Die weltweit durchgeführten Impfungen lieferten beispiellose Informationen über die Auswirkungen einer Infektion mit Vaccinia Viren im Menschen [22].

Eine Vielzahl von weiteren biologischen Eigenschaften sorgt für ideale Möglichkeiten zur Entwicklung von onkolytischen Vektoren. Darunter ist die Möglichkeit der Integration großer Mengen an transgener DNA in das virale Genom zu sehen [23] sowie ein breites Wirtszell-Spektrum [24], da das Vaccinia Virus keine definierten Zelloberflächenrezeptoren benötigt und die Infektion über mehrere Membranfusionen vermittelt wird [25, 26]. Die rapide Replikation erfolgt ausschließlich im Cytoplasma und führt somit nicht zur Integration von viraler DNA ins Wirtszellgenom. Vor allem das virale Partikel EEV (extracellular enveloped virus) ermöglicht durch eine Membran aus größtenteils Wirtszell-Proteinen sowie integrierten Komplement-Kontrollproteinen [27] eine unbeeinträchtigte Verteilung über den Blutkreislauf. Darüber hinaus führt eine systemische Injektion von rekombinanten Vaccinia Viren in Tumor-tragende Mäuse zu hohen viralen Titern im Tumorgewebe, jedoch nicht in anderen Organen, wodurch eine tumor-spezifische Kolonisierung erwartet werden kann [28-30].

1.3.2 Taxonomie der Poxviridae

Die Familie der Poxviridae kann aufgrund verschiedener Wirtsspezifität in zwei Unterfamilien, den Entomopoxvirinae und den Chordopoxvirinae untergliedert werden. Während die Entomopoxvirinae ausschließlich Insekten infizieren, dienen den Chordopoxvirinae

Vertebraten als Wirtsorganismus. Sowohl das humanpathogene Variola Virus als auch das Vaccinia Virus sind Vertreter der zur Familie der Chordopoxvirinae gehörenden Gattung von Orthopoxviren.

1.3.3 Morphologie des Vaccinia Virus

Die Poxviridae und damit auch das Vaccinia Virus sind eine Familie großer, membranumhüllter DNA-Viren. Ihr komplexes Genom besteht aus 130-300 kb doppelsträngiger DNA, die rund 200 Gene codiert. Umgekehrte Sequenzwiederholungen an den beiden Genomenden ermöglichen die Ausbildung von Haarnadelschleifen [31], eine für die Initiation der DNA-Replikation wichtige Struktur.

Die beiden infektiösen Partikel des Vaccinia Virus, das intracellular mature vaccinia virion (IMV) und das extracellular enveloped virion (EEV), unterscheiden sich durch Zusammensetzung der viralen Proteine, welche zu differierenden strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften führen [32-34]. Bei EEV handelt es sich um ein IMV-Partikel mit einer zusätzlichen, sehr fragilen Membran. Die DNA ist zusammen mit einigen viralen Enzymen, unter anderem der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und dem RNA-Prozessierungs-Enzym, im Kern verpackt. Dieser nimmt oft eine hantelförmige Struktur an (Abb. 1.2).

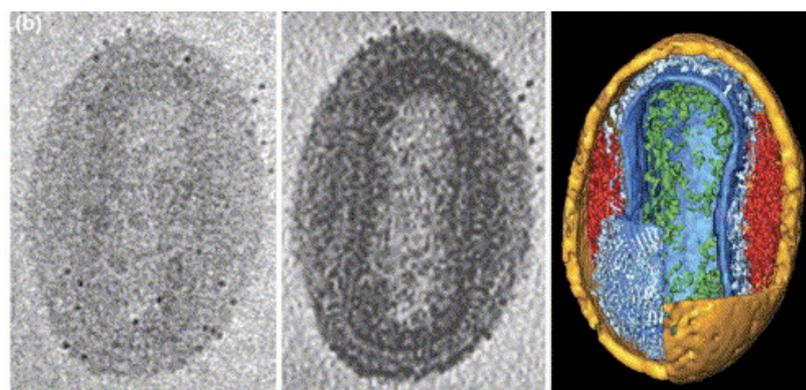


Abbildung 1.2 Visualisierung eines IMV Partikels mittels Kryoelektronen-Tomographie in Aufsicht (links), zentralem Durchschnitt (Mitte) und dreidimensionaler Darstellung (rechts). Das Partikel besteht aus mehreren äußeren Membranen (orange), den „lateral bodies“ (rot) und dem Virus-Core (dunkelblau) mit einer sehr stark kondensierten DNA (grün) [35]

1.3.4 Lebenszyklus von Vaccinia Viren

Vaccinia Viren replizieren ausschließlich im Cytoplasma [36] und bringen ein eigenes Repertoire an Replikations- und Transkriptionsfaktoren mit [31], was sie in hohem Grade unabhängig von der Wirtszelle macht. Untersuchungen der Eintrittsmechanismen von VACV gestalten sich aufgrund der verschiedenen infektiösen Viruspartikel komplex. EEV und IMV nutzen unterschiedliche Infektionsmechanismen [37]. IMV-Partikel binden unter Beteiligung der Hüllproteine, A27L, H3L und D8L an Glucosaminoglykane (GAGs) [38-41] und nutzen Macropinocytose sowie apoptotische Mimikry zur Aufnahme in die Zielzelle [26]. Dies ist möglich durch die vergleichbare Größe mit Apoptosekörperchen und die Anreicherung von Phosphatidylserinen [42], welche als Signalmoleküle zur macropinocytotischen Aufnahme durch Phagozyten und anderen Zellen dienen [43]. Diese Mimikry ermöglicht die Infektion vieler Zelltypen und kann zu einer Hemmung der angeborenen Immunantwort führen [44]. Die empfindliche äußere Membran des EEVs erschwert die Untersuchung eines Eintrittsmechanismus. Elektronenmikroskopische Studien zeigen einen in der Virologie beispiellosen Liganden-vermittelten Auflösungsprozess der äußeren Membran nach der Bindung an der Plasmamembran der Wirtszelle [45]. Nach der Fusion mit der Plasmamembran kommt es im Verlauf der Partikelaufnahme möglicherweise zur Bildung eines Syncytiums [25].

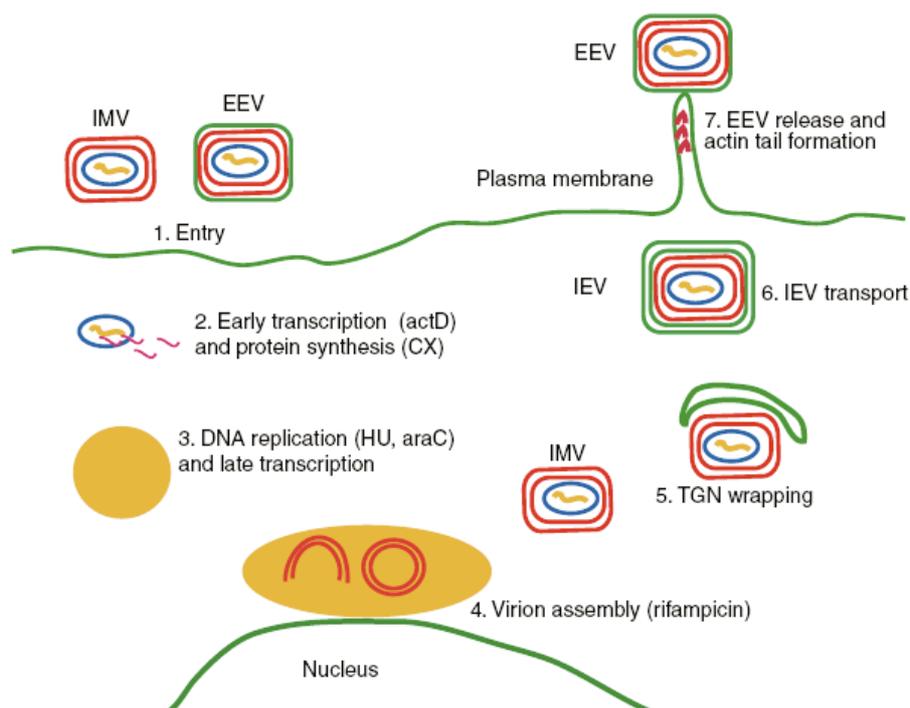


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Vaccinia Viren [46]

Nach Eintritt in die Zelle treten Veränderungen der Zellfunktion, des Metabolismus sowie der Morphologie auf, welche als „cytopathic effects“ (CPE) bezeichnet werden [47]. Mit Aufnahme des Viruspartikels kommt es zu einer Zunahme der Plasmamembran-Permeabilität sowie der Entlassung des DNA-haltigen Virion-Kerns ins Cytoplasma. Im Verlauf der Infektion folgen eine Inhibierung der Wirts-Proteinsynthese [48], der Beginn von Zellwanderung und ein mit der viralen Polypeptid-Synthese verbundenes Abrunden der Zelle [49]. Zu den späten CPEs zählen Änderungen der Cytoskelettorganisation durch die Bildung von Oberflächen-Mikrovilli und zellulärer Fortsätze [50].

Die Transkription von ca. 100 frühen mRNAs erfolgt innerhalb des Virion-Kerns durch eine im Core enthaltene, viruseigene und DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die mRNAs werden durch porenartige Strukturen in der Kernhülle exportiert [51] und schließlich im Cytosol translatiert. Die anschließende DNA-Replikation findet in spezifischen als „mini-nuclei“ bezeichneten Virus-Fabriken statt, eine durch Membranen des ER abgegrenzte Struktur im Cytoplasma [52]. Daraufhin erfolgt die Transkription intermediärer Gene, welche vor allem für Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine codieren. Nach der Transkription der für das „virion assembly“ wichtigen späten Gene beginnt der Zusammenbau mit der Bildung von sichelförmigen Membranen, welche sich schließlich zu „immature virions“ (IVs) entwickeln. Die IV-Partikel nehmen die DNA auf und reifen zu IMVs, die größtenteils bis zur Zelllyse intrazellulär verbleiben. Ein kleiner Anteil der IMV-Partikel durchlaufen das intrazelluläre Membrannetzwerk und werden durch *trans*-Golgi-Zisternen [53, 54] oder Endosomen [55] freigesetzt. Die so entstandenen IEVs (intracellular enveloped virus) werden entlang von Mikrotubuli zur Zelloberfläche transportiert, fusionieren dort mit der Plasmamembran [56, 57] und werden somit zu EEVs. Diese verbleiben größtenteils gebunden an der Zelloberfläche [58] und führen dort zur Bildung von Filopodien, die den Transport des EEV zu benachbarten Zellen vermitteln [56]. Nur ein geringer Teil der EEV, ca. 0,5 %, liegt ungebunden vor [34] (Abb. 1.3).

1.4 Verstärkung der onkolytischen Effekte von Vaccinia Viren

Intensive Forschungen haben zur Entwicklung einer neuen sogenannten dritten Generation von multifunktionellen Viren geführt, um eine noch effizientere und sicherere Therapie zu ermöglichen. Durch gezielte Insertion von Transgenen erhielt man Viren, die sich noch spezifischer im Tumorgewebe vermehren und eine Expression von therapeutischen Proteinen zur effektiveren Zerstörung des Zielgewebes ermöglichen. Auch das Vaccinia

Virus entwickelte sich so zu einem idealen Pharmakophor und findet immer weiteren Einzug in klinische Studien [59].

1.4.1 Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)

Das klassische Therapiekonzept der Chemotherapie ist weit verbreitet, jedoch führt die fehlende Tumorzell-Selektivität der verwendeten Therapeutika oftmals zu einer fehlenden Spezifität, einem unzureichenden therapeutischen Index sowie zu resistenten Zellpopulationen. Die ungleichmäßige Vaskularisation und Heterogenität der Zellpopulationen sowie nekrotische Regionen innerhalb des Tumors limitieren den Zugang systemisch applizierter Medikamente. Die geringen vollständigen Heilungsaussichten sowie die hohe Anzahl an Nebenwirkungen und Toxizitäten für gesundes Gewebe erfordern eine Weiterentwicklung der Krebs-Chemotherapie [60].

Ein neuartiger Ansatz hierbei ist die Suizidgentherapie, welche auch als *gene-directed prodrug enzyme therapy* (GDEPT) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um ein zweistufiges Behandlungskonzept. Im ersten Schritt wird das Gen, welches für ein Prodrug-aktivierendes Enzym kodiert, durch einen viralen Vektor ins Tumorgewebe eingebracht. Bei Erreichen einer ausreichenden Enzymkonzentration erfolgt im zweiten Schritt die Verabreichung des nicht-toxischen Prodrugs. Das Enzym katalysiert im Tumor die Umsetzung des Prodrugs in das aktive, cytotoxische Drug (Abb. 1.4) [61].

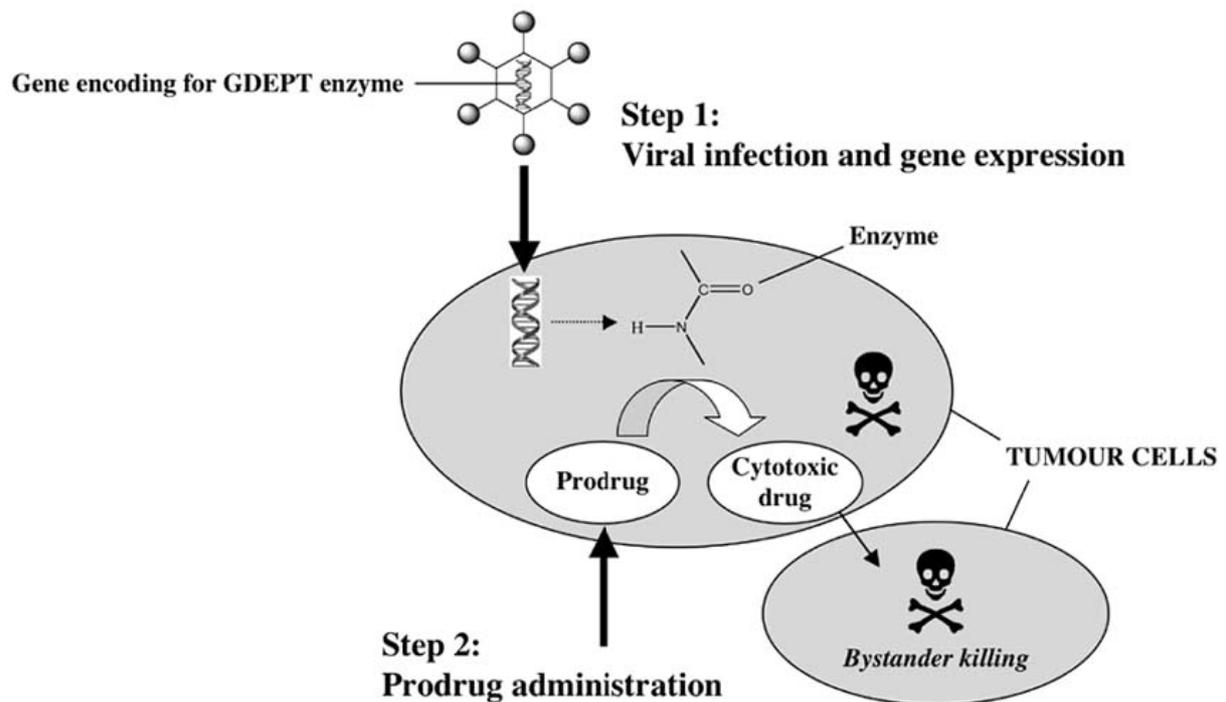


Abbildung 1.4 Schematisches Diagramm der gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) [61].

Da die mit dem viralen Vektor verbundene Genexpression auf die infizierten Zellen im Tumor begrenzt ist und schon eine kleine Anzahl an überlebenden Zellen im Tumor zu einem erneuten Tumorwachstum führen kann, ist ein sogenannter „bystander effect“ (BE) unbedingt erforderlich [62]. Die durch die Infektion genetisch veränderten Zellen müssen eine Abtötung der im Tumor benachbarten und uninfizierten Zellen vermitteln. Dieser entscheidende Effekt erfolgt über den Austausch cytotoxischer Substanzen von Zelle zu Zelle, ein Vorgang der sowohl über Diffusion als auch über gap junctions ablaufen kann [60]. Ersteres trifft für einen Großteil der GDEPT-Systeme zu und erfordert keinerlei Zellkontakt. Der BE beruht dabei auf dem interstitiellen Diffusionsvermögen und der Membrangängigkeit des aktiven Drugs sowie dessen cytotoxischem Potential. In anderen Systemen erfolgt eine Phosphorylierung der toxischen Metaboliten, welche eine Diffusion über Zellmembranen unmöglich macht. Der BE erfordert in diesen Systemen das Vorhandensein von gap junctions und somit verbundenen „gap junctional intercellular communications“ (GJICs) [63]. Des Weiteren wurde ein „Good Samaritan effect“ beschrieben [64]. Dabei können transfizierte Zellen durch eine Absenkung der Konzentration des cytotoxischen Metaboliten durch GJIC vor dem aktiven Drug vorerst geschützt werden. Durch diesen Vorgang leben die transfizierten Zellen länger, bilden mehr cytotoxische Drugs und erhöhen somit den BE.

Neben dem BE gibt es noch weitere wichtige Voraussetzungen eines GDEPT-Systems. Das transgene Enzym muss für eine erfolgreiche Therapie eine ausreichende Konzentration erreichen, um das Prodrug zu aktivieren. Zudem muss das Enzym auch unter

physiologischen Bedingungen den katalytischen Effekt erbringen und sollte idealerweise ausschließlich innerhalb des Tumors exprimiert werden. Der Vorteil dieser Therapieform ist die erhöhte Selektivität für Krebszellen und reduzierte Nebeneffekte. Durch die Transfektion der Tumorzellen sind höhere Konzentrationen des aktiven Drugs möglich als bei der klassischen Chemotherapie, da die toxischen Metabolite ausschließlich im Tumorgewebe freigesetzt werden. Auch die Auswahl der eingesetzten Prodrugs erweitert sich, da keine Tumorspezifität erforderlich ist. Zudem kann das Abtöten der Tumorzellen durch Auslösung einer Immunreaktion den therapeutischen Gesamteffekt erhöhen.

Die verwendeten Enzyme können sowohl Säugetierursprungs, wie die β -Galactosidase, als auch menschlichen Ursprungs sein. Beispiele hierfür sind die β -Glucuronidase oder die Carboxypeptidase A. Bei den verwendeten Prodrugs finden sowohl intrazelluläre [65] als auch extrazelluläre Prodrugs [66] Anwendung. Sehr oft verwendet man die Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (TK), welche in den Zielzellen Nukleosid-Analoga wie Ganciclovir (GCV) phosphoryliert, ein Vorgang der in normalen eukaryontischen Zellen nicht ablaufen kann [67]. Durch Einlagerung dieser Analoga wird die DNA-Replikation blockiert und die Zelle letztendlich getötet [62, 68]. Vielversprechend ist auch der Einsatz von β -Galaktosidase-aktivierbaren Prodrugs, vor allem der *seco*-Analoga der natürlich vorkommenden hochaktiven Antibiotika CC-1065 und Duocarmycin SA [69]. Auch innerhalb dieser Arbeit wurde ein nicht-toxisches glykosidisches Derivat, basierend auf Duocarmycin SA, eingesetzt.

1.4.2 Gezielte Beeinflussung des Chemokin-Netzwerks und Generierung einer anti-Tumor-Immunantwort

Ein einheitliches Merkmal einer Vielzahl von verschiedenen Krebsarten ist die erhöhte und veränderte Expression verschiedener Chemokine und deren Rezeptoren. Durch diese Veränderungen des Chemokin-Milieus innerhalb des Tumors vor allem durch Rekrutierung bestimmter Stromazellen kann es sowohl zu Pro- als auch Contra-Tumorwachstumseffekten kommen [70].

Tumor-assoziierte Chemokine haben mindestens fünf verschiedene Funktionen in der Biologie der Entstehung von Primärtumoren und Metastasen. Dazu gehören die Kontrolle der Leukozyten-Infiltrierung des Tumorgewebes und die Hemmung einer anti-tumoralen Reaktion. Die Rekrutierung von Makrophagen führt meist zu einer Polarisierung der eingewanderten Zellen in Richtung des Tumor-assoziierten Makrophagen-Phänotyps (TAM-Phänotyp). Dieser Subtyp produziert Wachstums-, Überlebens- und Angiogenese-Faktoren

und führt meist zu einer geringeren Heilungsprognose im Fall von Brustkrebs und Gebärmutterhalskrebs [71]. Darüber hinaus kommt es zudem zu einer Beeinflussung des Phänotyps sowie der Aktivität von Tumor-assoziierten Dendritischen Zellen (TADC) welche eine uneffektive Antigen-Präsentation zur Folge haben kann [72]. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Chemokine bei der Angiogenese, ein für jeden wachsenden Tumor unerlässlicher Prozess [73]. Hierbei können Chemokine direkt oder indirekt durch Beeinflussung der Leukozyten-Infiltrierung pro- oder anti-angiogen wirken. Pro-angiogene Chemokine zeichnen sich dabei durch ein ELR-Motiv in der Aminosäure-Sequenz aus. Ein Beispiel für eine indirekte Wirkweise ist die Produktion löslicher Faktoren durch epitheliale Krebszellen, welche zur Einwanderung von Monocyten und somit zur Produktion von pro-angiogenen Chemokinen führen [74]. Tumor-assoziierte Chemokine, zum Beispiel das Neutrophil-aktivierende Protein-3 (NAP-3/CXCL1) und Interleukin-8 (IL-8/CXCL8), können darüber hinaus die Proliferation sowie die Überlebensdauer von Tumorzellen fördern [75]. Des Weiteren werden in einigen Studien direkte Einflüsse auf die Metastasierung beschrieben. So führt beispielsweise die Expression des CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4 (CXCR4) auf Krebszellen zu einer Wanderung dieser Zellen zu Organen mit hoher Konzentration des korrespondierenden Liganden stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12), speziell zu Lunge, Knochenmark und Lymphknoten [76, 77].

Die Wirkung Tumor-assoziiertes Chemokine ist jedoch nicht auf pro-maligne Effekte begrenzt. Das CC-Chemokin MCP-1 (CCL1) führt durch eine erhöhte Makrophagen-Infiltrierung zu einer reduzierten Tumorprogression und an Pankreas-Krebs erkrankte Patienten mit erhöhten MCP-1 Konzentrationen im Blut zeigen deutliche höhere Überlebensraten im Vergleich zu Patienten mit niedrigen MPC-1-Konzentrationen [78]. Des Weiteren führt eine erhöhte Expression des Chemokins RANTES (CCL5) bei Patienten mit Stadium I-Lungenkarzinom zu einer geringeren Sterblichkeitsrate, ein Effekt, der sehr wahrscheinlich durch eine aktive Leukozyten-Immunantwort vermittelt wird [79].

Das zunehmende Verständnis des lokalen Chemokin-Netzwerks bei Krebserkrankungen führt zu vielversprechenden Therapie-Möglichkeiten durch gezielte Veränderung des intratumoralen Chemokin-Milieus mit dem Ziel einer, durch das Immunsystem vermittelten Regression von Primärtumoren und Metastasen. Hierbei sind die Ansatzmöglichkeiten dieser Therapieform sehr vielseitig und reichen von direkter Überexpression von Chemokinen durch den Einsatz von Viren als transgene Vektoren [80], über direkte Blockierung von pro-malignen Chemokinen durch neutralisierende Antikörper [81], bis hin zu einer gezielten Blockierung einzelner Chemokin-Rezeptoren [82, 83]. In dieser Arbeit sollte durch den Einsatz der rekombinanten Vaccinia-Viren GLV-1h80 und GLV-1h103 eine gezielte intratumorale Überexpression des Chemokins MCP-1 erzielt werden.

1.4.2.1 Klassifizierung, Struktur und allgemeine Funktionen der Chemokine

Unter dem Begriff Chemokin (chemoattraktive Cytokine) versteht man eine Gruppe kleiner (8-14 kDa) immunregulatorischer Proteine, welche von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet werden. Der 1977 als erster identifizierte Vertreter dieser Protein-Familie war *platelet factor 4* (PF4/CXCL4) [84]. Bis heute wurden ca. 50 humane Chemokin-Peptide und 20 Rezeptoren identifiziert [85]. Innerhalb dieser gibt es Chemokine, die aufgrund von Sequenzhomologien und chromosomaler Lokalisation der Gene eindeutig ein korrespondierendes Protein im murinen System haben. In anderen Fällen, wie bei den Chemokinen MCP-1,-2,-3 und -4, ist aufgrund der großen Sequenzhomologien in dieser 4 Proteine die Frage der korrespondierenden murinen Liganden noch unklar [86]. Die Nomenklatur der Chemokine erfolgt aufgrund eines konservierten Tetra-Cystein-Motivs innerhalb der Primärsequenz. Innerhalb dieses Motivs bilden der 1. und der 3., sowie der 2. und der 4. Cysteinrest eine Disulfidbrücke. Anhand der lokalen Sequenz innerhalb der ersten beiden Cysteinreste werden die Chemokine in unterschiedliche Klassen untergliedert. Die CXC- oder α -Chemokine zeichnen sich durch eine intervenierende Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinresten aus. Liegen diese beiden konservierten Reste unmittelbar nebeneinander spricht man von CC- bzw. β -Chemokinen. Eine relativ neue Klasse der Chemokine, die C- oder δ -Chemokine, mit dem einzig bekannten Vertreter Lymphotactin, enthält ausschließlich 2 Cysteinreste [87]. Eine weitere Ausnahme bildet Fractalkin, das einzig identifizierte CX3C – oder γ -Chemokin mit 3 intervenierenden Aminosäuren [88].

Der erste Cysteinrest ist innerhalb der Sekundärstruktur der Chemokine am langen N-Terminus lokalisiert. Nach den ersten beiden Cysteinen folgt der für die Funktion wichtige N-loop. Die 3 antiparallel orientierten β -Faltblätter werden durch flexible loops aus 3-4 AS-Resten verbunden. Der 50s loop verbindet das dritte β -Faltblatt mit der C-terminalen α -Helix (Abb. 1.5) [89].

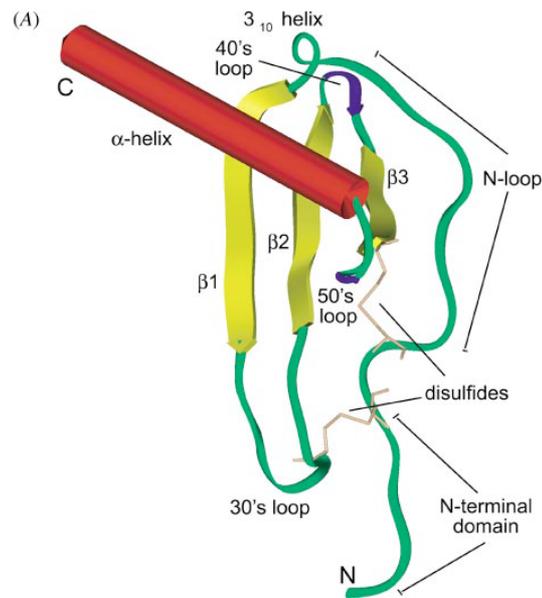


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des bei Chemokinen hochkonservierten Tetra-Cystein-Motivs [89].

Obwohl Monomere die funktionelle Einheit der Chemokine bilden, erfolgt unter hohen Konzentrationen eine Bildung von Oligomeren.

Die Beschreibung der Chemokine als chemoattraktive Proteine stellt eine starke Vereinfachung der komplexen Interaktionen und funktionellen Aktivitäten dieser Superfamilie dar, die weit über die ursprünglich hervorgehobene Funktion als inflammatorische Vermittler hinausgehen. So spielen sie auch eine wichtige Rolle bei Leukozyten-Migration und Degranulation, Zelldifferenzierung und Angiogenese (Abb. 1.6). Einzelne Vertreter wie MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5) oder MIP-1 α (CCL3) tragen zur T-Zellreifung bei [90], wohingegen SDF-1 α (CXCL12) und MIP-3 α (CCL20) an der Reifung der B-Lymphozyten beteiligt sind [91]. Die beeindruckende Vielseitigkeit und Flexibilität der Chemokine ist vor allem auf die Vielfalt ihrer transkriptionellen Expressions-Kontrolle sowie ihrer proteolytischen Prozessierung zurückzuführen [92]. Chemokine können aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften in homeostatische oder konstitutive und inflammatorische oder induzierbare Chemokine unterschieden werden. Zu den homeostatischen Chemokinen, welche dauerhaft in bestimmten Organen wie Milz und Lymphknoten exprimiert werden und „housekeeping“-Funktionen haben, gehört unter anderem das „secondary lymphoid chemokine“ SLC (CCL21) [93]. Die Expression inflammatorischer Chemokine, wie MCP-1 oder IL-8, wird an Orten von Entzündungen oder Wunden induziert. Korrespondierende Rezeptoren werden dementsprechend auf infiltrierenden Leukozyten exprimiert [85].

Neben ihrer maßgeblichen Rolle im Immunsystem spielen Chemokine und ihre Rezeptoren eine Rolle in der Pathologie verschiedenartiger Erkrankungen, unter anderem bei HIV-1, Multipler Sklerose, Asthma und Krebs.

1.4.2.2 Chemokin-Rezeptor-Interaktionen

Chemokine bilden eines der vielfältigsten Systeme intrazellulärer Kommunikation, welches aufgrund der komplexen und bemerkenswerten Organisation auch als Chemokinese bezeichnet wird [94]. Die Übermittlung biologischer Funktionen wird innerhalb dieses Systems durch komplizierte Liganden-Rezeptor-Interaktionen mit ihren korrespondierenden Rezeptoren bewerkstelligt. Bedingt durch die geringere Anzahl an Rezeptoren können diese bis zu 10 verschiedene Liganden binden und einige Chemokine wiederum können mit bis zu 3 verschiedenen Rezeptoren interagieren. Diese spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) besitzen 7 Transmembran-Domänen (TM1 – TM7, Abb. 1.6). G-Proteine bestehen aus 3 Untereinheiten, welche als α -, β - und γ -Untereinheiten bezeichnet werden.

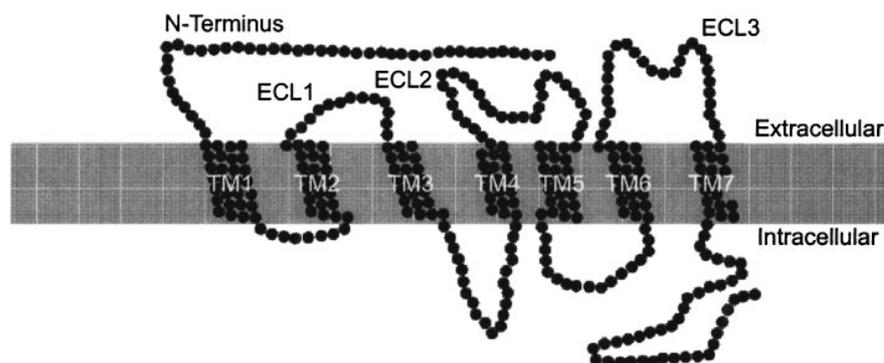


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Topologie eines typischen Chemokin-Rezeptors [89]

Die Übermittlung des Signals kann vereinfacht als 2-Stufen-Modell beschrieben werden. Zunächst erkennt das Chemokin einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle und bindet an diesen. Es folgt eine vorwiegend durch den flexiblen N-Terminus vermittelte Konformationsänderung [95], welche zur Rezeptoraktivierung durch den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit führt. Die vom Rezeptor dissoziierenden G-Proteine aktivieren „downstream“ spezifische Effektormoleküle und setzen somit eine Kaskade an Signalereignissen im Cytoplasma in Gang [96]. Die Hauptsignalwege hierbei

sind der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Signalweg), der Phospholipase C-Signalweg (PLC-Signalweg), der MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated protein*) sowie eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell*). Die genauen zellulären Mechanismen der chemotaktischen Antwort der Zielzelle sind noch unklar und auch die Forschung an der Signal-Transduktions-Kaskade befindet sich noch in der Anfangsphase. Die bis heute beschriebenen Haupt-Signalwege führen zur Aktivierung wichtiger Prozesse, wie Genexpression, Zell-Polarisation und Chemotaxis.

1.4.2.3 Das Chemokin MCP-1

Das Chemokin monocyte chemoattractive proteine-1 (MCP-1), ein Mitglied der CC-Chemokin-Familie, zählt zu den am besten charakterisierten Chemokinen und spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen. MCP-1 wird von einer Vielzahl von Zellen konstitutiv oder nach Induktion durch oxidativen Stress oder anderen Cytokinen freigesetzt. Neben Endothelzellen, Fibroblasten, T-Zellen und Zellen der glatten Muskulatur stellen die Monocyten/Makrophagen die Hauptquelle dieses Chemokins dar [97, 98]. Neben seiner Hauptfunktion in der Rekrutierung mononukleärer Zellen [99] spielt es bei mehreren entzündungsbedingten Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen. So vermindert ein „Knock-down“ von CCR2/MCP-1 die Lipid-Ablagerungen und führt zu einer Minderung kardiovaskulärer Erkrankungen [100, 101]. Auch bei allergisch bedingtem Asthma, rheumatoider Arthritis und Krebs wird häufig eine Beteiligung dieses Chemokins nachgewiesen [102-104].

Das murine MCP-1-Gen wurde 1983 erstmals beschrieben und zunächst als JE-Gen bezeichnet [105]. Sechs Jahre später wurde ein zu JE homologes humanes Gen entdeckt und aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Monocyten als humanes monocyte chemoattractant protein-1 bezeichnet [97, 106]. Es codiert für ein Protein, welches nach Abspaltung einer Signalsequenz eine Größe von 76 Aminosäuren aufweist [107]. Der Nachweis des chemotaktischen Potenzials des murinen Homologen JE auf Monocyten führte zu einer Änderung der Nomenklatur in murines MCP-1 [108]. Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf Monocyten kann MCP-1 auch zu einer Aktivierung der Zielzelle führen. Nach Bindung an korrespondierende Rezeptoren auf Monocyten erfolgt ein Ca^{2+} -Anstieg und die Auslösung eines so genannten „*respiratory burst*“ durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies [109, 110].

Die Primär- sowie Sekundärstruktur des MCP-1 ist charakteristisch für die Klasse der CC-Chemokine mit konservierten Cysteinresten und 4 β -Faltblättern. Röntgenstrukturanalysen zeigen zwei verschiedene kristalline Isoformen des Proteins. Während die P-Isoform durch Dimerisierung zweier Monomere entsteht, beinhaltet die I-Isoform ein reines Monomer (Abb. 1.7) [111].

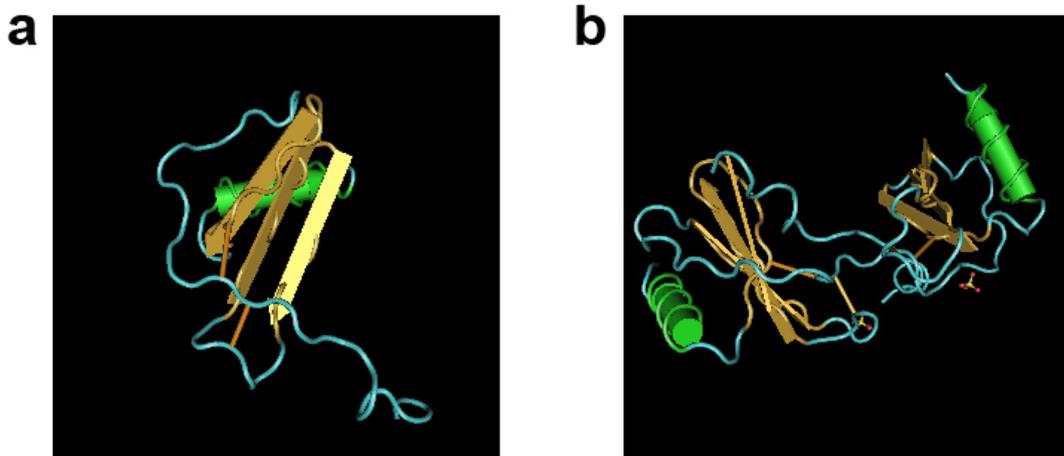


Abbildung 1.7 Röntgenstruktur des Chemokins MCP-1 mit der monomeren I-Form (a) und der dimeren P-Form (b) [111]

Trotz der Dimer-Bildung deutet vieles darauf hin, dass MCP-1 unter physiologischen Bedingungen als Monomer vorliegt und in dieser Form volle biologische Aktivität aufweist. MCP-1 löst auf der Zielzelle eine Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung aus. Es kommt zu einer schnellen Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors CCR2 und zu einer Trans-Phosphorylierung der rezeptorassoziierten JAK-Kinase 2 (Janus-Kinasen). Die aktivierten Kinasen phosphorylieren wiederum cytoplasmatische Tyrosinreste des Rezeptors und legen so die Bindestelle für die SH2-Domäne von STAT3-Proteinen frei (signal transducer and activator of transcription). Phosphorylierte STAT3-Proteine bilden Dimere und wandern in den Zellkern, wo sie an charakteristische DNA-Erkennungssequenzen binden und die Transkription spezifischer Zielgene aktivieren (Abb. 1.8).

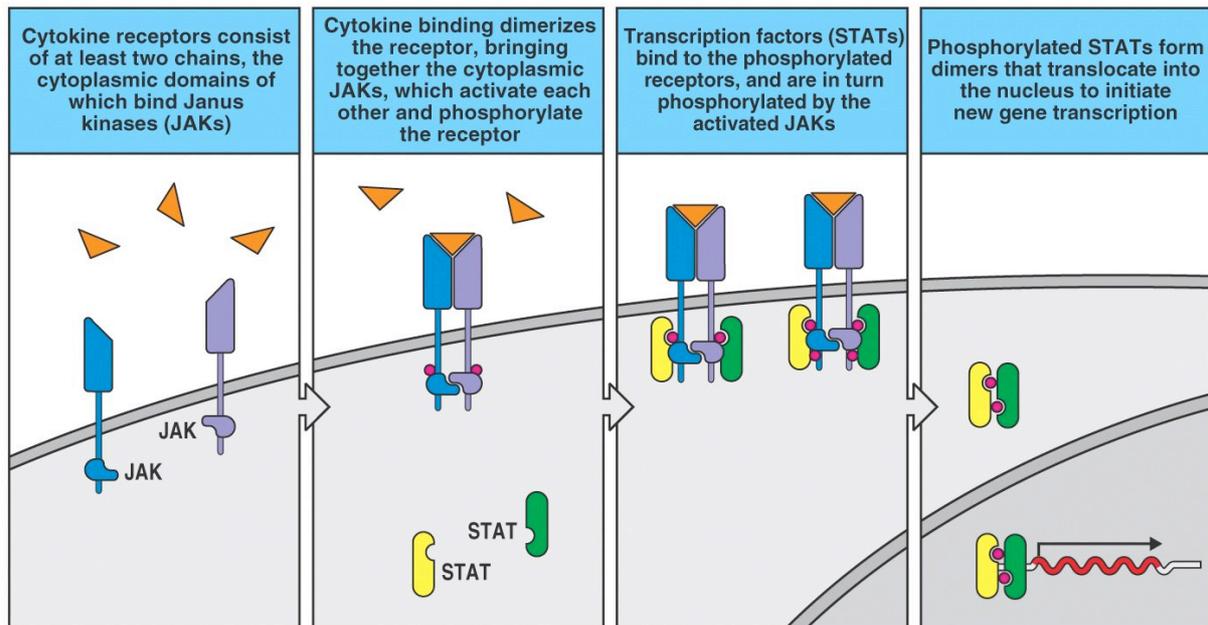


Figure 6-23 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Abbildung 1.8 Schematische Darstellung des JAK-Stat-Signalweges

Im Gegensatz zu der Expression des Liganden MCP-1 in einer Vielzahl von Zelltypen, ist die Expression des korrespondierenden Rezeptors CCR2 begrenzt. Die beiden bekannten Isoformen CCR2A und CCR2B unterscheiden sich ausschließlich durch ihre Carboxyl-Enden [112]. Während die häufigste Isoform CCR2A von mononuklearen Zellen und Zellen der glatten Muskulatur exprimiert wird [113], wird der CCR2B-Rezeptor ausschließlich in aktivierten Monocyten und NK-Zellen exprimiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die beiden Isoformen zudem zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden führen [114] und somit eine duale Rolle dieses vielseitigen Chemokins sowohl als pro-inflammatorischer wie auch als anti-inflammatorischer Effektor ermöglichen.

1.4.2.4 MCP-1-Expression und pleiotrope Tumor-Effekte

Genetische Analysen zeigten, dass Chemokine und deren Rezeptoren zwar keine direkte Rolle in der Pathogenese von Krebs spielen, jedoch pleiotrope Effekte hervorrufen. Die Rolle der Chemokine bei Krebs sollte dennoch mit einer gewissen Skepsis betrachtet werden, da neben der Tumor-unterdrückenden auch eine Tumor-fördernde Aktivität der Chemokine beobachtet werden kann. So stimuliert MCP-1 unter manchen Umständen die Anti-Tumor-Immunantwort, jedoch sekretieren einige Krebszellen selbst MCP-1, wodurch es zu einer Proliferations-Anregung und einer Stimulation durch anti-apoptotische Signale kommt [115].

Diese Effekte führten zu der ursprünglichen Bezeichnung von MCP-1 als tumor-derived chemotactic factor (TDCF) [116]. Zudem korreliert eine erhöhte MCP-1-Expression in Tumoren signifikant mit einer erhöhten TAM-Infiltrierung [117], oftmals verbunden mit negativen Effekten auf die Angiogenese [118, 119].

In vielen Publikationen wird aber auch ein dosisabhängiger Antitumor-Effekt von MCP-1 beschrieben. So erhöht eine Inkubation mit diesem Chemokin die Antitumor-Aktivität von Makrophagen in Zellkultur [110]. Darüber hinaus führt eine MCP-1-Expression in malignen Zellen auch 10 Monate nach Injektion von Tumorzellen zu einer Hemmung der Bildung solider Tumore [108]. Dieser Effekt von MCP-1 wirkte sich zudem auch auf koinjizierte maligne Zellen aus, die kein MCP-1 exprimierten. MCP-1-Expression korreliert zudem mit einer Förderung der Tumor-Lyse durch Expression von Tumor-Nekrosisfaktoren in aktivierten Makrophagen [120]. Untersuchungen der Funktionen des durch Pankreas-Tumoren gebildeten MCP-1 zeigten anti-tumorale Effekte durch Makrophagen-Rekrutierung und damit verbundener Synthese pro-inflammatorischer Cytokine [78]. In einem Neuroblastom-Tumormodell konnte mithilfe einer Kombinationstherapie mit rekombinanten HSV-1-Viren durch induzierte MCP-1- und IL-12-Expression eine Tumor-Regression erzielt werden [80]. Die Fähigkeit von MCP-1 Makrophagen zu stimulieren, könnte zu einer Erhöhung der Aufnahme von Tumor-Antigenen führen und letztendlich zu deren Präsentation [121].

Eine der größten Schwierigkeiten beim Einsatz von Chemokinen in der Tumor-Therapie ist deren Komplexität an Kombinatorik. Die zahlreichen Cytokin-Kaskaden erschweren eine definitive Festlegung der Schlüssel-Ereignisse zu Beginn der Kaskade. Deshalb müssen positive Effekte durch Inhibierung der MCP-1/CCR2-Expression, aufgrund der wichtigen Funktionen dieses Chemokins zur Aufrechterhaltung der Gesundheit, unter Vorbehalt betrachtet werden [122].

1.5 Aspekte der Immuntherapie bei Krebs

Die grundlegende Idee, das Immunsystem derartig zu manipulieren, um eine Erkennung sowie Zerstörung von malignem Gewebe zu erzielen, ist schon seit dem späten 17. Jahrhundert bekannt. Später, im Jahr 1891 publizierte William Coley, ein Onkologe am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, die erste erfolgreich Immuntherapie und gilt seitdem als „Vater der Krebsimmuntherapie“. Durch intratumorale Injektion einer Mischung hitzeinaktivierter Bakterien (*Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*), später auch als Coley's Toxin bezeichnet, erzielte er bei Weichteil-Sarkomen eine Heilungsrate von 10 %

[123]. Zunehmende Erkenntnisse der Immunologie von Infektionskrankheiten ermöglichen auch auf dem Gebiet der Krebsimmuntherapie vielfältigere Therapieansätze. Jedoch kann das Immunsystem aufgrund seines ambivalenten Charakters durch Auslösung einer Immunantwort gesundes Gewebe sowohl schützen als auch zerstören. Diese dualen Effekte haben zu der Entwicklung zweier verschiedener Theorien zur Beschreibung der Rolle des Immunsystems bei Krebserkrankungen geführt. Während die „immunosurveillance theory“ postuliert, dass die Zellen des Immunsystems nicht nur gegen körperfremde Krankheitserreger vorgehen, sondern auch Schutz vor körpereigenen malignen Zellen bieten, steht im direkten Gegensatz hierzu die „theory of immunostimulation“. Diese besagt, dass sich spontan ausbildende Tumore eine schädliche Immunantwort auslösen und so zu einer weiteren Tumor-Progression beitragen.

1.5.1 Die „Cancer Immunosurveillance-Theorie“

Bereits im Jahr 1909 stellte Paul Ehrlich die Hypothese über eine Erkennung und Zerstörung primärer Tumoren durch das Immunsystem auf, jedoch erlaubte es das damals noch fehlende Wissen über zelluläre und molekulare Grundprinzipien immunologischer Prozesse nicht die aufgestellte Theorie experimentell zu erproben [124]. Einige Jahre später wurde, zunächst durch F. M. Burnet und L. Thomas, ein neues Konzept der „cancer immunosurveillance“ entwickelt, das besagt, dass Lymphozyten im Körper patrouillieren und spontan entstehende Krebszellen zerstören. Durch das Fehlen von komplett immundefizienten Nacktmäusen zum damaligen Zeitpunkt konnte der experimentelle Beweis für diese Theorie jedoch damals nicht erbracht werden [125]. Später wurde klar, dass die seinerseits verwendeten athymischen Mäuse eine geringe, aber nachweisbare Anzahl funktioneller T-Zellen aufweisen [126]. Darüber hinaus war das Wissen über die Existenz von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), welche in athymischen Mäusen vollkommen normal ausgebildet werden, noch nicht ausgereift. Dieses heutige Wissen erklärt das Fehlschlagen der voran gegangenen Untersuchungen. Denn durch ihr zwar geringes aber vorhandenes Repertoire an Immunzellen können athymische Mäuse trotz fehlendem Thymus dennoch eine Fähigkeit zur Immunosurveillance gegen die Entstehung von Krebs aufweisen. Jahre später kam es durch neue Technologien zu einer Renaissance der „Cancer Immunosurveillance“ Theorie und zum Nachweis der Beteiligung sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität [127-129]. In folgenden Jahren wurden einige Komponenten des „Immunosurveillance“-Netzwerks identifiziert. So spielt IFN- γ eine kritische Rolle und kann durch eine Steigerung der MHC-I-vermittelten Antigen-Präsentation zu einer Rückbildung von Tumoren führen [130]. Die Existenz eines entsprechenden

Systems der Immunüberwachung zur Vermeidung von Krebserkrankungen im Menschen ist sehr wahrscheinlich. So haben immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantationen ein höheres Risiko zur Erkrankung an Krebs als immunkompetente Menschen im selben Alter [131, 132]. Ein weiterer Hinweis auf die Richtigkeit dieser Theorie ist die spontane Entwicklung einer adaptiven oder angeborenen Immunantwort bei Krebs-Patienten [133] sowie des Vorhandenseins von Lymphozyten im Tumorgewebe als positiver prognostischer Indikator [134].

Die zunehmende Erkenntnis, dass die „Cancer Immunosurveillance“ nur als ein Teil der komplexen Verbindung zwischen Immunsystem und Krebs anzusehen ist, führte schließlich zur Entwicklung der „Cancer Immunoediting“-Hypothese [128, 129]. Diese Theorie beschreibt die „three *Es of cancer* Immunoediting“: Elimination, Equilibrium und Escape (Abb. 1.9).

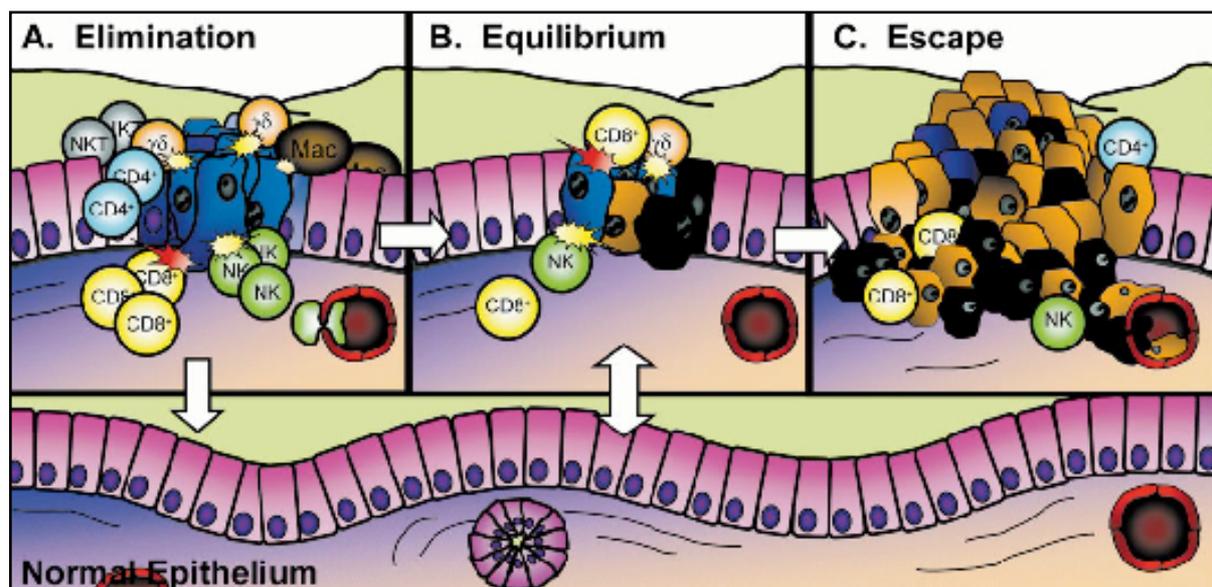


Abbildung 1.9 Die drei Phasen der „cancer immunoediting“ Hypothese: Elimination, Equilibrium und Escape [129]

Hierbei beschreibt die Eliminations-Phase das ursprüngliche Konzept der „cancer immunosurveillance“, in der verschiedene Komponenten des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems aktiv werden. Hierbei spielt die IFN- γ -Expression eine wichtige Rolle. Das Immunsystem unterscheidet während dieser Phase anhand des Erkennens von Tumor-Antigenen zwischen normalen und veränderten malignen Zellen. Hierzu zählen Differenzierungs-Antigene (z.B. Tyrosinase), mutations-bedingte Antigene (z.B. veränderte Formen von p53), überexprimierte Gene (z.B. HER7neu) oder virale Antigene (z.B. HPV).

Aber auch andere Gefahren-Signale wie Harnsäure-Produktion des Tumorgewebes können eine Erkennung durch das Immunsystem ermöglichen [135]. Führt diese Phase zu einer vollständigen Zerstörung der entarteten Zellen, ist der Immunediting-Prozess ohne weitere Phasen vervollständigt.

Krebszellen, die durch die Eliminations-Phase nicht durch das Immunsystem zerstört wurden, gehen in eine dynamische Phase über, welche als Equilibrium bezeichnet wird. Diese Phase kann bis zu mehrere Jahre anhalten und führt zwar zu einer ständigen Zerstörung entarteter Zellen, jedoch durch die enorme Plastizität des Krebszell-Genoms auch zur Bildung neuer Mutationen und somit neuer Krebszell-Populationen mit verringerter immunogene Aktivität [136, 137]. Es gibt drei mögliche Endergebnisse für Tumorgewebe, welches sich in diesem Stadium des „*Immunoediting*“ befindet. Durch verschiedene Effektoren des Immunsystems kann es schließlich doch zu einer Eliminierung der mutierten Zellen kommen. Es kann jedoch auch eine permanente Aufrechterhaltung der Equilibrium-Phase auftreten, wodurch Wachstum und Zerstörung des Gewebes durch zelluläre Kontrollmechanismen des Immunsystems im Gleichgewicht gehalten werden. Im schlimmsten Fall kommt es zu einem Übergang in die Escape-Phase und schließlich zur klinisch manifesten Krebserkrankung.

Einzelne Zellen, welche in der Equilibrium-Phase die Zerstörungsmechanismen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems überleben können, wachsen in der Escape-Phase zu detektierbarem Tumorgewebe. Diese Phase kann durch verschiedene Ereignisse, wie Fehlfunktionen in IFN- γ -vermittelten Signalwegen [138], Verlust spezifischer Tumor-Antigen [139] oder durch Überexpression von immunsuppressiven Cytokinen wie Interleukin-10 (IL-10) eintreten [140].

Das wachsende Verständnis der Immunbiologie von Krebserkrankungen kann in Zukunft den Einsatz der Immuntherapie zur Kontrolle und Zerstörung von Tumoren in Krebspatienten näher bringen. Ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Prozesse der Eliminations-Phase würde deren Nutzen für einen natürlichen Schutz vor Krebserkrankungen erlauben. Darüber hinaus führt ein zunehmendes Verständnis über die Escape-Phase zu neuen Strategien, die Immunogenität von Tumoren zu verändern.

1.5.2 Das Ying-Yang der tumorassoziierten Makrophagen (TAMs)

Bereits 1845 vermutete R. Virchow nach Entdeckung infiltrierender Leukozyten in malignem Gewebe eine Verbindung zwischen Entzündungsreaktion und Krebserkrankung. Viele

klinische und experimentelle Untersuchungen der letzten Jahrzehnte machten deutlich, dass eine chronische Infektion bei der Entstehung von Krebs mitwirkt und sogar für verschiedene Krebsarten prädisponiert. Hierbei beinhaltet die mit Krebserkrankungen verbundene Inflammation die Leukozyten-Infiltrierung, die Expression verschiedener Cytokine und Chemokine, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder MCP-1 sowie eine aktive Gewebe-Neubildung und Neoangiogenese. Hierbei sind TAMs die Haupt-Regulatoren dieser engen Verbindung zwischen Inflammation und Krebs.

Tumorgewebe besteht aus einer Ansammlung neoplastischer Zellen und Stromazellen, wie Fibroblasten, Zellen des Blut- und Lymphsystems sowie Immunzellen. Makrophagen bilden dabei den Hauptanteil der Immunzellen und entstehen aus im Blut zirkulierenden Monocyten, welche sich nach der Einwanderung ins Tumorgewebe differenzieren [141]. Bei diesem Rekrutierungs-Prozess spielt MCP-1 neben anderen wichtigen Proteinen, wie VEGF, PDGF und M-CSF, die Hauptrolle [78, 142, 143]. Die für Makrophagen typische Veränderung funktioneller Programme durch verschiedene Signale in der unmittelbaren Umgebung führen zu einer vielseitigen Plastizität dieser Immunzellen [144, 145]. Angelehnt an die Th1/Th2-Nomenklatur werden TAMs nach ihren funktionellen Stadien vereinfacht in M1- und M2-Makrophagen untergliedert (Abb.1.10).

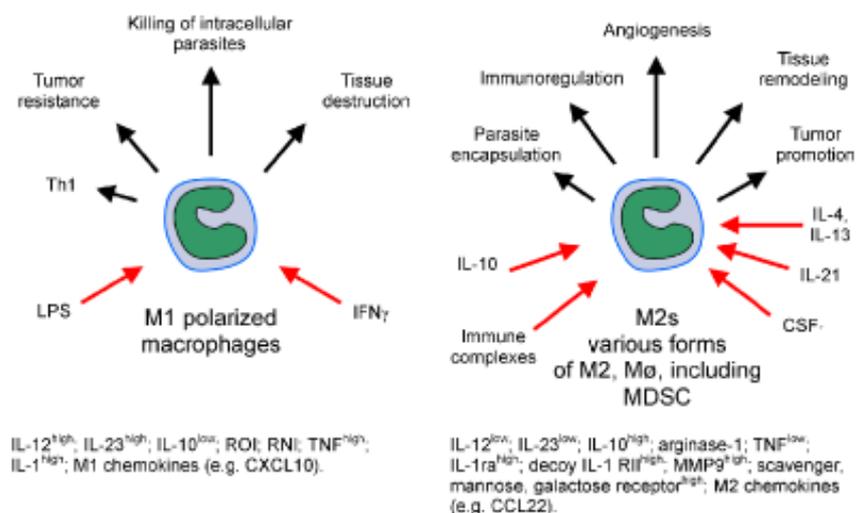


Abbildung 1.10 Vereinfachte Darstellung der Polarisation Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) in M1- und M2-Typ [146]. Während M1-Makrophagen durch IFN- γ oder LPS stimuliert werden und durch ihre Expression pro-inflammatorischer Cytokine eine TH1-vermittelte Immunantwort auslösen können, zeichnen sich die alternativ aktivierten M2-Makrophagen durch die Expression immunsuppressiver Cytokine wie IL-10 aus und haben wichtige Funktionen in Angiogenese sowie Tumorwachstum.

M1-Makrophagen, auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet, werden vor allem durch IFN- γ , LPS, TNF oder GM-CSF induziert und haben Immunsystem-stimulierende Funktionen durch Expression pro-inflammatorischer Cytokine (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-23). Durch vermehrte Produktion von IL-12 und IL-23 wird eine Th1-vermittelte Immunantwort ausgelöst. Sie zeichnen sich darüber hinaus durch ihre hohe Fähigkeit Antigene zu präsentieren aus und zeigen cytotoxische Effekte, sowohl gegenüber Tumorzellen, als auch mit intrazellulären Pathogenen infizierte Zellen. Diese Effekte werden über eine Freisetzung hoher Mengen toxischer Zwischenprodukte wie Stickstoffmonoxid (NO), reaktiver Sauerstoff-Zwischenprodukte (ROI) oder die Freisetzung von TNF- α vermittelt [145, 147]. Diese Eigenschaften machen den M1-Makrophagentyp zu einem wirkungsvollen Zelltyp gegen Pathogene und Krebszellen.

Einen starken Kontrast zum M1-Typ bilden die alternativ aktivierten Makrophagen des M2-Typs, welche vor allem durch IL-4-, IL-10- und IL-13-Expression induziert werden [147]. M2-Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen, Angiogenese und Gewebe-Neubildung [145, 147, 148]. Durch die Ausschüttung von IL-10 und die Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) unterdrückt dieser IL-12^{low}-IL-10^{high}-Phänotyp eine Th1-vermittelte adaptive Immunantwort sowie zellvermittelte Mechanismen des Immunsystems. Eine vermehrte Aktivierung des Arginase-Signalwegs begünstigt die Hemmung des Arginin-Stoffwechsels, wodurch die Produktion von Stickstoffmonoxid eingestellt wird. Die erhöhte Expression von IL-10 fördert die Differenzierung von Monocyten zu Makrophagen und blockiert zudem deren Differenzierung in DC [149]. M2-Makrophagen tragen dadurch unmittelbar zur Tumorprogression bei.

Diese stark gegensätzliche Polarisierung der TAMs zeigt die duale Rolle der Makrophagen bei Krebserkrankungen, auch beschrieben als „macrophage balance“ [141]. Diese Makrophagen-Balance hat möglicherweise, je nach Stadium der Krebserkrankung, unterschiedliche Auswirkungen auf die Tumorprogression. Während der frühen Entwicklungsphase des Tumors dominieren M1-Makrophagen innerhalb des Tumorgewebes. Diese Zellen haben selbst direkte anti-Tumor-Eigenschaften und tragen durch angeborene Immunreaktionen zu einer spezifischen adaptiven Immunität bei, wodurch es zu einer Zerstörung der Krebszellen nach dem Konzept der „cancer immunosurveillance“ kommen kann [128]. Dagegen dominieren im fortgeschrittenen Stadium einer Erkrankung, in welchem die Tumorzellen sich der anfänglichen Immunantwort entzogen haben und sich in der Escape-Phase des „Immunoediting“ befinden, die M2-Makrophagen und führen weiterhin zu einer Unterdrückung der Immunantwort. Diese Unterdrückung selbst trägt wiederum zu einer weiteren Polarisierung in Richtung des M2-Typs bei [146].

Ansätze für eine Immuntherapie durch gezielte Beeinflussung von Tumor-assoziierten Makrophagen müssen diese duale Rolle und Balance der vielseitigen Immunzellen berücksichtigen [150].

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Verstärkung der onkolytischen Effekte von rekombinanten Vaccinia Viren (rVACV) im murinen GI-101A-Brustkrebsmodell. Hierbei fanden zwei verschiedene Therapie-Konzepte Anwendung, das neuartige Konzept der *gene directed prodrug enzyme therapy* (GDEPT) sowie eine gezielte Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks mittels Immuntherapie durch Einsatz des für MCP-1-kodierenden Vaccinia Virus GLV-1h80.

Unter Verwendung des rekombinanten onkolytischen Vaccinia Virus GLV-1h68 in Kombination mit einem durch das Enzym β -Galactosidase aktivierbaren prodrug sollte der Wirkungsmechanismus und die Effekte der Kombinationstherapie auf die Tumorregression untersucht werden. Bei dem verwendeten prodrug handelt es sich um ein *seco*-Analogon des natürlich vorkommenden Antibiotikum Duocarmycin SA. Zunächst sollte die Genexpression rekombinanter Proteine nach Infektion durch das Vaccinia Virus GLV-1h68 sowie des als Kontroll-Virus dienende Virus GLV-1h43 ermittelt werden. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, ob es trotz der von Vaccinia Viren gebildeten anti-apoptischen Faktoren zu einer Apoptose-Induktion durch das aktivierte Drug kommt. Untersuchungen der Effekte einer Kombinationstherapie auf die Tumorprogression sollten in soliden murinen GI-101A-Tumoren durchgeführt werden.

Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit, durch Einsatz des rVACV GLV-1h80 eine gezielte Überexpression des Chemokins MCP-1 in soliden Tumoren zu erhalten. Hierbei sollte die Expression sowohl quantitativ bestimmt werden, als auch ein funktioneller Nachweis des rekombinanten Proteins erbracht werden. Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von MCP-1 auf das Tumorwachstum sowie der stimulierenden Wirkung auf die Immunantwort durch chemotaktische Rekrutierung von Monocyten sollten mögliche therapeutische Effekte dieses Virus auf Tumor untersucht werden. Weiterhin sollten mögliche Unterschiede der therapeutischen Effekte von GLV-1h80 im regredierenden Tumormodell GI-101A im Vergleich zum nicht-regredierenden Tumormodell HT20-cbg ermittelt werden.

Hierdurch sollte die Arbeit Beiträge leisten für einen möglichen Einsatz rekombinanter Vaccinia Viren in der klinischen Tumordiagnose und –Therapie.

2. Materialien

2.1 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien und Enzyme

Materialien	Hersteller
5 x Phusion™ Hf Puffer	New England BioLabs, US-Ipswich
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Accutase	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
β-Galactosidase (von <i>Aspergillus oryzae</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
1x BSS	PAA, A-Pasching
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Click`s RPMI	Pan Biotech, Aidenbach
Coelenterazin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC-behandeltes Wasser	Fluka, CH-Buchs

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA, A-Pasching
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Entellan®	Omikron, Neckarwestheim
Eosin	Roth, Karlsruhe
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
Glucose (45 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure/Hepes (1 M)	PAA, A-Pasching
Hoechst	Sigma, Steinheim
ImmPACT DAB (brown)	Vector Laboratories, US- Burlingame
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumferrocyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhexacyanoferrat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	PAA, A-Pasching
Low Melt Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol	Amersham, Freiburg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Estradiol	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Monocyte chemoattractive Protein-1 (rekombinantes Protein)	Biozol, Eching
Moviol	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA (Na ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Orthophosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Östradiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt
1x PBS	PAA, A-Pasching
Penicillin/Streptomycin (100x Konzentrat)	PAA, A-Pasching
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Phusion</i> TM DNA-Polymerase New England BioLabs,	US-Ipswich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitoren-Mix Complete Mini	Roche, US-Indianapolis
RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching
Schwefelsäure 95%ig	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Streptavidin-HRP	BioLegend, US-San Diego
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, CH-Buchs
Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide (MTT)	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
Vector Hematoxylin QS	Vector Laboratories, US-

	Burlingame
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.2. Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

<u>CMC-Medium:</u>	7,5 g	Carboxymethylcellulose
	500 ml	DMEM (+1 % Pen/Strep, 5 % FKS)
<u>Coelenterazin-Puffer</u>	0,5 M	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1 M	Kaliumphosphat (pH 7,4)
<u>Crystal-violet-Lösung:</u>	1,3 g	Crystal Violet
	50 ml	Ethanol
	300 ml	Formaldehyd 37 %
	650 ml	H ₂ O _{bd}
<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	440 mM	Tris-HCl
	2 M	Glycin
	1,5 % (w/v)	SDS
	pH 8,3	

ECL-Reagenz:

Lösung 1:	90 mM	p-Cumarsäure
Lösung 2:	250 mM	Luminol
Lösung 3:	1 M	Tris-HCl, pH 8,5

- 0,5 ml von Lösung 1
- 1,0 ml von Lösung 2
- 20 ml von Lösung 3
- mit H₂O auf 200 ml auffüllen
- 5 µl H₂O₂ (30 %) zu 10 ml Lösung geben

<u>ELISA-Waschpuffer:</u>	1x PBS
	0,05 % Tween 20

<u>ELISA-Coatingpuffer:</u>	8,4 g	NaHCO ₃
	3,56 g	Na ₂ CO ₃
	ad 1,0 l	H ₂ O _{bd}
	pH 9,5	

<u>ELISA-Assay Diluent:</u>	1x PBS
	10 % FKS

<u>ELISA-Stopplösung:</u>	2 N	H ₂ SO ₄
---------------------------	-----	--------------------------------

<u>Paraformaldehyd:</u>	4 g	PFA in warmem H ₂ O _{bd} lösen
		NaOH zugeben, bis die Lösung klar ist,
		mit HCl auf pH 7,4 einstellen
	10 ml	10x PBS
	ad 100ml	H ₂ O _{bd}

<u>10x TBE-Puffer:</u>	890 mM	Tris-Base
	890 mM	Borsäure H ₃ BO ₄
	25 mM	Na ₂ EDTA
	pH 8,2	
<u>10x PBS:</u>	81,8 g	NaCl
	2 g	KCl
	29 g	Na ₂ HPO ₄ -12 H ₂ O
	2 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1 l	H ₂ O _{bd}
<u>PBS⁺⁺:</u>	1x PBS	
	2,5 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
<u>5x Probenpuffer für DNA:</u>	2 ml	500 mM EDTA
	5 ml	Glycerin
	1 ml	1 % Bromphenolblau
	ad 10 ml	H ₂ O
<u>10x TBT:</u>	1,5 M	NaCl
	60 mM	Tris-Base
	190 mM	Tris-HCl
	20 %	Tween 20
<u>1x Towbin-Puffer:</u>	0,025 M	Tris-Base
	0,192 M	Glycin
	20 %	MeOH
	pH 8,3	

<u>1x SDS-Probenpuffer:</u>	200 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	5 % (v/v)	SDS
	1 mM	Na ₂ EDTA
	8 M	Harnstoff
	0,1 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
	0,2 %	Bromphenolblau

Lysepuffer zur Proteinisolation aus Zellen:

2x Stocklösung:	300 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	20 mM	Hepes

Für 20 ml Protein-Lysepuffer:	10 ml	Stocklösung
	10 ml	H ₂ O _{bd}
	0,1M	DTT
	100 µl	Igepal (10%ig)
		eine Complete Mini Proteasen-Inhibitorentablette

Lysepuffer zur Proteinisolation aus Tumoren:

50 mM	Tris-HCl
2 mM	EDTA
2 mM	PMSF
	Complete Mini Protease-Inhibitoren-Tablette (1 Tablette auf 10 ml Lysepuffer)
	pH 7,4

X-gal Färbung:

Lösung A	300 mM	K ₄ Fe(CN) ₆
Lösung B	300 mM	K ₃ Fe(CN) ₆
	120 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

2.3 Verwendete Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
DNA-free™	Ambion, Austin, TX, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
ELISA MAX™ Set Standard	BioLegend, US-San Diego
- Mouse TNF- α	
- Mouse IFN- γ	
- Mouse MCP-1	
Endogen® Mouse MCP-1 ELISA Kit	Pierce Biotechnology, US-Rockford
Mouse CD14 ELISA Kit	cell sciences, US-Canton
VECTASTAIN Elite ABC Kit (Rabbit IgG)	Vector Laboratories, US-Burlingame
Venor® GeM	Minerva Biolabs, Berlin
ImmPACT DAB	Vector Laboratories, US-Burlingame

2.4 Zellkulturmedien und verwendete Zelllinien

2.4.1 Zelllinien

CV-1-Zellen	adhärent wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
GI-101A-Zellen	adhärent wachsende humane Brustkarzinomzellen

HT-29-CBG	adhärent wachsende humane Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie mit inserierter click-beetle green Luciferase (CBG), gewonnen aus der Ursprungszelllinie HT-29 (zur Verfügung gestellt von V. Raab)
J774	makrophagenähnliche Zelllinie aus der Maus
L-929	fibroblastenähnliche Bindegewebszellen aus der Maus
Primäre Knochenmarks-Makrophagen (BMMΦ)	Makrophagen, isoliert aus dem Femur von Mäusen des Stamms FVB
MDA-MB-231-CBG	humane Adenokarzinom-Zelllinie mit inserierter click-beetle green Luciferase (CBG), gewonnen aus der Ursprungszelllinie MDA-MB-231 (zur Verfügung gestellt von U. Donat)

2.4.2 Zellkulturmedien

<u>CV-1/ L-929:</u>	500 ml	DMEM
	50 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
<u>GI-101A:</u>	500 ml	RPMI 1640
	6 ml	Glucose
	6 ml	HEPES
	6 ml	Natriumpyruvat
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	100 ml	FKS
	300 µl	BE2 (Östradiol/Progesteron)

<u>HT-29-CBG:</u>	500 ml	RPMI 1640
	14,67 ml	Natrium-Bicarbonat
	50 ml	FKS
	1 ‰	Blastizidin (immer frisch den Zellen zugeben und alle 2-3 Tage erneuert)
<u>J774:</u>	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	FKS
<u>MDA-MB-231-CBG:</u>	500 ml	DMEM
	50 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	1 ‰	Blastizidin (immer frisch zu den Zellen geben und alle 2-3 Tage erneuern)
<u>Primäre Knochenmarksmakrophagen BMMΦ:</u>		
Isolationsmedium	500 ml	Click's RPMI
	50 ml	FKS
	5 ml	Hepes
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	2,5 ml	β-Mercaptoethanol (10 mM)
Kultivierungsmedium	80 %	Medium zur Isolation
	20 %	L-929-konditioniertes Medium

2.5 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper:

Bezeichnung Antikörper	Isotyp	Spezies	Hersteller
Polyklonaler anti-MCP-1, (M-18)	Ziege IgG	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Polyklonaler anti-beta Aktin, Ab6276	Maus IgG	Maus	Abcam, Cambridge
Polyklonaler anti-beta Galaktosidase, A-11132	Kaninchen IgG	Maus	Molecular Probes, Leiden
Monoklonaler anti-CD68	Kaninchen IgG	Maus	AbD Serotec, US-Raleigh
Polyklonaler anti-cleaved caspase-3, #9661	Kaninchen IgG	Maus	Cell Signaling Technology, US-Danvers
Polyklonaler anti-full length caspase-3, #9662	Kaninchen IgG	Maus	Cell Signaling Technology, US-Danvers
Monoklonaler anti-caspase-8, #9746	Maus IgG	Maus	Cell Signaling Technology, US-Danvers
Polyklonaler anti-caspase-9, #9502	Kaninchen IgG	Maus	Cell Signaling Technology, US-Danvers
Polyklonaler anti-GFP, sc-8334	Kaninchen IgG	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler anti-cleaved PARP, 51-9000017	Maus IgG	Maus	BD Pharmingen, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

Polyklonaler anti-Maus (IgG), HRP-konjugiert, ab6728	Kaninchen IgG	Maus	Abcam, Cambridge
Anti-Ziege (IgG), Cy3-konjugiert, 705-165-147	Esel IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Kaninchen, Cy3-konjugiert, 711-165-152	Esel IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania

Anti-Maus (IgG), konjugiert, ab6728	HRP- IgG	Kaninchen	Kaninchen	Abcam, Cambridge
Anti-Kaninchen, konjugiert, ab6721	HRP- Ziege IgG	Ziege	Ziege	Abcam, Cambridge

2.6 Rekombinante Viruskonstrukte

Alle verwendeten Viruskonstrukte entstanden ursprünglich aus dem Vaccinia Virus LVP-Stamm durch zielgerichtete Mutagenese.

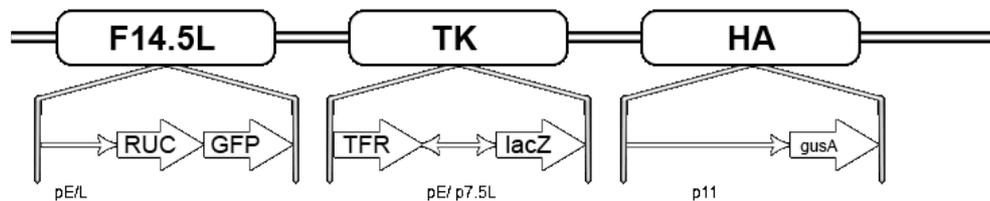


Abbildung 2.1 Viruskonstrukt GLV-1h68

Das kürzlich beschriebene Virus GLV-1h68 (Genelux virus-1h68) trägt im Genort F14.5L ein Fusionsgen aus *Renilla*-Luziferase (RUC) und GFP hinter einem early/late-Promotor. Der Thymidinkinase-Lokus wurde durch Insertion des nicht exprimierten humanen Transferrin-Rezeptor-Gens (*hTFR*) sowie des Markergens β -Galaktosidase (*lacZ*), welches von dem Promotor p7.5 kontrolliert wird, ersetzt. Ein weiteres Markergen, das für die β -Glucuronidase (GusA) codiert, ist unter der Kontrolle des viralen Promotors p11 im HA-Lokus (Hämagglutinin-Gen) lokalisiert [29].

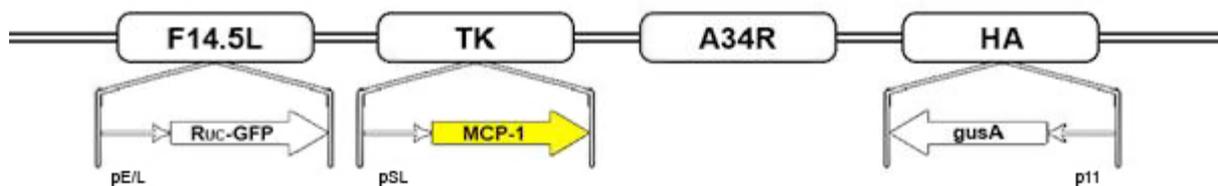


Abbildung 2.2 Viruskonstrukt GLV-1h80

Im Viruskonstrukt GLV-1h80 befindet sich ebenfalls das Gen des RUC-GFP Fusionsproduktes im Genort F14.5L. Der TK-Lokus dagegen trägt anstelle der Markergene des GLV-1h68-Virus, d.h. das Gen, das für den Transferrin-Rezeptor codiert und das Markergen für LacZ, die Gensequenz für das murine Chemokin MCP-1. Im HA-Lokus dagegen ist, wie bei GLV-1h68, das Markergen inseriert, welches für die β -Glucuronidase codiert.

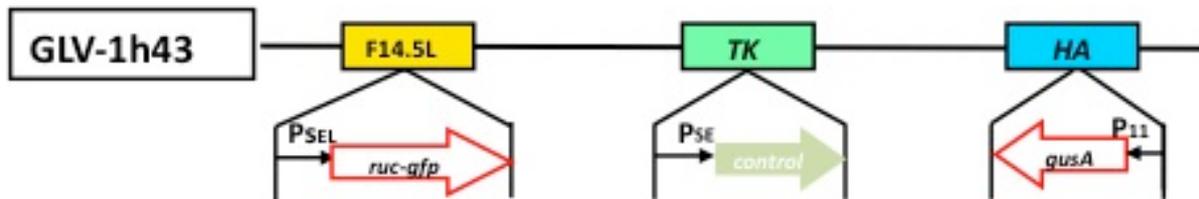


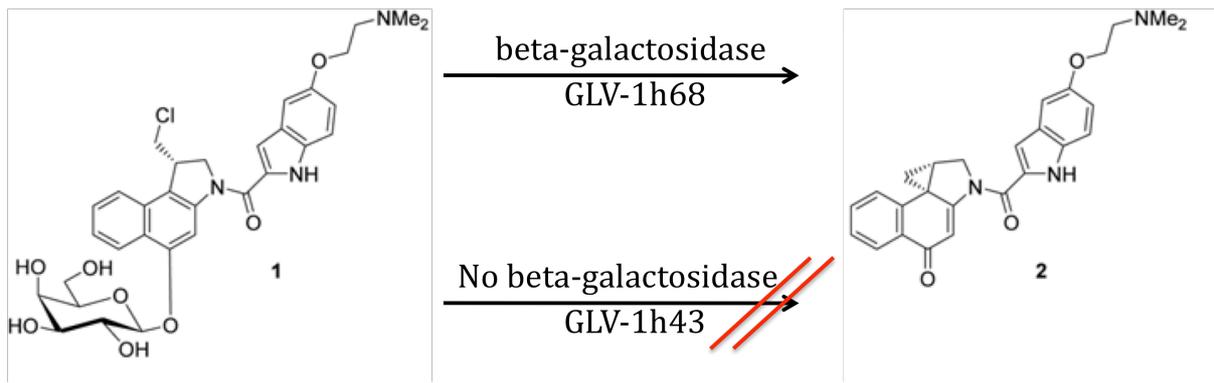
Abbildung 2.3 Viruskonstrukt GLV-1h43

Das Viruskonstrukt GLV-1h43 trägt im TK-Lokus anstelle der für das Markerprotein LacZ kodierenden Sequenz eine nichtrelevante Gen-Kassette.

Alle nicht publizierten rVACV wurden von Dr. Q. Zhang und Dr. N. Chen der Genelux Corp. San Diego, USA, konstruiert und zu Analysezwecken der AG Szalay der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

2.7 Verwendetes Prodrug

Bei dem verwendeten Prodrug handelt es sich um ein β -Galaktosidase-aktivierbares nicht toxisches glykosidisches Derivat basierend auf dem natürlich vorkommenden Antibiotikum Duocarmycin SA.



inactive prodrug

active drug

Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der enzymatischen Umwandlung des nicht toxischen prodrugs in ein aktives Drug basierend auf das Antibiotikum Duocarmycin SA.

Dieses *seco*-Analogon wurde wie kürzlich beschrieben synthetisiert [151] und von J. Marian von Hof, Dr. Birgit Krewer, Prof. Dr. Dr. Lutz F. Tietze zu Analysezwecken der AG Szalay der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

2.8 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Hersteller
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Mini-PROTEAN Elektrophoresis System	BIO-RAD, München
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
DNA-Gelelektrophorese Kammer	BIO-RAD, München
Durchflusscytometer	Beckman Coulter, Krefeld
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filterspitzen	Hartenstein, Würzburg
Filmkassette	Dr.Goos suprema, Heidelberg
Flow-Hood LaminAir	Kendro, Langenselbold

Geldokumentation	PeqLab, Erlangen
Glaswaren	Schott, VWR Brand
Infrarot-Lampe	Petra, Burgau
Kanülen	Braun, CH-Emmenbrücke
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Lysing Matrix D Tubes	MP Biomedicals, Heidelberg
Mikroskope:	
• DMIRB	Leica, Wetzlar
• Leica 16 MZ 16 FA	Leica, Wetzlar
• Leica TCS SP2	Leica, Wetzlar
• Axiovert 200M	Zeiss, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
NightOWL LB 981	Berthold, Bad Wildbad
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Objekträger und Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg
PCR Biometra	Schleicher & Schuell, Dassel
Power-Pac Basic	BioRad, München
Rasierklingen	Wilkinson Sword GmbH, Solingen
Reagenzgefäße: 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgefäße: 15 und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Rotilabo®-Kassetten für Biopsien	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilme	Konica, München
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Schredder Fastprep	Thermo Scientific, Karlsruhe
Semi-Dry Blotapparatur	Peqlab, Erlangen

Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Schüttler	Heidolph, Schwabach
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann Coulter, Krefeld
Vibratom	Leica, Wetzlar
Vortex	Labinco, NE-Breda
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturinkubatoren	RS Biotech, UK-Irvine
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Schwerin

2.9 Versuchstiere

HSD: Atthymic Nude- <i>Foxn1^{nu}</i> NU/NU	(Harlan Winkelmann, Borchon)
Transgene luziferase-exprimierende	
FVB-Mäuse	zur Verfügung gestellt vom Forschungslabor A. Beilhack (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg)

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

2.10 Software

Adobe Photoshop CS3 EXTENDED	Bildbearbeitung
Axiovision 4.5	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Zeiss)
Magellan5	ELISA-Reader
Metamorph Imaging	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Leica)
Microsoft Word 2008 für Mac	Textverarbeitung
Microsoft Excel 2008 für Mac	Diagramme und Statistik
Leica IM1000 4.0	Bildaufnahme (Stereomikroskop, Leica)
Leica Confocal 2.16	Bildaufnahme (Konfokales Mikroskop, Leica)
WinLight	Biolumineszenz-Imaging
WinMDI	Durchflusszytometrie-Auswertung

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzellen

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood (LaminAir, Kendro) durchgeführt. Im Rahmen der Arbeit verwendete eukaryontische Zellen wurden in beschichteten Zellkulturflaschen oder –schalen in einem sensorgesteuerten Inkubator (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Die spezielle Oberflächenbeschichtung ermöglicht den adhärent wachsenden Zellen eine Anheftung über extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Laminin und Kollagen. Verwendete Zellkulturmedien, Lösungen und Gebrauchsmaterialien wurden durch vorangehendes Sterilisieren keimfrei gehalten. Zudem kann zur Vorbeugung gegen bakterielle Kontaminationen den Medien ein Antibiotikum zugefügt (Penicillin/Streptomycin) werden. Fötales Kälberserum (FKS) wurde vor Zugabe zum Medium 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Da Teilung und Wachstum nicht unbegrenzt erfolgen, sondern bei Konfluenz der Zellen stagnieren, werden diese vor Erreichen von 100 % Konfluenz passagiert. Eine regelmäßige Erneuerung des Kulturmediums nach zwei bis drei Tagen stellt sicher, dass noch ausreichend Inhaltsstoffe für das Wachstum der Zellen vorhanden sind sowie Abfallprodukte abgestorbener Zellen entfernt werden. Der im Medium enthaltene pH-Indikator zeigt durch einen Farbumschlag von rot nach gelb den fortschreitenden Verbrauch Nährstoffe des Mediums an.

3.1.1.1 Kultivierung von CV-1-Zellen

CV-1-Zellen sind sehr stoffwechselaktiv und werden daher alle drei bis vier Tage passagiert. Hierbei wird zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Zellkulturflaschenboden adhärent wachsenden Zellen mit Hank's BSS gewaschen, um abgestorbene Zellen und Mediumreste zu entfernen. Daraufhin werden die Zellen 6 min mit Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet Peptidbindungen hinter bestimmten Aminosäuren wodurch die proteolytische Ablösung der Zellen hervorgerufen wird. Durch zusätzliches kräftiges Klopfen an das Kulturgefäß wird das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden unterstützt. Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion

durch Zugabe von frischem Medium, welches die Trypsin-Inhibitoren Calcium und Magnesium enthält gestoppt. Zellkontakte werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Je nach Bedarf wird in einem bestimmten Verhältnis in ein neues Kulturgefäß ausgesät.

3.1.1.2 Kultivierung von GI-101A-Zellen

Das Passagieren dieser Zellen erfolgte analog der CV-1 Zellkultivierung, jedoch wird erst nach 5-6 Tagen eine konfluente Zellschicht erreicht.

3.1.1.3 Kultivierung von MDA-MB-231-CBG-Zellen

Die Kultivierung erfolgt analog der Kultivierung von GI-101A-Zellen.

3.1.1.4 Kultivierung von HT-29-CBG-Zellen

Auch die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte analog der CV-1 Zellkultivierung. Jedoch handelt es sich bei diesen Zellen um eine stabil transfizierte Zelllinie, welche die click beetle Green Luciferase exprimiert. Das codierende Gen wurde zusammen mit einem Blastizidin-Selektionsmarker von V. Raab durch lenti-virale Transduktion in das Genom der Ursprungszelllinie HT-29 integriert. Die entstandene Zelllinie HT-29-CBG wurde freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Expression der Luciferase ermöglicht die Detektion der Zellen, basierend auf einer Oxidation, bei der es zur Biolumineszenz kommt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurde dem Medium als Selektionsmarker das Antibiotikum Blastizidin in einer Konzentration von 1:1000 zugesetzt und die Zugabe alle 2-3 Tage wiederholt.

3.1.1.5 Kultivierung von J774-Zellen

Bei dieser aus Balb/c-Maus stammenden Makrophagen-Zelllinie erfolgte die Ablösung der Zellen vom Kulturgefäß nicht enzymatisch durch Inkubation mit Trypsin-EDTA, vielmehr wurden die adhärennten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig gelöst und je nach Versuchsbedingungen in verschiedenen Konzentrationen ausgesät.

3.1.1.6 Kultivierung von L-929-Zellen zur Gewinnung von L929-konditioniertem Medium

Das Wachstumsverhalten dieser fibroblastenähnlichen Bindegewebszellen ist dem Verhalten von CV-1-Zellen sehr ähnlich, was eine analoge Kultivierung ermöglicht. Jedoch wurde bei diesen Zellen nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz für 7 Tage kein frisches Kulturmedium zugegeben. Nach diesen 7 Tagen wurde das Kulturmedium entnommen, steril filtriert und bei -20 ° C gelagert.

3.1.1.7 Isolation und Kultivierung primärer Knochenmarksmakrophagen

Primäre Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) wurden von 6-8 Wochen alten weiblichen FVB-Mäusen gewonnen. Vor Isolation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Extremitäten mit EtOH desinfiziert und die beiden Ober- sowie Unterschenkelknochen freipräpariert. Die Zellen des Knochenmarks wurden mit Hilfe einer 27 G-Kanüle und einem Volumen von 10 ml PBS aus dem Knochen gespült. Die isolierten Zellen wurden durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt und für 10 min bei 1000 rpm (25 ° C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml BMMΦ-Isolationsmedium aufgenommen und auf fünf 150 mm Kulturschalen aufgeteilt. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgenommen und durch Kultivierungsmedium ersetzt. Während der weiter folgenden Kultivierung wurde je nach Bedarf das Medium erneuert. Bei Erreichen einer 95%igen Konfluenz wurden die Zellen zunächst für 10 min mit Accutase behandelt (Brutschrank, 37 ° C) und anschließend mithilfe eines Zellschabers vorsichtig vom Boden der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension wurde je nach weiterer Anwendung entsprechend behandelt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Viele Versuche sowie das Passagieren der Zellen machen eine genaue Bestimmung der Zellzahl in der vorhandenen Zellsuspension notwendig. Zu diesem Zweck wird die Neubauer-Zählkammer eingesetzt, ein Objektträger, der über ein eingezühtes Gitternetzwerk verfügt. Mit dem aufgelegten Deckgläschen ergibt sich ein definiertes Flüssigkeitsvolumen, in dem sich die Zellen befinden. Das Gitter besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate eingeteilt sind. Bei der Bestimmung der Zellzahl wird aus jedem großen Quadrat jeweils eine Reihe aus 4 kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Berechnung der vorhandenen Zellzahl erfolgt nach folgender Formel:

Zellzahl/ml = gezählte Zellzahl x 10000 x Verdünnungsfaktor der Zellsuspension

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen werden nach Erreichen einer 90-100%igen Konfluenz einmal mit BSS gewaschen und enzymatisch vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Nach dem Zentrifugieren (1300 rpm, 5 min) wird das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und die Gesamtzellzahl bestimmt. Je nach Zelllinie werden Aliquots von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml in Kryoröhrchen zunächst für 4 h bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ und weiter über Nacht bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Zur dauerhaften Lagerung werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium:

90 % Kulturmedium

10 % DMSO

Zum Auftauen werden die Zellen für ca. 30 s in einem Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach Zugabe von erwärmtem Kulturmedium werden die Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 1 min). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wird das Medium ausgetauscht, um tote Zellen zu entfernen.

3.1.4 Mycoplasmen-Nachweis in Zellkulturen

Mycoplasmen sind parasitär lebende Bakterien und führen aufgrund ihrer geringen Größe in bis zu 30 % aller Zellkulturen zu einer verdeckten Kontamination. Für ein Unterbinden ihres negativen Einfluss auf Wachstum, Stoffwechsel und Lebensfähigkeit der kultivierten Zellen, ist es sinnvoll, auch etablierte Zelllinien in regelmäßigen Abständen einem Mycoplasmen-Nachweis zu unterziehen.

Hierfür wurde eine Vielzahl von Techniken entwickelt. Ein schneller und effektiver Nachweis mithilfe des Venor®GeM Kits durch konventionelle PCR.

3.1.5 MTT-Proliferations-Assay

Der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]-Assay zum Messen der Zellproliferation wurde zum ersten Mal von beschrieben [152]. Nach dem Anfärben vitaler Zellen werden diese durch die Zugabe von 1N HCl in Isopropanol lysiert. Die colorimetrische Auswertung erfolgt in 96-well-Platten mittels eines ELISA-Readers (optische Dichte bei 570 nm).

3.2 Virologische Techniken

3.2.1 Infektion von Säugierzellen mit Vaccinia-Viren

Die Infektion mit Vaccinia-Viren erfolgt bei 95 % Konfluenz der Zellen Kulturschalen oder -platten. Die Berechnung der benötigten Virusmenge erfolgt anhand folgender Formel:

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

Dabei entspricht die gewünschte Infektionsrate (MOI, multiplicity of infection) der Rate der infektiösen Partikel pro Zelle. Die Angabe MOI 1 bedeutet somit, dass theoretisch jede Zelle von einem Viruspartikel infiziert wird, bei MOI 0,5 entspricht dies einer Infektionsrate von 0,5 Viren pro Zelle bzw. die Infektion jeder zweiten Zelle.

Für das Lösen von eventuell auftretenden Virus-Aggregaten, wird die Virus-Suspension unmittelbar vor der Infektion dreimal für je 30 s bei 4°C sonifiziert. Zu infizierende Zellen werden mit Hank's BSS gewaschen. Anschließend wird die zuvor nach obiger Formel berechnete Anzahl an Viren in Medium suspendiert und zu den Zellen gegeben. Um zu geringe Infektionsvolumina zu vermeiden, werden gegebenenfalls Verdünnungen angesetzt. Die infizierten Zellen werden für eine Stunde in den Inkubator gestellt und im Abstand von jeweils 20 min leicht geschwenkt, ein Vorgang der erneut eine Durchmischung des Infektionsmediums gewährleistet. Nach der einstündigen Inkubation wird das Infektionsmedium abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Bezogen auf die Studien mit dem prodrug-Analog von Duocarmycin SA wurde dem frischen Kulturmedium, je nach weiterem Versuchsverlauf, das zu analysierende prodrug in einer Endkonzentration von 10 nM zugesetzt.

3.2.2 Virusamplifikation und Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten

Für umfangreiche Versuchsansätze, welche eine große Menge an Virus benötigen, ist es möglich, das vorhandene Virus zu amplifizieren und über einen Saccharose-Gradienten aufzureinigen.

Hierzu werden zunächst, je nach gewünschter Ausbeute an Virus, zwei bis zehn große Kulturflaschen mit CV-1-Zellen ausgesät, wobei ein Medium mit 2 % FKS ausreichend ist. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 90-100 % mit dem zu amplifizierenden Virus infiziert (MOI 0,1) und der Infektionsverlauf in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop beobachtet. Dies ist nötig um zu verhindern, dass zu viele Zellen bereits vor der Ernte schon sterben. Der optimale Zeitpunkt ist je nach Replikationsfähigkeit des Virus ein bis zwei Tage nach der Infektion.

Zunächst werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (3000 rpm, 5 min, RT) wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 12ml 10mM Tris-HCl (pH 9,0) resuspendiert. Die folgenden Schritte werden durchgehend auf Eis durchgeführt um eine Degradierung des Virus zu vermeiden. Mithilfe eines Glas-Dounce-Homogenisators wurden die Zellen homogenisiert und die Suspension zum Pelletieren der Zellkerne erneut abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 5-10 °C). Der Überstand wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und das Pellet erneut in 3 ml 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) gelöst. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt (3000 rpm, 5 min, 5-10°C) werden die erhaltenen Überstände vereint und für 1 min bei 4 °C sonifiziert (Sonifier Branson 450). Dieser Vorgang wird mit einer

Pause von jeweils 30 sec dreimal wiederholt. Das Lysat wird anschließend auf ein 36%iges Saccharose-Kissen aufgetragen und für 2 Stunden in einer gekühlten Ultrazentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Virus-Pellet in 1 ml 1 mM Tris-HCl (pH 9,0). Das Viruslysat wird erneut wie bereits beschrieben sonifiziert und auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Dieser wird einen Tag zuvor vorsichtig aus Saccharose-Lösungen verschiedener Konzentrationen (40, 36, 32, 28, 24 %) gegossen und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der überschichtete Gradient wird für 50 min (12000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Nach diesem Schritt der Aufreinigung erhält man eine milchige Virusfraktion in der Mitte des Zentrifugationsgefäßes, welche vorsichtig isoliert und weggefroren wird. Viren, die sich im Pellet befinden, werden in 1 ml 1 mM Tris-HCl (pH 9,0) resuspendiert, erneut sonifiziert und auf einen weiteren Gradienten aufgetragen. Die bei diesem Schritt erhaltene milchige Virusbande wird mit der zuvor isolierten vereint und das Zentrifugationsgefäß mit 1mM Tris-HCl aufgefüllt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (60 min, 12000 rpm, 4°C) wird das erhaltene aufgereinigte Virus-Pellet in 1 ml 1 mM Tris-HCl gelöst und erneut sonifiziert, um anschließend eine homogene Verteilung auf 200-250 µl Aliquots zu ermöglichen.

Die Bestimmung des erhaltenen Virustiters erfolgt mittels eines Plaque-Assays der im Folgenden beschrieben wird.

3.2.3 Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Assay

Der Plaque-Assay dient der Bestimmung des Virustiters und wird mit konfluenten CV-1-Zellen in 24-well-Platten durchgeführt. Von jeder zu analysierenden Probe wird nach dem Sonifizieren zunächst eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} angelegt. Handelt es sich bei der zu analysierenden Probe um aufgereinigtes Virus erfolgt eine Verdünnung bis zu einem Verhältnis von 10^{-9} .

Die Zellen werden gewaschen und mit 250 µl der jeweiligen Verdünnung infiziert. Pro Verdünnung werden zwei wells infiziert und in der Endauswertung ein Mittelwert der beiden gebildet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit des Virusmediums wird je 1 ml Carboxymethylcellulose-Medium (CMC-Medium) zugegeben. Die Carboxymethylcellulose bildet ein engmaschiges Netzwerk aus Cellulosefasern und verhindert ein Ausbreiten der Viruspartikel, wodurch nach der Färbung isolierte Plaques erkennbar sind.

Die Färbung wird nach zweitägiger Inkubation durch Zugabe von 250 µl Kristallviolett-Färbelösung durchgeführt. Nach einigen Stunden Inkubation, gegebenenfalls auch über

Nacht, kann der Farbstoff im Wasserbad abgewaschen werden. Die Platten werden getrocknet und die einzelnen Virus-Plaques gezählt.

Anhand der ausgezählten Plaques wird der Virustiter berechnet:

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

3.2.4 Analyse des viralen Replikationsverhaltens in Zellen

Zur Durchführung dieses Versuchs werden 90-100 % konfluente GI-101A- bzw. CV-1-Zellen in 10 cm-Petrischalen oder alternativ in 24-well-plates benötigt. Diese werden mit MOI 0,5 infiziert. Das Replikationsverhalten wird zu den Zeitpunkten 1, 6, 12, 24, 30, 36, 48 und 72 hpi untersucht, indem zunächst der Überstand in ein 15 ml-Röhrchen gegeben wird. Die Probe wird bei -80 °C weggefroren. Auf die Zellen wird 10 ml frisches Kulturmedium gegeben. Daraufhin werden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst und ebenfalls weggefroren.

Auch hier werden Zelllysate und Überstände vor der weiteren Verwendung, der Bestimmung des Virustiters, dreimal aufgetaut und wieder bei -80 °C eingefroren.

3.3 Protein-chemische Analysemethoden

3.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Die Infektion der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte bei 95 % Konfluenz mit einer MOI von 0,5 in den entsprechenden Kulturgefäßen, je nach weiterem Versuchsverlauf. Als Negativkontrolle wurde ein Versuch mit mock-infizierten Zellen parallel durchgeführt.

Sechs, 12, 24, 48 oder 72 hpi wurden die Zellen geerntet und in SDS-Probenpuffer oder Protein-Lysepuffer lysiert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit Hank's BSS gewaschen. Bei Verwendung des Protein-Lysepuffers wurde die erste Hälfte des verwendeten Lysepuffer-Volumens auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und das Kulturgefäß ein zweites Mal mit der 2. Hälfte des Protein-Lysepuffers gespült.

Um die Zellen aufzuschließen, wird das Lysat 30mal mit einer Kanüle aufgezogen. Bei der anschließenden zweimaligen Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4 °C) werden die Zellbestandteile abzentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Zelllysate wird anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur weiteren Analyse der im Zelllysate enthaltenen Proteine ist es notwendig, die Proteinkonzentration zu bestimmen. Dies erfolgt nach dem von Bradford (1976) beschriebenen Verfahren. Grundlage dieser Methode ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm zu 595 nm in Gegenwart von Proteinen unter sauren Bedingungen.

Zunächst wird eine Eichgerade mit Hilfe von definierten Proteinmengen (0/1/ 0,2/0,4/0,6/0,8 und 1,0 µg/µl) mit BSA erstellt, um eine spätere Konzentrationsberechnung zu ermöglichen. Zur Messung gibt man 5 µl des Lysats zu 95 µl H₂O_{bd} und vermischt diesen Ansatz mit 900 µl Bradford-Reagenz. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben in Einmalküvetten überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Bradford-Reagenz:

50 mg Coomassie Brilliant Blue

25 ml Ethanol 96 %

50 ml Phosphorsäure 85 %

25 ml H₂O_{bd}.

→ 15 min rühren, anschließend durch zwei Filter filtrieren

3.3.3 Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen anhand des Molekulargewichts und ist inzwischen zu einer der Standardmethoden der modernen Biowissenschaften geworden. Hierzu verwendet man ein Gel aus Acrylamid und Bisacrylamid, dessen Porengröße anhand der Acrylamidkonzentration variiert werden kann, abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine. Zunächst wird unter

Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) die Raumstruktur der Proteine zerstört und mittels des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken reduziert. Zudem führt die Zugabe von SDS zu einer, proportional dem Molekulargewicht der Proteine, negativen Ladung. Beide Reagenzien sind Bestandteile des SDS-Probenpuffers, der vor dem Gellauf zu den Proben pipettiert wird.

Die eigentliche Auftrennung erfolgt im Trenngel über ein gleichmäßiges elektrisches Feld zwischen Anode und Kathode, wobei die Proteine durch ihre SDS-induzierte negative Ladung zur positiven Anode wandern. Da die Ladungen praktisch gleich sind, ist das einzige Kriterium, welches die Wandergeschwindigkeit beeinflusst, das Molekulargewicht.

Herstellung der Gele:

In den Zwischenraum zwischen 2 Glasplatten, die durch Abstandshalter getrennt sind, wird zunächst das Trenngel gegossen. Die Katalysatoren APS und TEMED sorgen für die Polymerisation der Acrylamid- und Bisacrylamidmonomere, wodurch ein stark vernetztes Gel entsteht. Zur Schaffung einer glatten Oberfläche, wird die Trenngel-Lösung mit ca. 1 ml Isopropanol beschichtet, bis die Polymerisation abgeschlossen ist. Danach wird das Isopropanol abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Kamm eingesetzt.

Tabelle 3.1 Rezeptur für die Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O _{bidest.}	6,8 ml	4 ml	6,1 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	5,5 ml	8,3 ml	1,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	4,16 ml	4,2 ml	/
0,5 M Tris pH 6,8	/	/	2,5 ml
10 % SDS	166 μ l	167 μ l	100 μ l
10 % APS	83 μ l	83 μ l	50 μ l
TEMED	8,3 μ l	8,3 μ l	10 μ l

Nach der Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm herausgezogen und das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt, deren Kammern mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt werden.

Die Proben mit dem SDS-Probenpuffer werden vor Beladung des Gels für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die erste Tasche des Gels wird der Protein-Marker zur späteren Identifizierung der Proteine pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei Spannungen von bis zu 180 V.

3.3.4 Western-Blot: Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Da Proteine im Inneren der Polyacrylamid-Matrix des Gels nicht für makromolekulare Liganden, z.B. Antikörper, zugänglich sind, müssen sie für genauere Analysen elektrophoretisch auf eine immobilisierende Membran transferiert werden [153]. Der Name Western-Blot geht auf den Erfinder der Blotting Technik E. Southern zurück, der 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern-Blot eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von RNA-Fragmenten Northern-Blot und das Protein-Blotting als Western-Blot bezeichnet.

Der Transfer erfolgt in einer Semi-Dry-Blotapparatur, in der die denaturierten Proteine durch Wanderung im Ionengradienten auf die Membran überführt werden, auf welcher sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden zunächst sechs Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und kurz in Towbin-Puffer getränkt.

Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgt luftblasenfrei nach folgendem Schema:

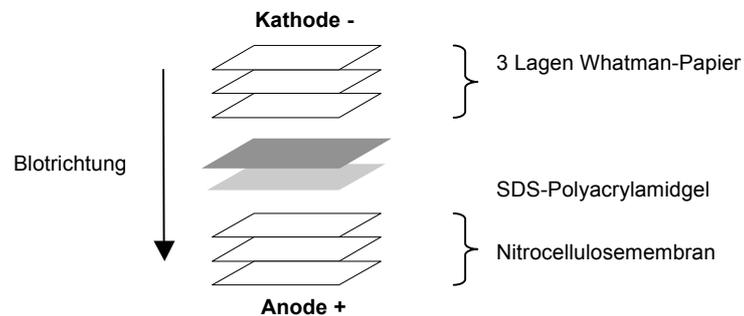


Abbildung 3.1 Aufbau einer Semi-Dry-Blot-Apparatur

Die für den anschließenden 2-stündigen Proteintransfer angelegte Stromstärke ist von der Größe des Gels abhängig und wird nach folgender Formel berechnet:

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

3.3.5 Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran

Zur Überprüfung der Effizienz des Proteintransfers, wird die Membran für einige Minuten mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Anschließend wird vorsichtig mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ gewaschen, bis rote Proteinbanden auf weißem Hintergrund erkennbar sind. Der Vorteil dieser Färbemethode ist ihre Reversibilität.

Ponceau S-Färbelösung:

0,5 % (w/v) Ponceau S

1 % (v/v) Essigsäure

3.3.6 Immundetektion mittels ECL-Methode

Die Immundetektion mittels ECL-Methode ermöglicht es, auf Membranen übertragene Proteine zu detektieren und visualisieren. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primär-

Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. Die anschließende Detektion erfolgt über Bindung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers.

Die ECL-Methode ist eine sehr sensitive, nicht-radioaktive Lumineszenz-Nachweismethode für spezifische Antigene, die direkt oder indirekt mit HRP-markierten („horseradish peroxidase“, eine Peroxidase aus Meerrettich) Antikörpern konjugiert sind. Diese Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol zu 5-Aminophthalsäure unter Katalysatorwirkung von Wasserstoffperoxid. Diese Oxidation des Luminols bewirkt eine Lichtemission, die durch die Exposition mit einem Röntgenfilm erfasst werden kann.

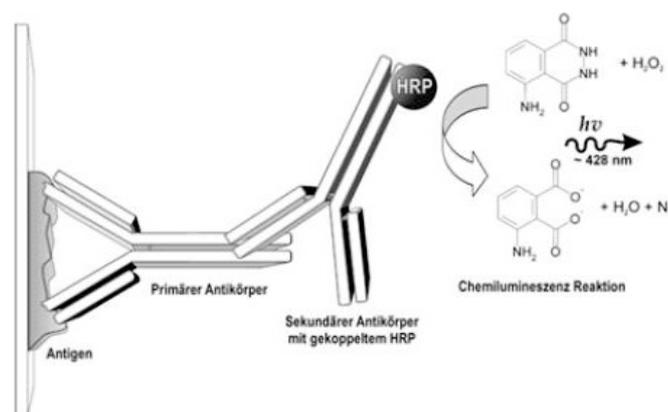


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der ECL-Nachweismethode zur Detektion spezifischer Antigene

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern und eine spezifische Detektion zu ermöglichen. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein oder chemischen Polymer. Dafür eignen sich Lösungen von Milchpulver, BSA (bovine serum albumin), Gelatine und andere Proteine. Dieser Vorgang wird 1 h bei RT bzw. ÜN bei 4 °C durchgeführt.

Anschließend wird die Membran für 1,5 h mit einer in 1x TBT verdünnten Antikörper-Lösung behandelt. Einige darauf folgende Waschschrte entfernen schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran.

Danach erfolgt eine einstündige Inkubation des sekundären, HRP-gekoppelten Antikörpers, welcher ebenfalls in 1 x TBT verdünnt wurde.

Zur Reduzierung des Hintergrunds werden vor der Visualisierung ungebundene Antikörper durch Waschen von der Membran entfernt. Zur Detektion wird die ECL-Lösung auf die

Membran gegeben und unter leichtem Schütteln für 1 min inkubiert. In der Dunkelkammer wird anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach verwendeten Antikörpern die optimale Expositionszeit ermittelt.

Für ein sauberes Ergebnis sollten alle Antikörper-Lösungen möglichst frisch angesetzt werden. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Membran immer vollständig mit Flüssigkeit benetzt ist. Zur gleichmäßigen Verteilung der Lösungen auf der Membran, werden alle Inkubationsschritte auf dem Schüttler durchgeführt.

3.3.7 Quantifizierung der MCP-1 Expression mit Hilfe des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Das ELISA-Testverfahren ist eine häufig angewandte immunologische Nachweismethode zur Detektion sowie Quantifizierung von Proteinen, Peptiden, Antikörpern oder Hormonen, mittels einer enzymatischen Farbreaktion. Hierbei zählt das Sandwich-Elisa-Verfahren als sehr spezifisches, sensitives und robustes Format. Das Analyt wird zwischen 2 primären Antikörpern gebunden, dem Capture-Antikörper und dem Detektions-Antikörper.

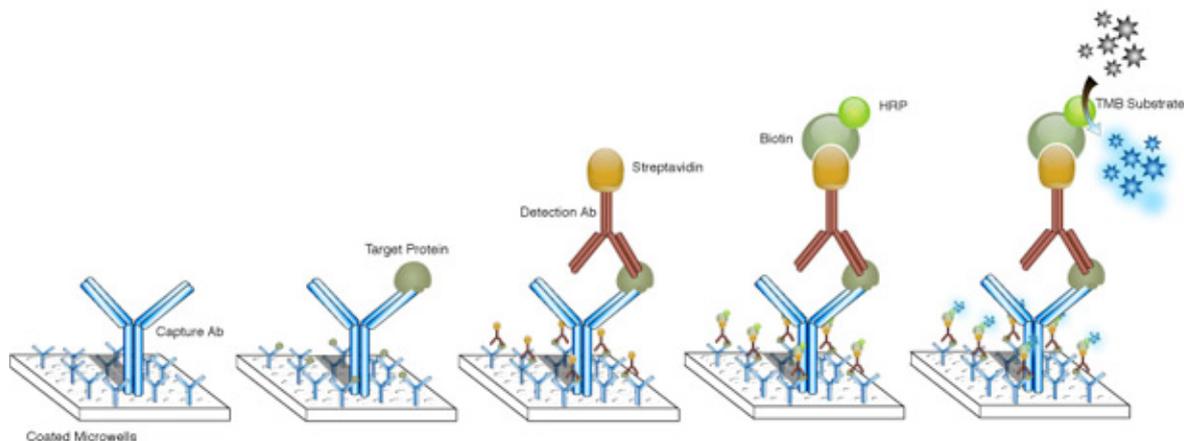


Abbildung 3.3 Aufbau eines direkten Sandwich ELISA's (<http://www.epitomics.com>)

Zunächst wurde eine 96-well-Platte mit dem in Coating-Puffer verdünnten Capture-Antikörper (anti-Maus MCP-1/ 1:200 Verdünnung in Assay Diluent/ 100 µl pro well) beschichtet, mit einer Klebefolie abgedichtet und ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird diese 4mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und schließlich für eine Stunde bei RT mit jeweils 200 µl Assay Diluent inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren und den Hintergrund zu verringern. Während dieses Vorgangs sowie den weiteren Versuchsschritten, wurde die abgedichtete Platte zusätzlich leicht geschüttelt, um die

Sensitivität des Testverfahrens zu erhöhen. Während der einstündigen Inkubation wurde eine Standard-Verdünnungsreihe des rekombinanten MCP-1 Proteins von 4000 – 62,5 pg/ml angelegt. Nach dem Blockierungsschritt wurde dieser Standard sowie die zu untersuchenden Proben im Duplikat aufgetragen und für 3 h bei RT inkubiert. Es folgten 4 weitere Waschschrte und eine einstündige Inkubation mit dem verdünnten Detection-Antikörper (biotinylierter anti-Maus MCP-1/ 1:200 Verdünnung in Assay Diluent/ 100 µl pro well). Nach weiterem viermaligem Waschen erfolgte eine 30minütige Inkubation mit 100 µl Av-HRP Lösung (Straptavidin-HRP Antikörper, 1:200 Verdünnung in Assay Diluent) unter Schutz vor direkter Lichteinstrahlung. Die Platte wurde anschließend 5mal gewaschen, wobei hierbei während der einzelnen Waschschrte der Puffer für 30 s bis 1 min im well belassen wurde, um den Hintergrund der späteren Farbreaktion zu minimieren. Die frisch gemischte TMB Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin) wurde zugegeben und je nach Stärke der blauen Farbentwicklung für bis zu 15 min im Dunklen inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2 N H₂SO₄ pro well abgestoppt, wodurch ein Farbumschlag von Blau auf Gelb erfolgt. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt. Anhand der Standard-Verdünnungsreihe kann mit Hilfe einer Geradengleichung anschließend die Konzentration der einzelnen Proben ermittelt werden.

Unter Verwendung dieser Methode wurden Zellkultur-Überstände sowie Tumor- und Organlysate auf die Expression von MCP-1 hin analysiert.

3.3.8 Nachweis der Expression sowie der enzymatischen Aktivität des Markerproteins β -Galactosidase

Zur Konzentrations- und Aktivitätsbestimmung wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe des rekombinanten Enzyms β -Galactosidase (aus *Aspergillus oryzae*) angelegt. Anschließend wurden die beiden Färbelösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und die zu untersuchenden Proben (Proteinlysate, Zellkultur-Überstände, Gewebe-Proteinlysate) sowie die einzelnen Verdünnungen des Standards mit der Färbelösung inkubiert (1 h, RT). Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte an einem Tecan Absorbance Reader.

Für die X-Gal-Färbung von in Agarose eingebetteten Tumorgewebeschnitten oder von Zellen auf Deckgläschen erfolgte durch Inkubation ÜN. Nach mehreren Waschschrten mit PBS wurden diese in 80 % Glycerin eingebettet.

3.4 Immunhistochemische Methoden

3.4.1 Immunhistochemische Detektion der MCP-1-Expression in infizierten Säugerzellen

Für den optischen Nachweis der MCP-1 Expression wurden zunächst GI-101A Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Um eine bessere Adhäsion der Zellen auf den Deckgläschen zu erzielen, wurden diese zunächst für einen Tag mit 1 N HCl behandelt und im Anschluss mehrmals mit 70 % EtOH gewaschen, autoklaviert und in einem Trockenschrank vollständig getrocknet. Vor Aussäen der Zellen wurden die Deckgläschen zudem mit 0,01 % Poly-L-Lysin in 1x PBS für 1h bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz wurden die Zellen mit den rekombinanten Vaccinia-Viren GLV-1h80, GLV-1h68 (MOI 0,5) sowie mock-infiziert. 24 hpi wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Deckgläschen 2mal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte mit 4 % PFA für 9 min bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurde das Zelllayer mit Blockier- und Permeabilisierungslösung (1x PBS, 5 % FKS, 0,1 % Triton X-100) für 15 min bei RT inkubiert. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem in Blockier- und Permeabilisierungslösung verdünnten Primär-Antikörper (anti-Maus MCP-1/ 1:100) für 1 h in einer Feuchtekammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurde erneut für 15 min blockiert und permeabilisiert, bevor der Sekundär-Antikörper hinzugegeben wurde (Cy3-gekoppelter anti-Ziege Antikörper, 1:200). Nach 45minütiger Inkubation wurden die Deckgläschen nach dreimaligem Waschen mit Moviol eingebettet. Das rote Signal des fluoreszierenden Carbocyanin-3-Farbstoffes konnte mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops detektiert werden.

3.4.2 Immunhistochemische Detektion der MCP-1 Expression in Vaccinia-Virus-infiziertem Tumorgewebe

Um die Virus-induzierte MCP-1-Expression *in-vivo* im infizierten Tumorgewebe zu untersuchen, wurden die bei -80 °C gelagerten isolierten Tumore zur Fixierung zunächst im gefrorenen Zustand in eine 4%ige PFA-Lösung gegeben und ÜN bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Tumore halbiert und in 5 % LMP-Agarose eingebettet. Nach Aushärtung der Agarose bei 4°C wurden am Vibratom Gewebeschnitte von 100 µm angefertigt, welche in PBS bei 4 °C gelagert wurden. Die Gewebeschnitte wurden für 1 h (RT) in 1x PBS mit 0,3 % Triton X-100 und 5 % FKS permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend erfolgte die

Inkubation mit dem Primär-Antikörper (anti-MCP-1, 1:100 in PBS) ÜN bei RT auf dem Schüttler. Nach 3 zehnmütigen Waschsritten (1x PBS) wurden die Gewebeschnitte für 5 h mit dem Sekundär-Antikörper (Cy3-gekoppelter anti-Ziege, 1:200 in 1x PBS) inkubiert und anschließend erneut gewaschen (5 x 10 min, 1x PBS). Anschließend wurden die Schnitte für 1 Tag in 60%iger Glycerin-Lösung in 1x PBS inkubiert (4 °C) und schließlich in 80%iger Glycerin-Lösung auf Objektträger eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, MZ16F) ausgestattet mit einer CCD-Kamera (Leica, DC500), einer Quecksilber-UV-Quelle und dem Programm Leica IM1000 4.0.

3.4.3 Histologie

3.4.3.1 Fixierung und Dehydrierung des Tumorgewebes

Die Paraffin-Einbettung erfordert eine aufwendigere Vorbereitung des Gewebes, jedoch wird eine sehr gute Strukturhaltung erzielt und es können Schnitte von bis zu 10 µm hergestellt werden. Vor der Fixierung des Tumorgewebes wurden Gewebeschnitte von ca. 3 mm Dicke geschnitten, in Rotilabo®-Kassetten für Biopsien eingelegt und ÜN in 10 % Formalin-Lösung fixiert (RT). Die Dehydrierung des Gewebes erfolgte durch eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe. Hierzu wurden die Gewebeproben für jeweils 1 h in den folgenden Lösungen inkubiert:

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

Bis zur Fortsetzung der Probenvorbereitung erfolgt eine Lagerung in 100 % EtOH bei -20 °C.

3.4.3.2 Einbettung der Gewebeproben in Paraffin

Für eine möglichst homogene spätere Einbettung des Gewebes wird dieses für jeweils 1 h in den folgenden Lösungen vorbehandelt:

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

Die Behandlung mit reinem Paraffin bei 58 °C erfolgt mit dreimaligem Wechsel der Paraffin-Lösung für 3 Stunden, um eine vollständige Infiltrierung des Gewebes sicherzustellen.

Die Gewebeproben wurden schließlich in gewünschter Orientierung ausgerichtet und in Paraffin-Blöcke gegossen. Nach vollständiger Aushärtung der Blöcke können die Gewebeschnitte der gewünschten Schnittdicke präpariert werden.

3.4.3.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Die optimalen Bedingungen und Einstellungen am Mikrotom müssen je nach Qualität des Gewebematerials angepasst werden. Zunächst wurden die Blöcke in die vorgesehene Fixierung eingespannt und der Block solange geschnitten werden, bis eine homogene Schnittfläche durch das gesamte Gewebe entstanden ist. Die folgenden seriellen Schnitte wurden vom Messer mithilfe eines Pinsels vorsichtig entfernt und in ein kaltes Wasserbad gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in ein erwärmtes Wasserbad überführt (40-50 °C). Durch die erhöhte Temperatur kommt es zur Expansion des Paraffins und schließlich zur Streckung der Gewebepreparate, welche anschließend vorsichtig auf einen Glasobjektträger aufgebracht werden können. Die Schnitte wurden zunächst auf einer Heizplatte getrocknet und schließlich ÜN in einem Heizerschrank (37 °C) inkubiert.

Anschließend können die Paraffinschnitte an einem trockenen kühlen Ort (4-20 °C) gelagert werden.

3.4.3.4 Deparaffinierung und Rehydrierung

Die Deparaffinierung erfolgte durch Inkubation der Objektträger bei 55 °C für 10 min. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch eine Xylol-Vorbehandlung und eine anschließende, in der Konzentration absteigende Alkoholreihe:

1. Xylol, 3 min
2. Xylol, 3 min
3. Xylol, 3 min
4. 100 % EtOH, 3 min
5. 100 % EtOH, 3 min
6. 100 % EtOH, 3 min
7. 95 % EtOH in H₂O, 3 min
8. 80 % EtOH in H₂O, 3 min
9. H₂O_{bd}, 5 min

3.4.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

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

Die Färbung wurde nach folgendem Ablauf durchgeführt:

1. Hämatoxylin, 3 min
2. Waschen der Objektträger in H₂O_{bd}
3. Leitungswasser, 5 min
4. Schnelles Eintauchen (8-12 mal) in 70 % EtOH + 0,25 % konzentrierte HCl
5. Zweimaliges waschen in Leitungswasser, 1 min
6. Waschen in H₂O_{bd}, 2 min
7. Eosin, 30 sec

Zur Verdrängung des restlichen Wassers aus den Gewebeschnitten ist eine Dehydrierung nötig.

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

Zur Fertigstellung der Dauerpräparate wurden die Schnitte in der organischen Einbettlösung Permount fixiert.

3.4.4.6 Demaskierung und Immunhistologie

Weitere immunhistologische Untersuchungen der Präparate setzen eine enzymatische Vorbehandlung voraus, um Formalin-bedingte Proteinvernetzungen aufzubrechen. Durch diese Vernetzungen kommt es zur Maskierung spezifischer Antigene, welche bei der späteren Antikörper-Detektion nicht mehr zugänglich sind.

Nach bereits beschriebener Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgt die Demaskierung durch 20minütige Citrat-Puffer-Behandlung (10 mM Citratpuffer, pH 6,0, vorgeheizt auf 90-95 °C) in einem Dampfgerät. Nach Abkühlung der Präparate für 20 min wurden diese in Leitungswasser gewaschen (5 min) und für 5 min in 3 % H₂O₂ inkubiert. Die Schnitte wurden für 2-3 min in Wasser gespült und in PBS gewaschen (5 min).

Die immunhistologische Färbung erfolgte unter Verwendung des VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories). Hierzu erfolgte zunächst die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Serum-Inkubation (20 min), um in der anschließenden Inkubation mit dem Primär-Antikörper (polyklonaler Kaninchen anti-Vaccinia A27L, 1:1000, 30 min) eine spezifische Bindung zu ermöglichen. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in PBS gewaschen (5 min) und mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper inkubiert (30 min, Verdünnung nach Anleitung des VECTASTAIN Elite ABC Kits). Nach einem erneuten Waschschrift (PBS, 5 min) erfolgte die Antikörperdetektion mittels des Peroxidase-Systems (30 min, VECTASTAIN Elite ABC Reagent). Die Präparate wurden gewaschen (PBS, 5 min)

und die Farbreaktion durch Zugabe des Substrats (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate, Verdünnung nach Anleitung im Kit, 2-10 min) hervorgerufen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift (PBS, 5 min).

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

3.5 Nachweis der Genexpression rekombinanter Vaccinia-Viren mittels RNA- und DNA-analytischer Methoden

3.5.1 Analyse der Transkription verschiedener Markergene mittels RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) dient dazu, die aus einer Probe isolierte mRNA zuerst in cDNA umzuschreiben, die dann wiederum mit Hilfe der PCR amplifiziert und im Agarose-Gel analysiert werden kann. Diese Methode beruht auf dem Einsatz der Reversen Transkriptase, welche aufgrund ihrer enzymatischen Komponente aus einer RNA-Matrize DNA herstellen kann. Diese, durch die Reverse Transkriptase synthetisierte DNA, wird als complementary-DNA (cDNA) bezeichnet und kann als Matrize für die konventionelle PCR dienen. So ist es möglich, mit Hilfe spezifischer Primer, die Transkription verschiedener Gene direkt zu vergleichen.

3.5.2 RNA-Isolierung aus Säugerzellen

GI-101A-Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät, mit den rekombinanten Vaccinia-Viren GLV-1h43, GLV-1h68 bzw. mock-infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten (1, 6, 12, 24, 48 oder 72 hpi) die RNA isoliert.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®] Mini-Kits von Qiagen nach dem dazugehörigen Protokoll. Hierbei wurden die Zellen zunächst homogenisiert, die RNA an eine Matrix gebunden, gereinigt und schließlich in RNase-freiem Wasser eluiert.

3.5.3 DNase-Verdau und Konzentrationsbestimmung

Um in der späteren PCR eine unerwünschte Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des DNA-free™ Kit von Ambion durchgeführt. Für die anschließende cDNA-Synthese wird die RNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen H₂O_{bd} als Referenzwert bestimmt. Hierzu wird die Probe 1:50 in RNase-freiem H₂O verdünnt und in eine Einmalküvette überführt.

3.5.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus der zuvor isolierten mRNA erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase unter Verwendung des Kits Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis der Firma Fermentas. Für die Reaktion wurden Oligo(dT)-Primer verwendet, da diese komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind und sich somit an deren 3'-Ende anlagern können. Da auch die mRNA von Vaccinia-Viren an ihrem 3'-Ende polyadenyliert wird (Moss *et al.*, 1975), eignen sich diese Primer in diesem Versuchsansatz besonders gut. Die Reverse Transkriptase synthetisiert unter Verwendung der zugegebenen dNTPs den zur mRNA komplementären cDNA-Strang, ausgehend vom Oligo(dT)-Primer.

Als Ausgangsmaterial wurde 1 µg Gesamt-RNA und 1 l Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Nach einem Inkubationsschritt von 5 min bei 70 °C wurde Reaktionspuffer, dNTP-Mix und 1 µl Ribonuclease Inhibitor zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase (1 µl pro Reaktionsansatz) und einer Inkubationszeit von 60 min bei 42 °C wird die enzymatische Reaktion durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C abgestoppt.

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

3.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode nach K. Mullis *et al.* [154] eignet sich hervorragend zum Nachweis kleinster Mengen von DNA durch deren Amplifikation.

Hierbei wird ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das die zu untersuchende Sequenz beinhaltet und als Matrize für neue Amplifikationsprodukte dient, durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, so dass zwei DNA-Einzelstränge vorliegen.

Im zweiten Schritt binden durch das Herabsetzen der Temperatur die dazugegebenen Primer spezifisch an die DNA-Einzelstränge, ein Vorgang der als Annealing bezeichnet wird. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase erhöht und die Nukleotide an die entstehenden Doppelstränge anfügt. Nach ca. 30 PCR-Amplifikationsrunden erreicht die exponentielle Vervielfachung der nachzuweisenden DNA-Sequenz ein Maximum, weil u.a. die Aktivität der thermostabilen Polymerase erschöpft ist.

Die synthetisch hergestellten Oligonukleotidprimer sollten eine Reihe bestimmter Kriterien erfüllen, um eine effiziente und spezifische Amplifikation zu ermöglichen. Die Länge der Primersequenz sollte zwischen 18 und 28 Basenpaaren liegen und einen GC-Gehalt von 50-60 % aufweisen. Zudem sollten die Primer an ihrem 3'-Ende zwei bis drei Guanin- oder Cytosin-Reste besitzen, um eine unspezifische Bindung an den Matrizenstrang zu vermeiden. Palindromreiche Sequenzen innerhalb der Primer fördern die Bildung von Haarnadelschleifen und sind somit zu meiden. Ein weiteres Kriterium, eine Vermeidung von Komplementarität zwischen den Primer-Paaren zum Verhindern der Bildung von Primer-Hybriden ist zusätzlich nötig.

In dieser Arbeit wurden komplementäre Primer zu bestimmten Markergenen des Vaccinia-Virus sowie zu internen Kontrollgenen verwendet.

3.5.6.1 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) wird die zuvor in intronfreie cDNA umgeschriebene RNA amplifiziert und über eine elektrophoretische Auftrennung analysiert. Diese Auftrennung unter Anwendung einer Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht anschließend eine qualitative, jedoch keine quantitative Ermittlung der PCR-Produkte.

Reaktionsansatz für die PCR:

14,3 µl	H ₂ O
5 µl	5x Phusion HF Puffer
1 µl	10 mM dNTP-Mix
0,2 µl	Phusion DNA-Polymerase
1 µl	Primer fwd. (1:10-Verdünnung)
1 µl	Primer rev. (1:10-Verdünnung)
1,5 µl	MgCl ₂
3 µl	cDNA

3.5.6.2 Analyse der DNA-Proben in Agarose-Gelen

Zur Untersuchung der durch die PCR gewonnenen DNA werden in Flachbettapparaturen 1,6%ige horizontale Agarosegele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Auf 50 ml Agaroselösung werden 5 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Die Gelelektrophorese-Kammer wird mit 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt. In die erste Tasche wird ein DNA-Marker als Größenstandard geladen. Zu den DNA-Proben wird 5x Probenpuffer gegeben und nach Beladen des Gels erfolgt die Auftrennung bei 90 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel unter UV-Licht fotografiert.

3.6 Nachweis der funktionellen Aktivität des exprimierten Chemokins MCP-1

3.6.1 Untersuchung der Expression des Proteins CD14

Das Glykoprotein CD14 (CD für Cluster of differentiation) ist eine Komponente des angeborenen Immunsystems und ist Teil einer Gruppe von Zelloberflächen-Markerproteinen. Dieses Protein existiert in einer gebundenen (mCD14) sowie einer gelösten Form (sCD14). Die gebundene Form ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker vorwiegend mit der Zellmembran von Makrophagen und in geringer Konzentration von Neutrophilen und Granulocyten verbunden. Die lösliche Form wird von Monocyten sezerniert und ermöglicht

auch in geringen Konzentrationen eine Reaktion auf Lipopolysaccharide von Zellen, die normalerweise kein CD14 exprimieren. Hierbei entsteht die lösliche Form entweder durch Ablösen des gebundenen CD14 (mCD14) oder durch eine direkte Freisetzung über das intrazelluläre Vesikelsystem.

Zur Funktion des CD14-Proteins gehört hauptsächlich die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide. Hierbei wirkt es als ein Co-Rezeptor mit dem Toll-like Rezeptor TLR4 und interagiert mit dem Lipopolysaccharide-binding protein LBP. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CD14-Oberflächenprotein als Marker für die Rekrutierung von CD14-positiven Immunzellen aufgrund der Expression des rekombinanten Chemokins MCP-1 verwendet.

3.6.2 Untersuchung der Expression des Cytokins Tumor Nekrose Faktor- α

Als weiterer Nachweis zur funktionellen Aktivität des exprimierten Chemokins MCP-1 diente die Expressionsanalyse des Cytokins TNF- α . Dieses Protein wird zunächst als ein 212-Aminosäuren langes, membrangebundenes Protein synthetisiert und zu stabilen Homotrimeren organisiert. Erst infolge einer proteolytischen Spaltung durch die Metalloprotease TNF- α Converting Enzym (TACE) entsteht der aktive, lösliche 51 kDa trimerische TNF- α (sTNF). Nach Freisetzung kann TNF- α auf 2 Rezeptoren wirken, TNF receptor type 1 (TNF-R1) sowie TNF receptor type 2 (TNF-R2). Während TNF-R1 in den meisten Geweben exprimiert wird und sowohl durch die membrangebundene Form als auch der löslichen Form von TNF- α vollständig aktiviert werden kann, ist der Rezeptor TNF-R2 ausschließlich auf Zellen des Immunsystems lokalisiert.

Die Bindung von TNF- α kann, je nach zellulärem Kontext, entweder einen NF- κ B-vermittelten Signalweg zur Zellaktivierung und zur Verhinderung des programmierten Zelltods aktivieren oder eine apoptotische Antwort über die Aktivierung einer spezifischen Caspase-Signalkaskade auslösen (Abb. 3.4). Die Aktivierung des NF- κ B vermittelten anti-apoptotischen Signalwegs erfolgt über beide Rezeptoren TNF-R1 sowie TNF-R2. Hierbei kommt es nach Bindung zur Rekrutierung von Adapterproteinen, wie RIP1 (receptor interacting protein), TRAF2 und cIAP1, welche schließlich zur Ausbildung des Komplex I führen. Dieser Komplex führt zur Translokation des Faktors NF- κ B in den Zellkern und schließlich zur Hochregulierung anti-apoptotischer Gene wie z.B. c-FLIP (FLICE-like inhibitory protein) oder TRAF1 und TRAF2, welche wiederum zu Komplex II rekrutiert werden und somit die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs inhibieren.

Die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs erfolgt ausschließlich über TNF-R1 durch Bildung des Death inducing signaling complex (DISC/ Komplex II). Dieser Komplex führt zur Aktivierung der Caspase-8 oder -10 und letztendlich zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zum programmierten Zelltod.

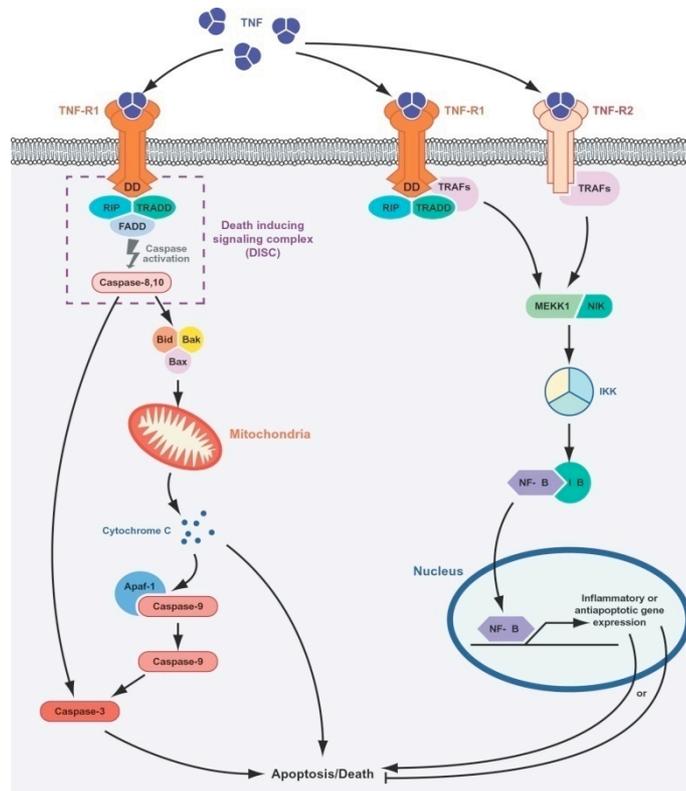


Abbildung 3.4 TNF- α -vermittelte Signalwege nach Interaktion mit den Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 [155]

Da TNF- α vorwiegend von Makrophagen synthetisiert wird, diente dieses Cytokin in dieser Arbeit als Marker für eine mögliche Rekrutierung von Immunzellen und somit als indirekter Nachweis zur funktionellen Aktivität von MCP-1.

3.7 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.7.1 Implantation von humanen Tumorzellen

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden 6 Wochen alte, weibliche athymischen *Nude* Mäuse verwendet. Die entsprechenden Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 95 % kultiviert und ein Tag vor Implantation erfolgte ein Mediumwechsel. Für die anschließende Implantation der Zellen wurden diese zunächst gewaschen, trypsiniert und pelletiert (1000 rpm, 5 min, RT). Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt und auf das gewünschte Volumen mit PBS⁺⁺ eingestellt. Für die Generierung von humanen GI-101A Brustkrebstumoren erfolgte eine Einstellung auf 5×10^6 Zellen/ 100 μ l, dagegen wurden zur Erzeugung von aus der Zelllinie HT-29-CBG abgeleitete Kolonkarzinomas 5×10^5 Zellen/ 100 μ l verwendet. Die Injektionsstelle wurde mit Alco-Preps desinfiziert und die Zellen mit einer 29G^{1/2} Insulin Spritze in die rechte Flanke subkutan injiziert.

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

$$\text{Tumolvolumen} = \frac{(\text{Länge} \times \text{Breite}^2)}{2}$$

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

3.7.2 Intravenöse Injektion von rekombinanten Vaccinia Viren

Bei Erreichen eines Tumolvolumens von 200-300 mm³ (4-5 Wochen GI-101A, 2-3 Wochen HT-29-CBG) erfolgte die intravenöse Applikation der rekombinanten Vaccinia-Viren durch eine einmalige Injektion von 5×10^6 plaque forming units (pfu) in 100 μ l PBS in die rechte laterale Schwanzvene. Die Viren wurden vor Injektion aufgetaut und zum Lösen eventuell auftretender Virusaggregate 3mal für 30 sec sonifiziert. Um den Injektionsvorgang zu erleichtern, wurden die Tiere zur Gefäßerweiterung für 5 min mit einer Infrarot-Wärmelampe bestrahlt und die Injektionsstelle mit Alco-Preps desinfiziert.

3.7.3 Tumor- und Organentnahme

Für weitere Untersuchungen wurden Tumore und Organe zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Die Entnahme von Blutproben erfolgte durch Herzpunktion. Zur Serumgewinnung wurden die entnommenen Proben über Microtainer SST Tubes zur Plasma-Separierung aufgetrennt. Tumore, Organe und Blutproben wurden bei -80 °C gelagert.

3.7.4 Herstellung von Protein-Lysaten aus Tumorgewebe und Organen

Für spätere Protein-Expressionsanalysen sowie zur Untersuchungen der intratumoralen Virus-Replikation ist es erforderlich, das Gewebe zunächst zu homogenisieren. Je nach späterer Verwendung der Lysate erfolgte die Homogenisierung in Protein-Lysepuffer oder PBS. Nach einer anfänglichen groben Zerkleinerung des Gewebes mit Hilfe eines Skalpell wurden die Proben in einem *FastPrep-Disrupter* unter Verwendung spezieller, mit Keramik-Beads gefüllter Reaktionsgefäße mechanisch homogenisiert. Um eine Protein-Degradierung zu vermeiden ist es sehr wichtig, sämtliche Schritte auf Eis durchzuführen und eine Erhitzung der Proben zu vermeiden. Die homogenisierte Gewebe-Suspension wird zur Separierung von restlichen Zell- und Gewebeüberresten für 20 min abzentrifugiert (4 °C, 13000 rpm) und der Überstand in einem frischen Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.7.5 Quantifizierung der MCP-1 Expression in Tumorgewebe und Organen

Zur Quantifizierung der MCP-1 Expression wurden zunächst Proteinlysate hergestellt, welche mittels des ELISA-Verfahrens auf Expression des Proteins untersucht wurden. Hierzu wurden die GLV-1h80-Proben 1:5000 verdünnt um eine Berechnung anhand des verwendeten Standards zu ermöglichen. Die Proteinlysate der GLV-1h68- und mock-infizierten Tumore wurden unverdünnt getestet. Alle Proben wurden im Duplikat analysiert, um mögliche Pipettierfehler zu umgehen.

3.7.6 Untersuchung der viralen Replikation im Tumorgewebe und Organen

Nach Herstellung der Lysate in PBS wurde der virale Titer mittels Plaque-Assay ermittelt.

3.7.8 *real-time* Monitoring der viralen Replikation mittels Bioluminescence Imaging Technologie

Lumineszenz-Lichtemission wird durch spezielle biochemische Reaktionen hervorgerufen. Das wohl bekannteste Beispiel ist das Enzym Luziferase, welches häufig als Markerprotein fungiert und Bestandteil eines vielfach verwendeten Reportergensystems zum Nachweis der Genexpression in lebenden Zellen ist. Hierbei wird die Lumineszenz-Reaktion zur Messung der Luziferase-Menge genutzt, die von transgenen Zellen in Reporter-gen-Assays produziert wird.

Die Luziferase der nordamerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*) war die erste Luziferase, die intensiv biochemisch untersucht wurde [156]. In dieser Arbeit wurde mit *Renilla* Luziferase, in Form eines *Ruc-GFP* Fusionsgens gearbeitet. Dieses wurde durch Fusion der cDNA für *Renilla* Luziferase (*ruc*) mit der cDNA, welche für GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* codiert, generiert [157]



Abbildung 3.5 *Renilla reniformis*, Herkunftsorganismus der hier verwendeten Luziferase ([www.dnr.sc.gov/marine/sertc/octocoral guide](http://www.dnr.sc.gov/marine/sertc/octocoral_guide))

Das aus *Renilla reniformis* rein erhaltene Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin in Anwesenheit von Sauerstoff und erzeugt hierbei blaues Licht mit einem Emissionswellenlängen-Maximum von 478 nm. Das bifunktionelle Ruc-GFP Reportersystem ermöglicht sowohl die Detektion der Genexpression auf Einzelzell-Niveau, basierend auf der grünen GFP-Fluoreszenz als auch die Detektion in Zellverbänden, basierend auf der Lumineszenz-Lichtemission. Mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens kann somit die Kolonisierung des Tumorgewebes mit rekombinanten Vaccinia-Viren im lebenden biologischen System analysiert werden.

Zunächst wurde die initiale Narkose durch Begasung mit 3 % Isofluran eingeleitet und 5 mg des Substrats Coelenterazin i.v. injiziert (5 µl Coelenterazin gelöst in 95 µl Coelenterazin-Puffer) Für das anschließende *real-time* Monitoring wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Narkose in ein Anästhesiemodul mit Wärmetisch und Einzelbeatmungsmasken in einen *Low-Light* Imager überführt (1.5 % Isofluran/ 0,2 l Sauerstoff/min). Die Photonenemission wurde mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera gemessen und unter Verwendung der WinLight Software ausgewertet bzw. mithilfe des Maestro in-vivo Imaging Systems.



Abbildung 3.6 NightOWL II LB 983. Molekulares Imaging System der Firma BERTHOLD TECHNOLOGIE

4. Ergebnisse

4.1 Verstärkung der onkolytischen Effekte mittels „gene-directed prodrug therapy“ im humanen Brustkrebskarzinom-Model GI-101A

Geringe vollständige Heilungsaussichten und hohe Anzahl an Nebenwirkungen erfordern ständige Weiterentwicklung der klassischen Krebs-Chemotherapie. Eine vielversprechende Möglichkeit hierzu ist die „gene directed prodrug enzyme therapy“ um Toxizitäten für gesundes Gewebe zu minimieren. Dieses zweistufige Therapie-Konzept führt zur auf das Tumorgewebe lokal begrenzten enzymatischen Umsetzung eines cytotoxischen Drugs, welches ein Abtöten der Krebszellen herbeiführt. In dieser Arbeit wurde das onkolytische rVACV GLV-1h68 als Vektor für das Prodrug-aktivierende Enzym β -Galactosidase eingesetzt um eine enzymatische Umwandlung auf das GI-101A-Tumorgewebe zu reduzieren.

4.1.1 *In-vitro* Charakterisierung der rekombinanten Vaccinia Viren GLV-1h68 und GLV-1h43

Zum Nachweis der Expression der Markergene *Ruc-GFP* und *β -Galactosidase* wurde die humane Brustkrebskarzinom-Zelllinie GI-101A mit den rekombinanten Viren GLV-1h68 und GLV-1h43 infiziert. Die Zellen wurden zunächst auf Deckgläschen in 24-well-plates ausgesät und bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz mit einer Viruskonzentration von 100 pfu/well infiziert bzw. mock-infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert und die GFP-Expression mikroskopisch untersucht. Für den Nachweis der β -Galactosidase-Expression erfolgte vor der mikroskopischen Analyse eine spezifische Färbung durch Zugabe des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal).

Es konnte eine GFP-Expression nach Infektion mit beiden Vaccinia Virusstämmen beobachtet werden, da beide Viren im Genort F14.5L ein Ruc-GFP-Insert tragen (Abb.4.1). Die Expression des Enzyms β -Galactosidase hingegen war ausschließlich auf GLV-1h68-infizierte Zellen begrenzt, da in das Genom des rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h43 keine lacZ-Sequenz inseriert war.

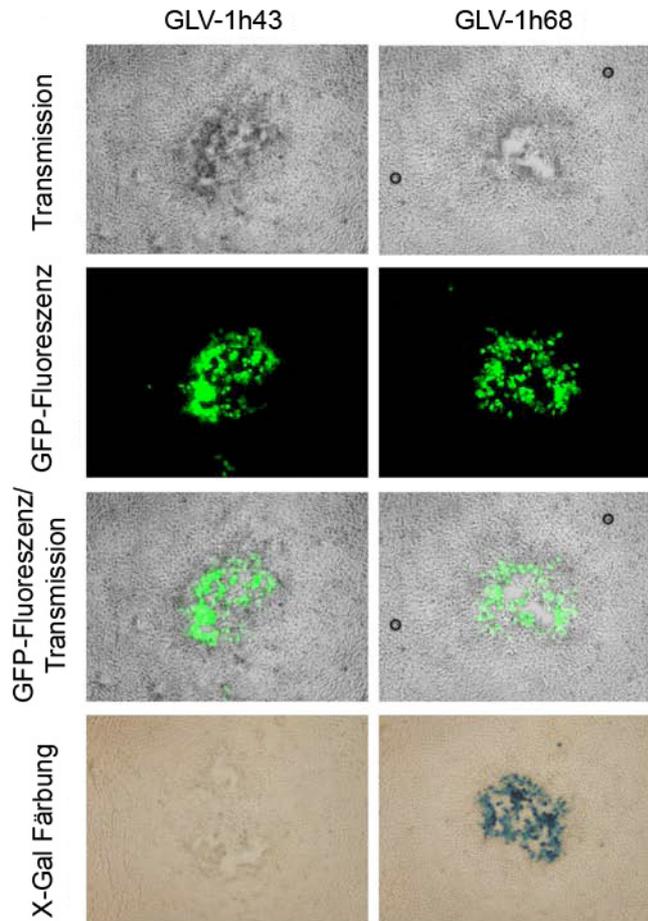


Abbildung 4.1 Markergen-Expression nach Infektion von GI-101A-Zellen mit den rekombinanten Vaccinia-Viren. GI-101A-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den rVACV GLV-1h68 (rechts) und GLV-1h43 (links) infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen fixiert und die GFP- sowie die β -Galactosidase-Expression mikroskopisch dokumentiert.

Die Untersuchung der Expression dieser Markergene erfolgte darüber hinaus auf Transkriptions-Ebene mittels RNA- und DNA-analytischer Methoden sowie auf Translations-Ebene durch biochemische Analyse von Zelllysaten. GI-101A-Zellen wurden hierfür in 6-well-plates ausgesät und nach 2 Tagen mit einer MOI 0,5 mit den beiden Viren infiziert bzw. mock-infiziert. Sechs, 12, 24, 48 und 72 hpi wurden die zelluläre RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und die genomische DNA durch einen DNase-Verdau entfernt. Die isolierte RNA wurde durch enzymatische Behandlung mit Reverser Transkriptase zu cDNA konvertiert und sowohl mittels RT-PCR für eine anschließende Detektion amplifiziert als auch einer quantitativen Untersuchung durch q-PCR unterzogen.

Parallel wurden Zellen gerntet und in Lysepuffer gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay ermittelt und die Protein-Lysate über SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte eine Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern gegen β -Galactosidase und GFP. Die Detektion von β -Aktin diente zur internen Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Sowohl auf transkriptioneller (Abb. 4.2a) als auch auf translationeller Ebene (Abb. 4.2b) konnten die Ergebnisse der mikroskopisch ermittelten Protein-Expression verifiziert werden. Es konnten keine *Ruc-GFP*- oder *lacZ*-spezifischen

Transkripte oder Proteine in mock-infizierten Zellen detektiert werden, wohingegen sowohl entsprechende RNA als auch Proteine in GLV-1h68-infizierten Zellen nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu führte eine Infektion mit GLV-1h43 bereits zwar zu einer Synthese von Ruc-GFP, jedoch nicht zur Expression von β -Galactosidase. Während die Transkripte der entsprechenden Reportergene bereits 6 hpi nachweisbar waren, konnten die entsprechenden Proteine erst 12 hpi mittels Western-Blot detektiert werden. Die β -Gal-Expression stieg während des Infektionsverlaufs bis 48 hpi an und nahm danach bis 72 hpi wieder ab. In mock-infizierten Zellen konnten keine Reportergen-spezifischen Transkripte oder Proteine detektiert werden.

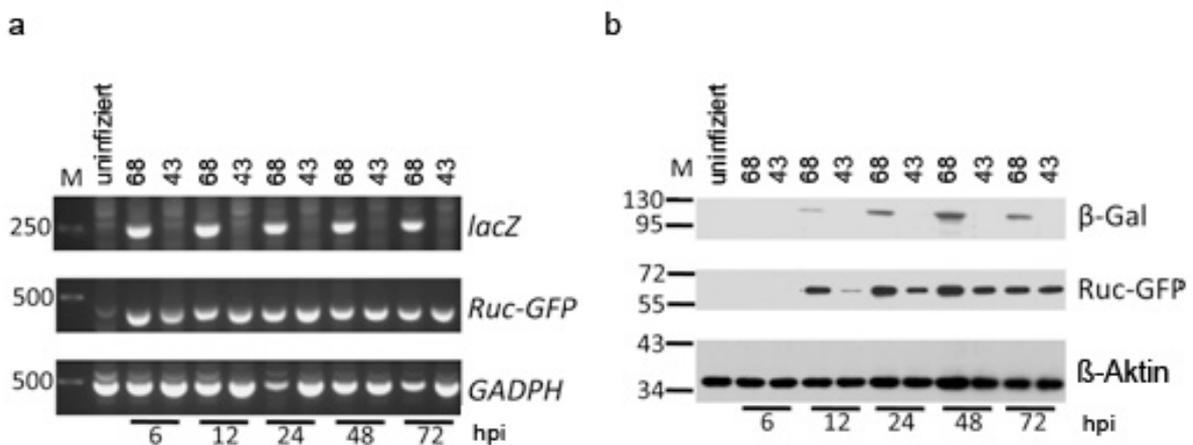


Abbildung 4.2 Ermittlung der Reportergen-Expression nach Infektion mit rVACV. a) Ergebnisse einer RT-PCR von mock-infizierten Zellen (uninfiziert), GLV-1h68- (68) oder GLV-1h43- (43) infizierten Zellen 6, 12, 24, 48 und 72 hpi. Für die Amplifikation wurden *lacZ*-, *GFP*-, und *GADPH*-spezifische Primer verwendet. b) Western-Blot-Analyse nach Inkubation mit Ruc-GFP-, β -Galactosidase- (β -Gal) und β -Aktin-spezifischen Antikörpern. β -Aktin diente als interne Kontrolle zur aufgetragenen Proteinmenge.

Darüber hinaus bestätigte eine quantitative Untersuchung der *lacZ*-Expression mittels real-time PCR eine steigende *lacZ*-Expression bis 48 hpi (Abb. 4.3). Bereits 6 hpi nach Infektion mit GLV-1h68 ist ein *lacZ*-spezifisches Transkript nachweisbar. Die Expression stieg während des Infektionsverlaufs bis 48 hpi an und fiel dann, vermutlich durch vermehrte Zelllyse wieder ab. In GLV-1h43-infizierten Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt ein *lacZ*-spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden.

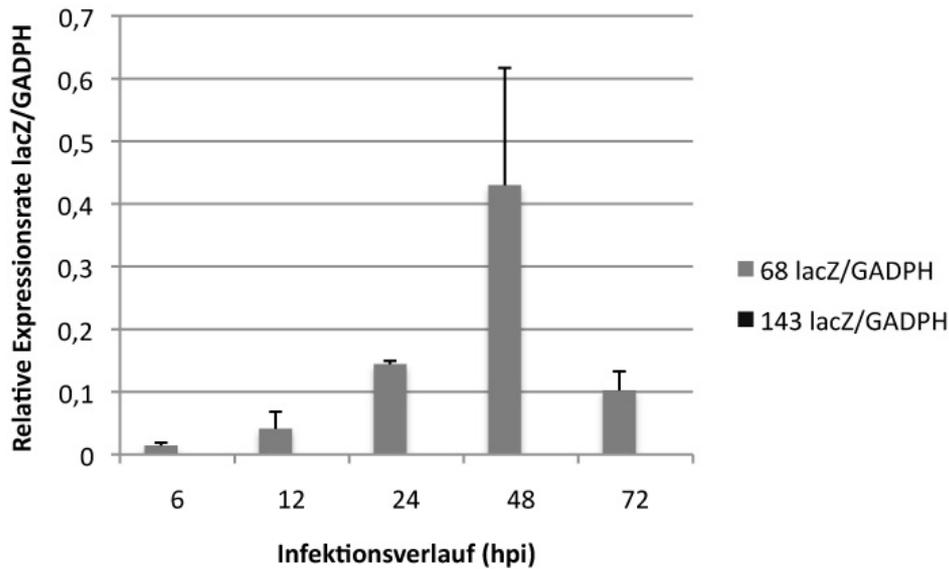


Abbildung 4.3 Quantifizierung der Expressionsrate des *lacZ*-Gens nach Infektion mit rVACV. Nach RNA-Isolierung sowie anschließender cDNA-Synthese erfolgte eine Amplifikation des Templates unter Verwendung *lacZ*- und *GADPH*-spezifischer Primer. Hierbei diente *GADPH* als Referenz-Gen

Da für eine Konvertierung des Prodrugs in dessen aktive und cytotoxische Form als Drug vollständig funktionell aktive β -Galactosidase erforderlich ist, wurde die Aktivität dieses Enzyms in Zelllysaten (Abb. 4.4a) und Zellkultur-Überständen (Abb. 4.4b) von mock-, GLV-1h68- sowie GLV-1h43-infizierten GI-101A-Zellen untersucht. In diesem β -Galactosidase-Assay wurden die Zelllysate sowie Zellkultur-Überstände mit der X-Gal-Färbelösung inkubiert und schließlich die optische Dichte an einem Tecan Absorptions-Reader ermittelt. Mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe mit aufsteigender Konzentration von 1×10^{-6} units/ μ l bis 1 unit/ μ l β -Galactosidase konnten die Konzentrationen des aktiven Enzyms in den Lysaten und Überständen ermittelt werden. Auch dieser Nachweis der β -Gal-Genexpression bestätigt die bereits durch die Western-Blot-Analyse nachgewiesene stetige Zunahme der Expression bis zu einem Maximum bei 48 hpi in GLV-1h68-infizierten Zellen. In den Zellkultur-Überständen dieser infizierten Zellen hingegen konnte β -Gal-Aktivität nicht früher als 12 hpi nachgewiesen werden. Diese stieg jedoch bis 72 hpi stark an, möglicherweise bedingt durch eine erhöhte Zelllyse nach Virusinfektion. In mock- und GLV-1h43-infizierten Zellen sowie in deren Überständen konnte keine β -Gal-Aktivität nachgewiesen werden.

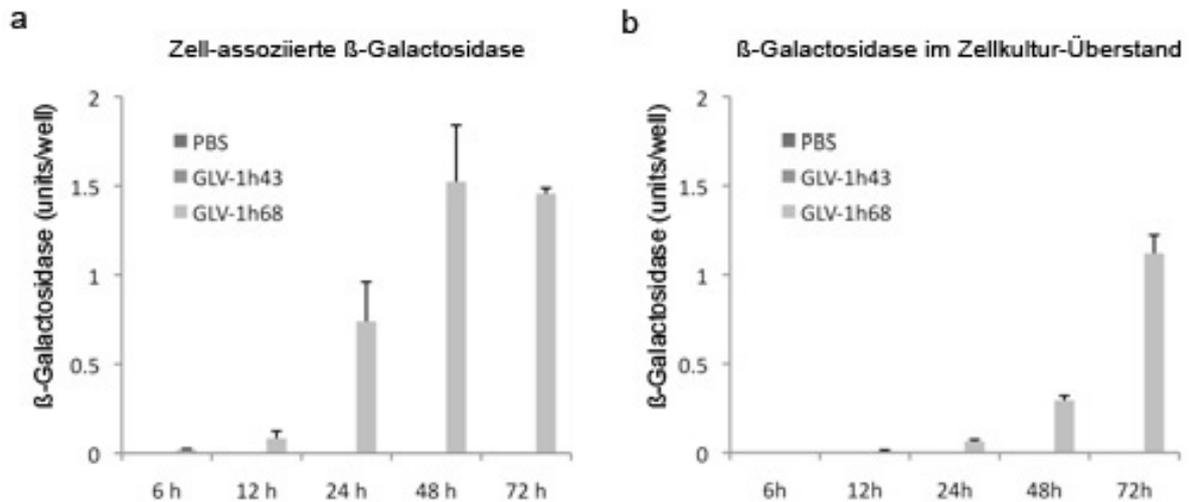


Abbildung 4.4 Bestimmung der Aktivität von β -Galactosidase a) in Zelllysaten und b) Zellkultur-Überständen mock-, GLV-1h68- und GLV-1h43-infizierter GI-101A-Zellen. Die Proben wurden mit X-Gal-Färbelösung inkubiert und die entsprechenden Konzentrationen (units/well) nach Messung der optischen Dichte anhand einer Standard-Verdünnungsreihe ermittelt.

4.1.2 Untersuchung des Wirkungsmechanismus des β -Galactosidase-aktivierbaren Prodrugs

Das in dieser Arbeit verwendete β -Galactosidase-aktivierbare *seco*-Duocarmycin SA Analog erwies sich, wie kürzlich beschrieben, als hocheffektiv bei der Zerstörung von Zellen in Zellkultur [151]. Nach der enzymatischen Aktivierung entstand ein Drug welches 3500mal cytotoxischer ist als das Prodrug selbst. Jedoch konnte noch nicht beschrieben werden, ob der Wirkungsmechanismus dieses Drugs dem, für Duocarmycin SA beschriebenen, das heißt einer intrinsisch vermittelten Apoptose, entspricht [158, 159].

Zur Ermittlung des Wirkungsmechanismus wurden GI-101A-Zellen in 6-well-plates mit PBS und Prodrug allein sowie in Kombination mit aufgereinigter β -Galactosidase inkubiert. Nach anschließender Protein-Isolierung, elektrophoretischer Auftrennung sowie Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte ein Protein-Nachweis unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen gespaltenes PARP, Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 (Abb. 4.5).

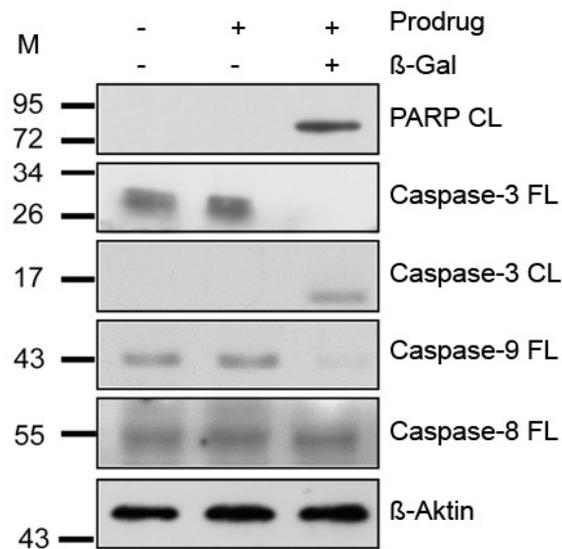


Abbildung 4.5 Western Blot zum Nachweis von Apoptose-typischen Proteinen nach Aktivierung des Prodrugs. GI-101A-Zellen in 6-well-plates wurden mit PBS und Prodrug allein sowie in Kombination mit aufgereinigter β -Galactosidase inkubiert. Nach Isolierung der Proteine und deren elektrophoretischer Auftrennung sowie Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte ein Protein-Nachweis unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen gespaltenes PARP (CL; cleaved), ungespaltener Caspase-3 (FL; full-length), gespaltener Caspase-3 (CL) sowie ungespaltener Caspase-8 (FL) und Caspase-9 (FL). β -Aktin diente als interne Kontrolle für die aufgetragenen Proteinmenge.

Das Ergebnis des Western Blots zeigte deutlich, dass die beiden Indikatoren für Apoptose [160], die gespaltenen Formen von PARP und Caspase-3, ausschließlich in Zellen nachweisbar waren, welche zuvor mit Prodrug und β -Galactosidase inkubiert wurden. Dagegen konnten die beiden Proteine in den unbehandelten Kontroll-Zellen, welche mit PBS alleine oder PBS in Kombination mit Prodrug ohne Enzym behandelt wurden nicht detektiert werden. Darüber hinaus blieb Caspase-8 in Prodrug- und β -Galactosidase-behandelten Zellen ungespalten. Gleichzeitig nahm die nachweisbare Menge ungespaltener Caspase-9 deutlich ab, wodurch eine Auslösung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg für wahrscheinlicher angesehen werden kann als eine Auslösung über den extrinsischen Signalweg [161].

Vaccinia Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, um einer anti-viralen Immunantwort des Wirts zu entkommen, unter anderem durch direkte Inhibierung von apoptotischen Signalkaskaden. Durch Expression anti-apoptotischer Proteine kann sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Apoptose-Signalweg durch Vaccinia Viren gehemmt werden [162]. Um zu untersuchen, ob diese anti-apoptotischen viralen Proteine die Drug-vermittelte Apoptose inhibieren können, wurden Protein-Lysate mock-, GLV-1h68- und

GLV-1h43-infizierter GI-101A-Zellen auf die Expression Apoptose-typischer Proteine nach Zugabe von 10 nM Prodrug getestet (Abb. 4.6).

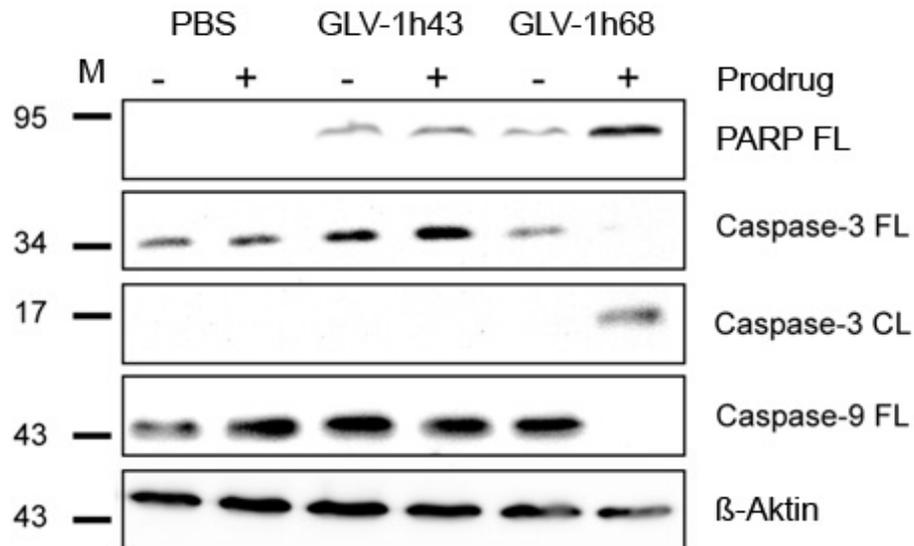


Abbildung 4.6 Nachweis der Apoptose-Induktion in GLV-1h68-infizierten GI-101A-Zellen nach Prodrug-Behandlung. Western Blots mit Zelllysaten Prodrug-behandelter (+) und Prodrug-unbehandelter (-) Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen gesplattene PARP (CL), ungesplattene Caspase-9 (FL), ungesplattene (FL) und gesplattene (CL) Caspase-3. β -Aktin diente als interne Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge.

Expression des Apoptose-Markers PARP war stark erhöht in GLV-1h68-infizierten und Prodrug-behandelten Zellen im Vergleich zu ausschließlich Virus-behandelten Zellen. Auch ein Vergleich der PARP-Expression mit GLV-1h43-infizierten Zellen zeigte eine deutlich niedrigere Menge PARP sowohl in Prodrug-behandelten (+) als auch unbehandelten (-) Zellen. In uninfizierten Kontrollzellen konnte nahezu keine PARP-Expression nachgewiesen werden. Gesplattene Caspase-3 war ausschließlich in GLV-1h68-infizierten Prodrug-behandelten Zellen detektierbar, jedoch konnte in diesen Proben keine ungesplattene Caspase-3 oder -9 entdeckt werden.

Durch Anwendung von Bioluminescence Imaging Technologie mit Hilfe des NightOWL-Systems von BERTHOLD konnten die Unterschiede des Expressions-Levels auch im Western blot quantifiziert werden (Abb. 4.6). Die Prodrug-Behandlung GLV-1h68-infizierter GI-101A-Zellen führte zur einer 7fach höheren Konzentration an gesplattener PARP im Vergleich zu Prodrug-unbehandelten bzw. GLV-1h43-infizierten Zellen. Uninfizierte GI-101A-Zellen wiesen nahezu keine Expression dieses Proteins auf. Die Unterschiede wurden noch deutlicher durch Quantifizierung der gesplattenen Caspase-3, welche ausschließlich in den Prodrug-behandelten GLV-1h68-infizierten Zellen nachweisbar war. Im Gegensatz dazu

wiesen diese Zellen eine 3mal schwächere Expression der ungespaltenen Caspase-3 sowie eine 7fach geringere Caspase-9-Expression (ungespalten; FL) verglichen mit den Kontrollzellen auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass es in Prodrug-behandelten Zellen auch nach einer Infektion mit den rVACV, besonders nach Infektion mit dem β -Galactosidase-exprimierenden Virus GLV-1h68, zu einer Induktion der Apoptose kommt.

4.1.3 Die Wirkung Prodrug-aktivierender Zellen auf Nachbarzellen - Der Bystander Effekt

Eine Behandlung von soliden Tumoren mit dem onkolytischen rVACV GLV-1h68 führt nicht zur Infektion einer jeden Tumorzelle. Jedoch bewirkt eine Prodrug-Behandlung nur in infizierten β -Galactosidase-exprimierenden Zellen eine Umwandlung des Prodrugs in die aktive Form. Da bereits eine kleine Anzahl an überlebenden Zellen zu einem erneuten Tumorwachstum führen kann, ist für eine erfolgreiche Therapie ein „bystander“-Effekt wünschenswert. Hierbei sollten die durch die Infektion genetisch veränderten Zellen eine Abtötung der im Tumor benachbarten uninfizierten Zellen vermitteln und somit eine Verstärkung der onkolytischen Effekte herbeiführen [163].

Um zu untersuchen, ob es bei Anwendung des in dieser Arbeit verwendeten GDEPT-Systems zu solch einem Effekt kommt, wurden GI-101A-Zellen in 24-well-plates ausgesät, bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz mit einer niedrigen MOI von 0,05 infiziert bzw. mock-infiziert und Prodrug zu einer Endkonzentration von 10nM zugegeben. Zur Kontrolle dienten jeweils Zellen ohne Prodrug-Behandlung. Drei sowie 7 dpi wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay ermittelt. Das Medium der Zellen wurde hierfür durch eine Lösung mit 2.5 mg/ml MTT ersetzt und für 4 h bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank inkubiert. Die MTT-Lösung wurde abgenommen und 1 N HCl in Isopropanol zugegeben. Die Auswertung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm. Hierbei wurde der Wert uninfizierter Zellen als Referenz verwendet und als 100 % lebende Zellen gesetzt (Abb. 4.7).

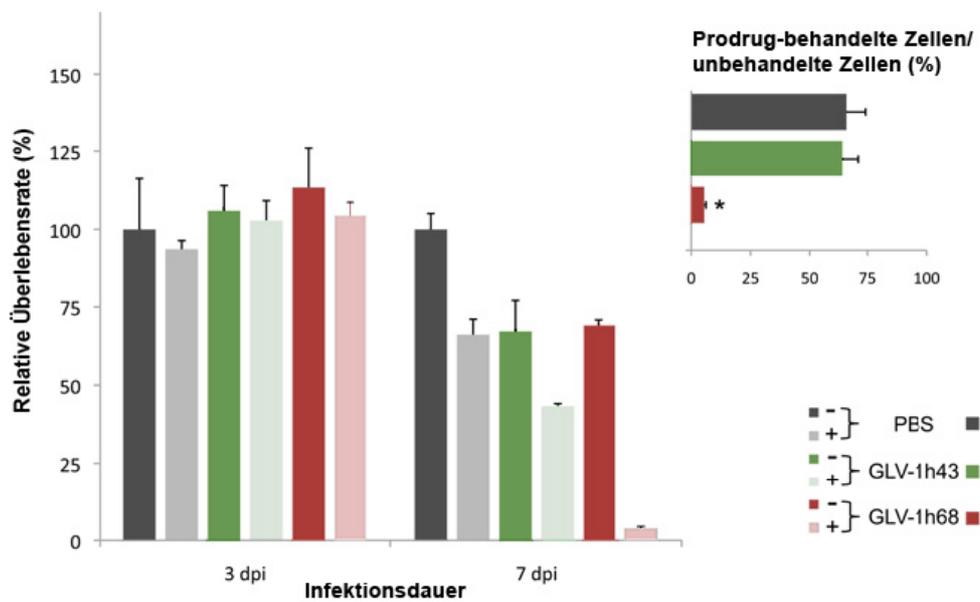


Abbildung 4.7 Proliferations-Studien von GI-101A-Zellen nach Prodrug-Behandlung und Infektion mit rVACV. Die Zellen wurden mit MOI 0,05 infiziert bzw. mock-infiziert und mit 10 nM Prodrug behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als interne Kontrolle. Zu den Zeitpunkten 3 und 7 dpi wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay ermittelt. Der Wert uninfizierter Zellen wurde als Referenz verwendet und als 100 % lebende Zellen gesetzt. Dargestellt sind die entsprechende gemittelte relative Überlebensrate mit Standardabweichung der verschieden behandelten Zellen (n=3; * zeigte eine statistische Signifikanz an mit $p < 0,05$). Das Insert zeigt das Verhältnis der Überlebensrate von Prodrug-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 7 dpi.

Während zum Zeitpunkt 3 dpi kein signifikanter Unterschied zwischen den verschieden behandelten Zellpopulationen zu beobachten war, führte eine kombinatorische Behandlung mit GLV-1h68 und Prodrug 7 dpi zu einer deutlichen Steigerung der Abtötung von GI-101A-Zellen, verglichen mit ausschließlich GLV-1h68-infizierten Zellen. Eine Prodrug-Behandlung in mock- oder GLV-1h43-infizierten Zellen führte zur Inhibierung der Zellproliferation das heisst 7 dpi zu einer 30%igen Abnahme proliferierender Zellen im Vergleich zu den Prodrug-unbehandelten Kontrollzellen. Statistische Analysen zeigten jedoch, dass ausschließlich die Kombination von Prodrug und GLV-1h68-Infektion stark synergetische Effekte hervorbrachte und zur effizientesten Abtötung der Zellen führte, hingegen nicht eine alleinige Behandlung mit Prodrug oder rVACV GLV-1h68 (Abb. 4.7 Insert).

Darüber hinaus führte eine 2-tägige Koinkubation sterilfiltrierter Zelllysate und Zellkultur-Überstände mock-, GLV-1h68- oder GLV-1h43-infizierter Zellen mit uninfizierten GI-101A-Zellen zu einer Prodrug-vermittelten Abtötung der Zellen bei Vorhandensein aktiver β -Galactosidase (Abb. 4.8).

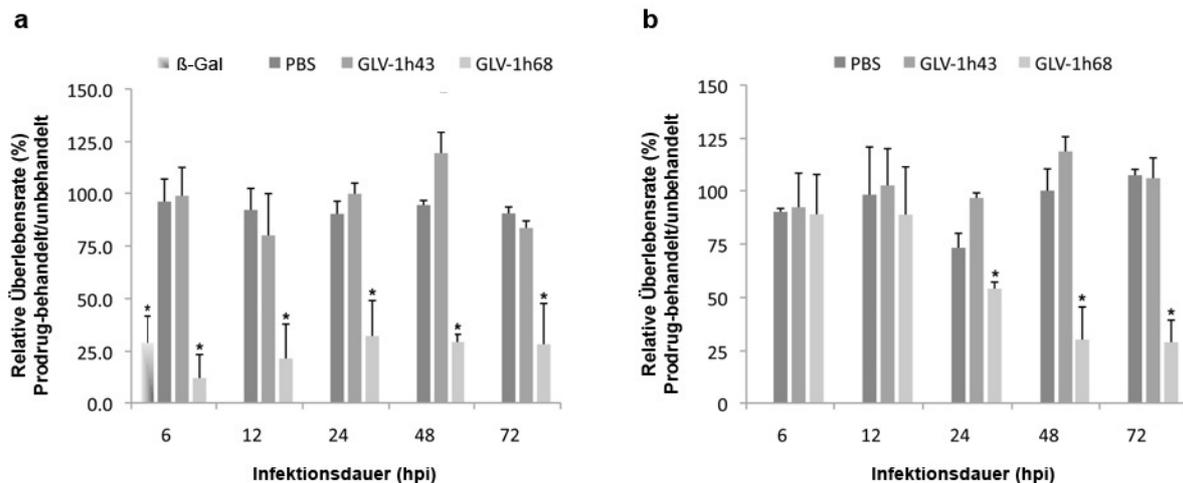


Abbildung 4.8 Abtötung von Tumorzellen durch β -Galactosidase in Zelllysaten und -überständen GLV-1h68-infizierter GI-101A-Zellen. Die Zelllysate (a) und Überstände (b) mock-, GLV-1h68- sowie GLV-1h43-infizierter Zellen wurden sterilfiltriert und auf uninferzierte GI-101A-Zellen gegeben, welche mit 10 nM Prodrug behandelt wurden. Als interne Kontrollen dienten Prodrug-unbehandelte Zellen sowie mit rekombinanter β -Galactosidase behandelte Zellen. Jede Probe wurde im Triplet analysiert und gemittelt. (n=3; * zeigte eine statistische Signifikanz an mit $p < 0,05$ im Vergleich gesetzt zu den mit mock- und GLV-1h43-infizierter Zellen behandelten Proben).

Bereits die nach 6 stündiger Infektion erhaltenen Zelllysate GLV-1h68-infizierter Zellen führten nach Prodrug-Zugabe zu einer effektiven Zerstörung der Tumorzellen, ein Ergebnis welches mit der, für diesen Zeitpunkt nachweisbaren Aktivität der β -Galactosidase korreliert (Abb. 4.4). In den mit Überständen behandelten Zellen wird die Prodrug-vermittelte Abtötung der Zellen nach 24 h Inkubation der von GLV-1h68-infizierten Zellen stammenden Proben deutlich und nimmt bis 72 hpi zu. Dies zeigt dass es ausschließlich in GLV-1h68-infizierten Zellen zu einer Aktivierung des Prodrugs kommt und toxische Nebeneffekte verhindert werden.

4.1.4 Onkolytische Effekte von rVACV nach Behandlung mit einem enzymatisch aktivierbaren Prodrug

Für eine therapeutische Anwendung sollten die onkolytischen Effekte der Kombinationstherapie des durch β -Galactosidase aktivierbaren Prodrugs mit einer gleichzeitigen GLV-1h68-Infektion im GI-101A-Brustkrebsmodell genauer untersucht werden.

Da enzymatisch aktive β -Galactosidase möglicherweise von GLV-1h68-infizierten Tumoren in den Blutkreislauf gelangen könnte und somit unerwünschte Nebeneffekte einer anschließenden Prodrug-Behandlung verursachen könnte, wurden Tumorlysate sowie

Blutserum-Proben Tumor-tragender Nude-Mäuse auf β -Galactosidase-Aktivität hin getestet (Abb. 4.8). Hierfür wurden 3 Mäusen mit GI-101A-Tumoren das Virus GLV-1h68 injiziert und 42 dpi das Tumorgewebe sowie Blutproben entnommen. Während in den Tumorlysaten eine sehr hohe enzymatische Aktivität von β -Galactosidase nachweisbar war (ca. 100 units/g Tumorgewebe), konnte in Blutseren keine Aktivität detektiert werden (Untergrenze der nachweisbaren Aktivität im Testverfahren: 0,3 units/ml). Da somit ungewünschte Nebeneffekte einer Prodrug-Behandlung weitgehend auszuschließen sind, wurden die onkolytischen Effekte einer Prodrug-Behandlung in Kombination mit dem *lacZ*-kodierenden rVACV GLV-1h68 in lebenden Tieren untersucht.

Vier bis 6 Wochen alten Nude-Mäusen wurden 5×10^6 GI-101A-Zellen an der Flanke subkutan injiziert. Diese Injektion führte 30 Tage nach Injektion zur Bildung von ca. 450 mm³ großen Tumoren. Die Mäuse wurden jeweils in Gruppen von jeweils 12 Tieren aufgeteilt und PBS oder 5×10^6 pfu des Virus GLV-1h68 oder GLV-1h43 intravenös injiziert. Sechs Tage nach Injektion wurden bei der Hälfte der Tiere einer jeden Gruppe mit der Prodrug-Behandlung begonnen. Hierzu wurden 200 μ l einer 1:1 (v/v) Mischung von PBS und DMSO mit Prodrug in einer Konzentration von 100 nM intraperitoneal injiziert. Die verbleibenden 6 Tiere erhielten eine 1:1 (v/v) PBS-DMSO-Lösung ohne Prodrug. Die Behandlung wurde über den gesamten Versuchs-Zeitraum dreimal in der Woche durchgeführt. Das Tumolvolumen wurde wöchentlich mit einer digitalen Schieblehre bestimmt (Abb. 4.9).

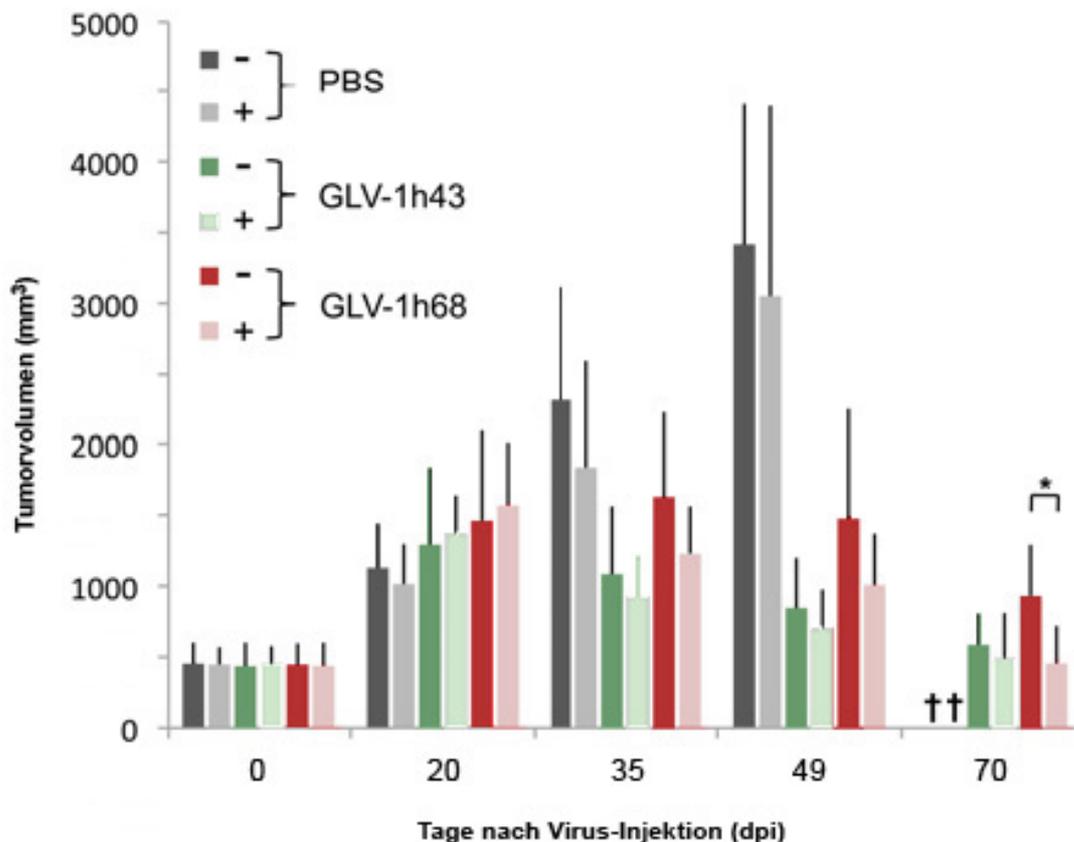


Abbildung 4.9 Tumorprogression und Onkolyse nach Kombination von rVACV- und Prodrug-Behandlung. Nude-Mäuse mit 450 mm^3 großen Tumoren wurden entweder mit PBS oder mit 5×10^8 pfu GLV-1h68 bzw. GLV-1h43 intravenös injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurden die Tumoren vermessen und das Tumolvolumen mit $(0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2)$ berechnet. Während eine Teilgruppe von 6 Mäusen einer Prodrug-Behandlung unterzogen wurde, erhielt die zweite, als Kontrolle dienende Teilgruppe, eine Injektion von 50 % DMSO/ 50 % PBS. Die Messung erfolgte bis 70 Tage nach rVACV-Injektion (d70). Im Fall der PBS-behandelten Gruppe mussten die Mäuse aufgrund der Tumorgöße bereits früher aus dem Versuch genommen werden. Dargestellt ist das durchschnittliche Tumolvolumen mit Standardabweichung. ($n=6$; * zeigte eine statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ im Vergleich zwischen Prodrug-behandelten und unbehandelten Teilgruppen). Die Prodrug-Behandlung führte in jeder Teilgruppe zu einer Abnahme der Tumorgöße, erreichte jedoch nur in der GLV-1h68-injizierten Gruppe eine statistische Signifikanz an Tag 70.

Die Messergebnisse zeigten, dass mit beiden rVACV-Stämmen Tumor-therapeutische Effekte im GI-101A-Brustkrebsmodell erzielt werden konnten. Dies wurde vor allem im direkten Vergleich zu den PBS-injizierten Kontrollen deutlich, welche aufgrund der Tumorgöße im Zeitraum von 6 bis 9 Wochen nach Injektion aus dem Versuch genommen werden mussten. Interessanterweise war eine GLV-1h43-vermittelte Therapie effektiver, verglichen mit einer GLV-1h68-Behandlung. Die Injektion des Prodrugs führte in allen behandelten Gruppen zu einer Reduzierung des Tumolvolumens im Vergleich mit der jeweilig korrespondierenden Prodrug-unbehandelten Gruppe. Jedoch erreichte der

Unterschied weder in den PBS-injizierten, noch in den GLV-1h43-behandelten Tieren eine statistische Signifikanz ($p > 0,15$). Dagegen wies die nach Injektion des *lacZ*-kodierenden Virus GLV-1h68 prodrug-behandelte Gruppe 70 dpi ein signifikant geringeres Tumolvolumen ($p < 0,006$) im Vergleich mit der unbehandelten GLV-1h68-infizierten Kontrollgruppe auf. Dabei erreichte die TumorgroÙe in der Prodrug-behandelten Gruppe zu diesem Zeitpunkt nahezu das Anfangsvolumen vor Injektion der Vaccinia Viren, wohingegen die unbehandelte Gruppe ein Durchschnitts-Volumen von 930 mm^3 aufwies.

4.1.5 Effekte von Prodrug-Behandlung auf die Kolonisierung von Tumoren mit Vaccinia Viren

Eine enzymatische Umsetzung des Prodrugs in die cytotoxisch aktive Form und ein daraus resultierendes Abtöten der Tumorzellen könnte zu einer Inhibierung der Virus-Replikation sowie zu einer Anreicherung von *lacZ*-negativen Mutanten des Virus GLV-1h68 innerhalb des Tumorgewebes führen. Um derartige mögliche Folgen einer Prodrug-Behandlung zu untersuchen, wurden Tumoren Prodrug-behandelter und -unbehandelter Tiere 71 dpi isoliert, Tumorslysate hergestellt und die Viruskonzentration mittels Plaque-Assay ermittelt (Abb. 4.10). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede der Virustiter zwischen Prodrug-behandelten und -unbehandelten GLV-1h68- und GLV-1h43-infizierten Tieren beobachtet werden.

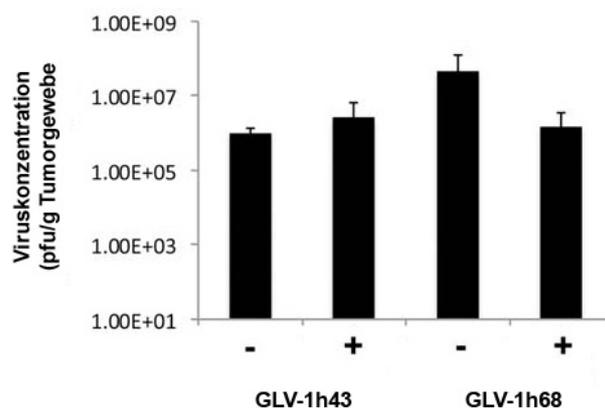


Abbildung 4.10 Korrelation von Prodrug-Behandlung und Kolonisierung von Tumoren durch Vaccinia Viren. Die intratumoralen Virus-Konzentrationen in rVACV-infizierten Tumoren 71 dpi wurden mittels Plaque-Assay bestimmt und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Prodrug-behandelten (+) und unbehandelten (-) infizierten Mäusen. Dargestellt ist die durchschnittliche Konzentration viraler Partikel pro g Tumorgewebe mit Standardabweichung ($n=2$; $p > 0,42$).

Um die mögliche Anreicherung von *lacZ*-negativen GLV-1h68-Mutanten in Prodrug-behandelten Tumoren zu untersuchen, wurden Tumorlysate sterilfiltriert (Porengröße 0,1 µm) und anschließend untersucht ob es zu einer Aktivierung des Prodrugs in Zellkultur-Experimenten kommt. Für diesen Zweck wurden die Lysate in Zellkulturmedium verdünnt (Endkonzentration 20 mg Tumorgewebe/ml Zellkulturmedium) und auf GI-101A-Zellen gegeben. Nach 2tägiger Inkubation wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay gemessen (Abb. 4.11).

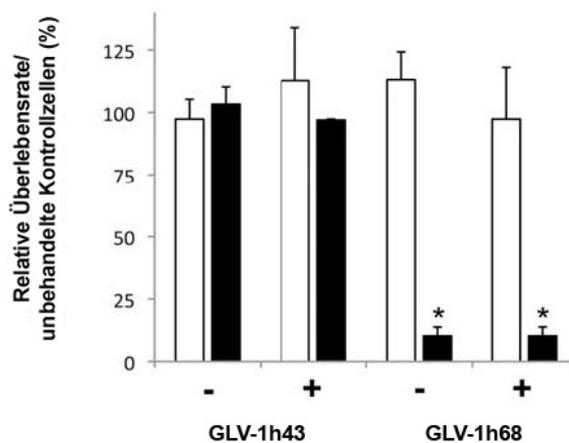


Abbildung 4.11 MTT-Proliferations-Assay zur Untersuchung von GI-101A-Zellen nach Inkubation mit Tumorlysaten. Zellen wurden mit sterilfiltrierten Tumorlysaten von GLV-1h68- und GLV-1h43-infizierten Nude-Mäusen inkubiert, welche mit Prodrug behandelt wurden (+) oder unbehandelt blieben (-). Während eine Gruppe der Zellen nach Zugabe der Tumorlysate unbehandelt blieben (weiße Balken) wurde eine zweite Gruppe mit 10 nM Prodrug behandelt (schwarze Balken). Nach 2 Tagen wurde die Zellproliferation ermittelt und direkt zwischen unbehandelten und behandelten Zellen verglichen. Für jede Gruppe wurden 2 Tumorlysate im Duplikat analysiert.

Die Zugabe des Prodrugs führte zu dessen Umwandlung, sowie einer daraus resultierenden Abtötung der Zellen, wenn die Tumorlysate aus einer zuvor GLV-1h68-injizierten Maus stammten. Hierbei war diese Prodrug-vermittelte Abtötung unabhängig davon, ob die Mäuse zuvor einer Prodrug-Behandlung unterzogen wurden oder nicht. Es konnte keine Abtötung von Zellen beobachtet werden, welche mit den Zelllysaten von GLV-1h43-infizierten Mäusen inkubiert worden waren, da durch das Fehlen des aktiven Enzyms keine Umwandlung des Prodrugs erfolgen konnte. Auch ohne Prodrug-Behandlung beider Gruppen war keine Inhibierung der Zellproliferation zu beobachten.

Zur weiteren Verifizierung der Daten wurden das Tumorgewebe wie bereits beschrieben histologisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht [164]. GI-101A-Tumorgewebe

Prodrug-behandelter GLV-1h68- und GLV-1h43-infizierter Mäuse wurde in 4 % PFA fixiert und Gewebeschnitte (100 μ m Schnittdicke) an einem Vibratom angefertigt. Benachbarte Schnitte wurden nach einer Permeabilisierung entweder mit X-Gal-Färbelösung oder Hoechst 33342 zur Färbung von Zellkernen behandelt. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Präparate in 60 % (v/v) Glycerin in PBS inkubiert und schließlich in 80 % Glycerin (v/v) in PBS eingebettet. Eine anschließende Auswertung erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop (Abb. 4.12).

Die digitalen 8-bit-RGB-Bilder (1300x1030 Pixel) wurden mit Photoshop 10.0.1 (Adobe Systems, USA) weiter verarbeitet und überlagert.

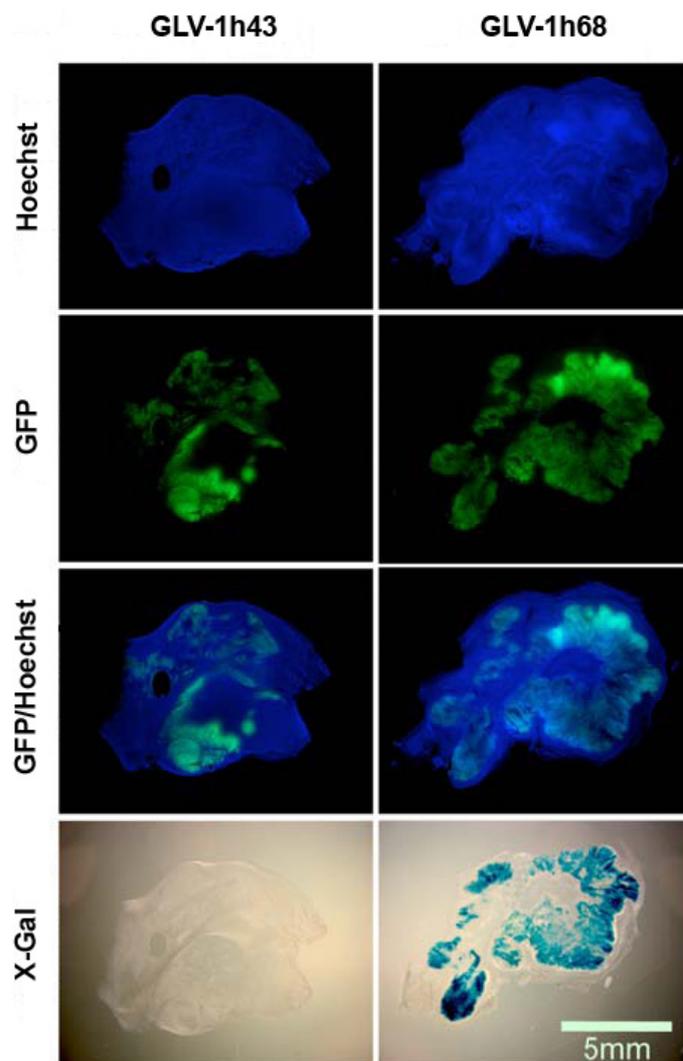


Abbildung 4.12 Tumorgewebe-Schnitte rVACV-infizierter Mäuse nach Prodrug-Behandlung. Serienschritte von Tumorgewebe GLV-1h68- (rechts) und GLV-1h43-infizierter (links) Mäuse wurden auf GFP- und β -Galactosidase-Expression untersucht. Die Nuclei wurden mit Hoechst 33342 (blau) markiert. Zum Nachweis der β -Galactosidase-Expression wurden die Gewebeschnitte mit einer X-Gal-Färbelösung inkubiert.

Die Infektion mit beiden rVACV GLV-1h68 und GLV-1h43 führten zu großen GFP-positiven Regionen innerhalb des Tumorgewebes. Eine β -Galactosidase-Färbung führte ausschließlich in GLV-1h68-infiziertem Tumorgewebe zum Nachweis. Die β -Gal-positiven Regionen korrelierten mit GFP-positiven Regionen der entsprechenden Serienschnitte. Ebenso konnte durch X-Gal Färbung gezeigt werden, dass alle untersuchten und aus dem Tumor zurückisolierten GLV-1h68 Viren funktionelle β -Galaktosidase exprimierten. Dies zeigt, dass die Prodrug-Behandlung weder zu einer Anreicherung von GLV-1h68-Mutanten mit funktionell inaktiver β -Galactosidase führt, noch die virale Replikation von Vaccinia Viren im Tumorgewebe reduziert.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine Kombination des onkolytischen, *lacZ*-exprimierenden Vaccinia Virus GLV-1h68 mit einem durch β -Galactosidase enzymatisch aktivierbarem Prodrug in Brustkrebs-Karzinomzellen GI-101A zu einer Induktion von Apoptose über den intrinsischen Signalweg führt. Darüber hinaus führte die Kombinations-Therapie *in vivo* zu einer erhöhten Tumor-Regression im Nude-Mausmodell und somit zu einer Verstärkung der onkolytischen Therapie-Effekte von Vaccinia Viren.

4.2 Immuntherapie durch Einsatz von rVACV GLV-1h80 – Gezielte Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks

Ein gemeinsames Merkmal einer Vielzahl verschiedener Krebsarten ist die erhöhte und veränderte Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren. Durch Veränderungen des Chemokin-Milieus im Tumor, vor allem durch Rekrutierung bestimmter Stromazellen, kann es sowohl zu pro- als auch zu contra-Tumorstadiums-Effekten kommen [70].

Ein zunehmendes Verständnis des komplexen lokalen Chemokin-Netzwerks bei Krebserkrankungen könnte zu vielversprechenden Therapie-Möglichkeiten führen. So kann durch gezielte Veränderung des intratumoralen Chemokin-Milieus eine durch das Immunsystem vermittelte Regression von Primärtumoren und Metastasen erzielt werden. Diese Immuntherapie kann unter anderem durch direkte Überexpression von Chemokinen unter Einsatz onkolytischer Viren als transgene Vektoren erfolgen [80]. In dieser Arbeit sollte durch den Einsatz des rekombinanten Vaccinia-Virus GLV-1h80 eine gezielte intratumorale Überexpression des Chemokins MCP-1 erzielt werden und die möglichen Effekte dieser Veränderung des intratumoralen Milieus untersucht werden.

4.2.1 Analyse und Vergleich des Replikationsverhaltens der rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80

Das Replikationsverhalten von rVACV kann durch verschiedene Faktoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusst werden. Daraus können Unterschiede in Virus-Spreading und Amplifikation viraler Partikel resultieren. Diese können sowohl auf zellulären Eigenschaften verschiedener Wirtssysteme beruhen oder durch Unterschiede der rekombinanten Viren selbst hervorgerufen werden. Die Insertion verschiedener Gene kann die virale Replikation in Effizienz und Geschwindigkeit beeinflussen. Um mögliche Effekte der Expression des Chemokins MCP-1 auf die Virus-Replikation zu untersuchen, wurde das Replikationsverhalten von rVACV GLV-1h80 in den humanen Tumorzelllinien GI-101A und HT-29-CBG mit der Replikation des Kontrollvirus GLV-1h68 verglichen.

4.2.1.1 *In vitro* Replikation in GI-101A- und HT-29-CBG-Zellen

GI-101A- und HT-29-CBG-Zellen wurden in 24-well-plates ausgesät und mit den rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80 infiziert (MOI 0,5). Um das Replikationsverhalten der beiden Viren im Zuge des Infektionsverlaufs zu quantifizieren, wurden zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 48 und 72 hpi die Zellkultur-Überstände entnommen und Lysate der Zellen hergestellt. Die Ermittlung der viralen Titer erfolgte mittels Plaque-Assay (Abb. 4.13).

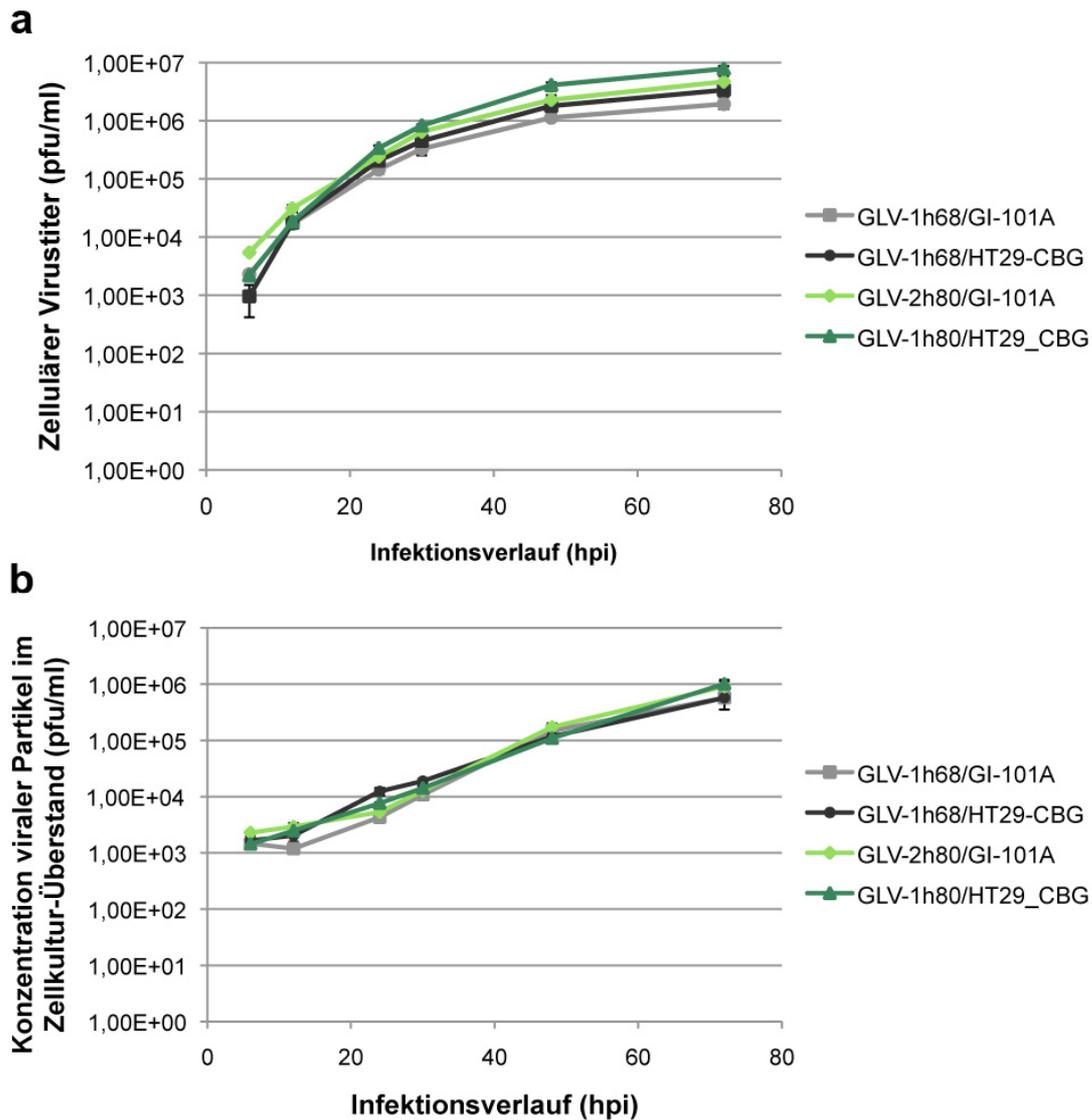


Abbildung 4.13 Quantifizierung der viralen Partikel in GI-101A- und HT-29-CBG-Zellen nach Infektion mit rVACV. Die Zellen wurden mit den rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 bei Erreichen einer 95%igen Konfluenz infiziert (MOI 0,5). Der Titer zellassoziierter Viruspartikel (**a**) sowie durch Zellyse in den Überstand freigesetzter Partikel (**b**) zu den Zeitpunkten 6, 12, 24, 30, 48 und 72 hpi wurde mittels Plaque-Assay ermittelt. Dargestellt sind die mittleren Konzentrationen in pfu/ml mit Standardabweichung und logarithmischer Skalierung (n=3). (Diplomarbeit Jennifer Reinboth)

In beiden Zelllinien konnte eine Zunahme der infektiösen Partikel der rVACV während des Infektionsverlaufs bis 72 hpi beobachtet werden. Jedoch führte die Infektion mit beiden Viren 72 hpi zu 1,6 - 1,7fach höheren Viruskonzentrationen in HT-29-CBG-Zellen im Vergleich zu GI-101A-Zellen. Interessanterweise ändert sich dieses Verhältnis erst im Laufe der Infektion, da 6 hpi sowohl die GLV-1h68- als auch die GLV-1h80-Virustiter in den GI-101A-Zellen 2fach höhere Konzentrationen im Vergleich zu den Titern in HT-29-CBG aufwiesen. Der direkte Vergleich der beiden Vaccinia-Viren zeigte, dass eine GLV-1h80-Infektion beider

Tumorzelllinien 72 hpi zu einer im Vergleich zu den nach einer GLV-1h68-Infektion erhaltenen Viruskonzentrationen 2,4fach höheren Konzentration zellassoziierter Viruspartikel führt zu einer . Dieser Trend setzte sich während des gesamten Infektionsverlaufs ab 6 hpi weiter fort. Die Insertion des MCP-1-codierenden Gens in das Virusgenom hatte somit keinerlei negative Auswirkungen auf das Replikationsverhalten von GLV-1h80 in den untersuchten humanen Zelllinien GI-101A und HT-29-CBG.

4.2.1.2 *In vivo* Replikation in den humanen Tumormodellen GI-101A und HT-29-CBG

Viele Studien belegen die Fähigkeit onkolytischer Viren nach einer systemischen Verabreichung bestehende solide Tumoren zu kolonisieren [165, 166]. Auch für rVACV GLV-1h68 wurde die Fähigkeit, nach einer intravenösen Injektion GI-101A-Tumorgewebe zu lokalisieren sowie innerhalb dieses Gewebes zu replizieren beschrieben [29]. Diese zielgerichtete Replikation von GLV-1h68 konnte darüber hinaus auch in Hunde-Tumorgewebe nachgewiesen werden und ist somit nicht auf humanes Tumorgewebe beschränkt [167]. Um das Replikationsverhalten von rVACV GLV-1h80 zu charakterisieren und mögliche Unterschiede zu GLV-1h68 aufzufinden wurde das Tumorgewebe mock-, GLV-1h68- und GLV-1h80-infizierter Tiere zu den Zeitpunkten 7, 21 sowie 42 dpi entfernt und homogenisiert. Die Viruskonzentration wurde mittels Standard Plaque-Assay ermittelt (Abb. 4.14).

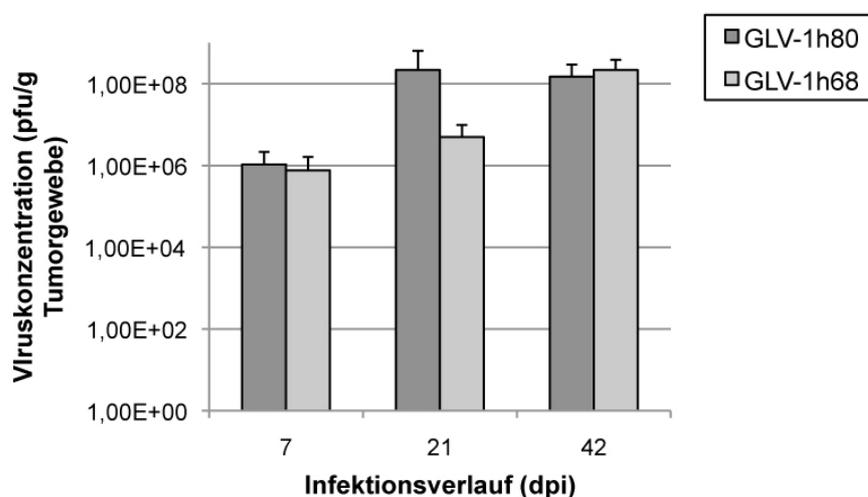


Abbildung 4.14 Kolonisierung von humanen GI-101A-Xenotransplantaten nach systemischer Injektion von rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80. Tumorgewebe mock-, GLV-1h68- und GLV-1h80-infizierter Tiere wurde zu den Zeitpunkten 7, 21 und 42 dpi entnommen und homogenisiert. Um das zeitliche Replikationsverhalten der beiden Viren zu ermitteln, wurden die intratumoralen Viruskonzentrationen mittels Standard Plaque-Assay

bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Konzentration viraler Partikel pro g Tumorgewebe nach einer Injektionsdosis von 5×10^6 pfu/ml mit Standardabweichung ($n=4$). Um die zu den späteren Zeitpunkten vergleichbar geringe Viruskonzentration zum Zeitpunkt 8 dpi darzustellen wurde eine logarithmische Darstellung der Daten gewählt.

Eine intravenöse Injektion der beiden rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 führte bereits 7 dpi zu nachweisbaren Virusmengen in GI-101A-Tumorgewebe. Die Konzentration lag hierbei nach Infektion mit GLV-1h80 mit $1,06 \times 10^6$ pfu/g Tumorgewebe etwas über $7,5 \times 10^5$ pfu/g Tumorgewebe nach GLV-1h68-Injektion. Dieses unterschiedliche Replikationsverhalten wurde 21 dpi noch deutlicher. Zu diesem Zeitpunkt konnten innerhalb GLV-1h68-infizierten Tumoren durchschnittlich $4,98 \times 10^6$ pfu/g Tumorgewebe nachgewiesen werden, in GLV-1h80-infiziertem hingegen Gewebe eine ca. 43fach höhere Konzentration von $2,18 \times 10^8$. Diese Daten korrelieren direkt mit den *in vitro*-Replikationsdaten, die höhere Viruskonzentrationen in GLV-1h80-infizierten GI-101A-Zellen im Vergleich zu GLV-1h68-infizierten zeigten (Abb. 4.13). Nach 42 dpi dagegen war der GLV-1h68-Titer mit $2,18 \times 10^8$ ca. doppelt so hoch als der Titer in GLV-1h80-infizierten Xenotransplantaten.

Um das Replikationsverhalten der beiden rVACV im humanen HT-29-CBG-Kolon-Adenokarzinom-Modell zu untersuchen, wurden die Viruskonzentrationen zum Zeitpunkt 42 dpi direkt mit den Konzentrationen in GI-101A-Tumoren verglichen (Abb. 4.15).

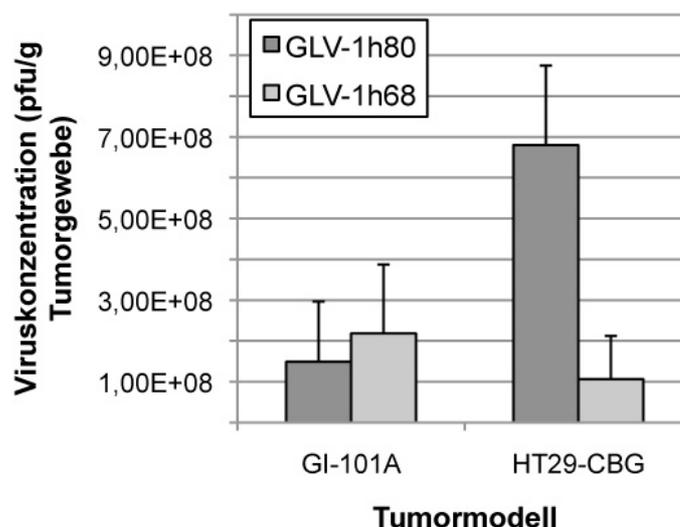


Abbildung 4.15 Vergleich der Kolonisierung von humanen GI-101A- und HT-29-CBG-Xenotransplantaten 42 Tage nach systemischer Injektion von rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80. GI-101A- bzw. HT-29-CBG-Tumorgewebe GLV-1h68- und GLV-1h80-infizierter Tiere wurde 42 dpi entnommen und homogenisiert. Die intratumoralen Viruskonzentrationen beider rVACV wurden mittels Standard Plaque-Assay bestimmt. Dargestellt

ist die durchschnittliche Konzentration viraler Partikel pro g Tumorgewebe nach einer Injektionsdosis von 5×10^6 pfu/ml mit Standardabweichung (n=2).

Während eine systemische Injektion von GLV-1h80 42 dpi zu einer mittleren Konzentration von $6,8 \times 10^8$ pfu/ml in HT-29-CBG-Tumoren, und somit zu 4.5fach erhöhten Werten verglichen mit Titern im GI-101-Tumormodell führten, war der GLV-1h68-Virustiter im HT-29-CBG-Tumormodell niedriger. Ein Vergleich der Konzentrationen der beiden rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 in HT-29-CBG-Tumoren ergab über 6fach höhere Konzentrationen nach GLV-1h80-Infektion.

Diese Ergebnisse zeigten somit ebenfalls, wie bereits die *in vitro*-Replikationsdaten, dass die Insertion des MCP-1-Gens auch in lebenden Tieren keinerlei negative Auswirkungen auf das Replikationsverhalten des rVACV GLV-1h80 hatte.

4.2.1.3 Tumorspezifität und systemische Verteilung viraler Partikel nach rVACV-Injektion

Um unerwünschte Nebeneffekte zu verhindern, sollte die Toxizität onkolytischer Viren lokal auf das Tumorgewebe begrenzt sein. Injektion von Vaccinia-Viren des Wildtyp-Stamm L1VP führt hingegen zu hohen viralen Titern in Organen wie Lunge, Milz und Leber [29]. Durch den Einsatz attenuierter Vaccinia Viren kann die Tumorspezifität und somit die Sicherheit nach systemischer Injektion erhöht werden. Um die Verteilung und Replikation der rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 nach systemischer Injektion in Tumor-tragenden Nude-Mäusen zu untersuchen, wurden Organe 21 und 42 dpi entnommen und die Virustiter mittels Standard Plaque-Assay bestimmt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1 Verteilung von rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 nach systemischer Injektion.

Tab. 4.1	GLV-1h80		GLV-1h68	
	21 dpi	42 dpi	21 dpi	42 dpi
Milz	0	0	0	0
Leber	0	0	0	0
Herz	0	0	0	0
Lunge	0	0	0	0
Tumor	$2,18 \times 10^6$	$1,44 \times 10^8$	$4,98 \times 10^6$	$2,18 \times 10^8$

Organe und Tumorgewebe wurden 21 und 42 dpi entnommen und homogenisiert. Die Viruskonzentration wurde mittels Standard Plaque-Assay bestimmt. (n=4).

Die Replikation beider rVACV beschränkte sich 21 und 42 dpi ausschließlich auf das Tumorgewebe. Zu beiden Zeitpunkten konnten keine nachweisbaren Mengen an Vaccinia-Viren in Milz, Leber, Herz und Lunge nachgewiesen werden. Die Toxizität der beiden Viren war somit ausschließlich auf das Tumorgewebe begrenzt.

4.2.1.4 Monitoring des Infektionsverlaufs anhand der Expression des Markerproteins GFP in Tumor-tragenden Mäusen

Um den Verlauf der Infektion durch rVACV in athymischen Nude-Mäusen mit GI-101A-Tumoren zu verfolgen, wurden 30 Tage nach Implantation der Tumorzellen 5×10^6 pfu/ml GLV-1h68 oder GLV-1h80 intravenös injiziert. Die Replikation beider Viren-Stämme wurde 7, 14, 22, 28 und 42 dpi anhand der GFP-Expression im Tumorgewebe quantifiziert (Abb. 4.16).

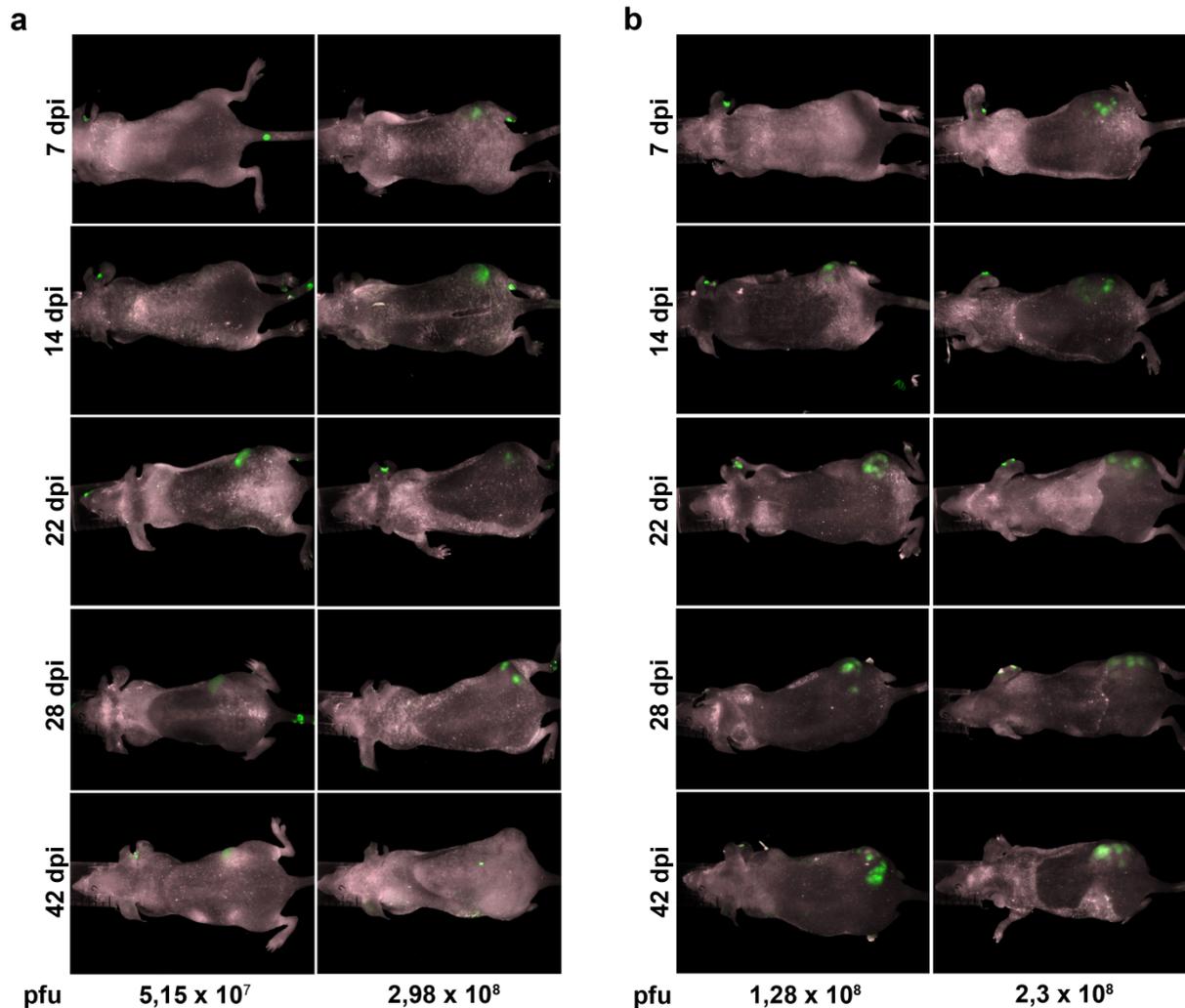


Abbildung 4.16 Monitoring des Infektionsverlaufs von rVACV anhand der GFP-Expression. 4-5 Wochen alten Nude-Mäusen wurden 5×10^6 GI-101A-Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert und bei Erreichen einer Tumorgröße von $400-500 \text{ mm}^3$ 5×10^6 pfu/ml (**a**) GLV-1h80 bzw. (**b**) GLV-1h68 intravenös injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine PBS-Injektion. 7, 14, 22, 28 und 42 dpi wurde die GFP-Expression dokumentiert. 42 dpi wurden die Tumoren entnommen und der Virustiter (Gesamt-pfu/Tumor) mittels Standard Plaque Assay bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Beispiele.

7 Tage nach Injektion von rVACV konnte bei einigen Tieren bereits eine deutliche GFP-Expression im des Tumorgewebe nachgewiesen werden. Bei allen untersuchten Virus-Stämmen trat diese GFP-Expression teilweise auch erst zu späteren Zeitpunkten auf und nahm im weiteren Infektionsverlauf bis 22 dpi an Intensität zu. Die Signalstärke nahm jedoch im weiteren Infektionsverlauf, besonders nach Infektion mit GLV-1h80, zunehmend ab. Zum Zeitpunkt 42 dpi konnte bei ca. einem Drittel der GLV-1h80-injizierten Tiere kein nachweisbares GFP-Signal mehr optisch detektiert werden. Die Bestimmung der intratumoralen Viruskonzentrationen zeigten jedoch zu diesem Zeitpunkt immer noch

Viruskonzentrationen im Bereich von 1×10^7 bis 1×10^8 . Durch Berechnung der Signalstärke der GFP-Fluoreszenz konnte sowohl die Gesamtfluoreszenz bezogen auf das gesamte Tumorgewebe als auch die durchschnittliche Fluoreszenz ermittelt werden (Abb. 4.17).

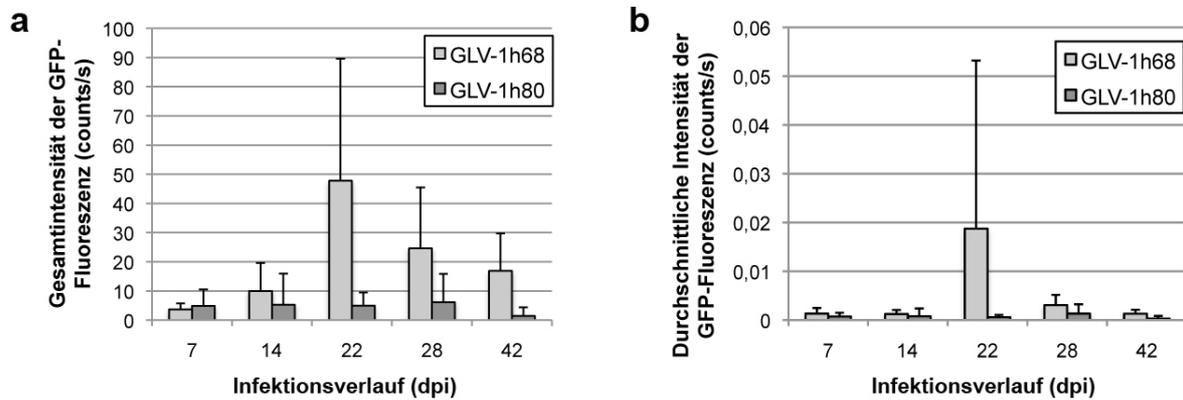


Abbildung 4.17 GFP-Signalstärke nach Infektion GFP-exprimierender rVACV. Tumor-tragenden Nude-Mäuse wurden die rVACV GLV-1h80 bzw. GLV-1h68 intravenös appliziert und die GFP-Expression 7, 14, 22, 28 und 42 dpi gemessen. Anschließend wurde sowohl die Gesamt-Signalstärke pro Tumor (**a**) als auch die durchschnittliche Intensität des Fluoreszenzsignals (**b**) berechnet und die Signalstärken der beiden Viren verglichen. Dargestellt ist die gemittelte Signalstärke in counts/s mit entsprechender Standardabweichung (n=6).

Während die Fluoreszenz bezogen auf das gesamte Tumorgewebe 7 dpi nach GLV-1h80-Infektion höher lag als nach GLV-1h68-Infektion, war das durchschnittliche Signal geringer, bedingt durch Unterschiede in der Tumorgöße. Während größere Tumore schwächer leuchteten war das Signal kleinerer Tumoren oftmals stärker. Die Fluoreszenz des gesamten Tumors nahm im weiteren Infektionsverlauf nach GLV-1h68-Injektion deutlich zu und erreichte 22 dpi eine nahezu 10fach höhere Intensität im Vergleich zu GLV-1h80-infizierten Tumoren. Während die GFP-Fluoreszenz GLV-1h80-infizierter Tumore zum Zeitpunkt 42 dpi stark abnahm und unterhalb der anfänglichen Werte zum frühen Zeitpunkt 7 dpi lag, nahm diese nach GLV-1h68-Infektion zwar ab, war jedoch noch 4-5-mal stärker als 7 dpi. Betrachtet man dagegen die durchschnittliche Fluoreszenz nach GLV-1h68-Infektion, so liegt diese 42 dpi etwa bei der anfänglichen Intensität 7 dpi, nach GLV-1h80-Infektion dagegen unterhalb des Wertes zum Zeitpunkt 7 dpi.

4.2.2 Detektion und Quantifikation der MCP-1-Expression in Tumorzellen

4.2.2.1 Nachweis und Quantifizierung der MCP-1-Expression auf transkriptioneller Ebene mittels real-time PCR

Für den Nachweis der Transkription des durch das rVACV codierten Chemokins MCP-1 wurden GI-101A-Zellen in 6-well-plates ausgesät und nach 2 Tagen mit einer MOI 10 mit den beiden Viren infiziert bzw. mock-infiziert. Eine, 6, 12, 24 und 48 hpi wurde die zelluläre RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und die genomische DNA durch einen DNase-Verdau entfernt. Die isolierte RNA wurde durch enzymatische Behandlung mit Reverser Transkriptase zu cDNA konvertiert und im Zuge einer real-time PCR amplifiziert. Mit Hilfe spezifischer Primer konnte durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* die Konzentration des Transkripts unter Verwendung eines Standards quantifiziert werden (Abb. 4.18). Hierbei diente das MCP-1-Plasmid als Standard und wurde in einer Verdünnungsreihe von 1 µg – 10 pg eingesetzt. Weder in den uninfizierten Kontrollzellen noch in GLV-1h68-infizierten Zellen konnte ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden.

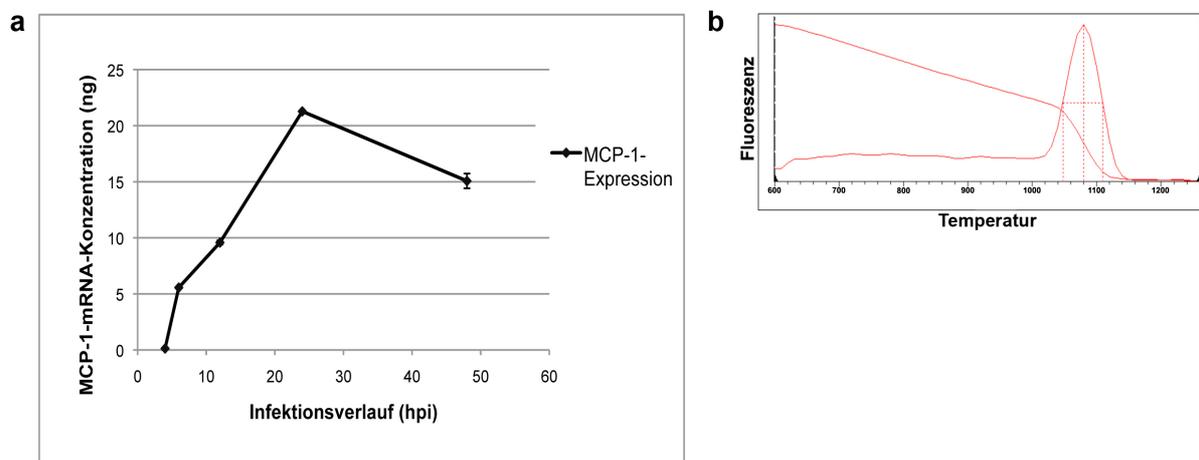


Abbildung 4.18 Quantifizierung der transkriptionellen MCP-1-Expression nach Infektion mit rVACV GLV-1h80. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte eine Amplifikation des Templates unter Verwendung MCP-1-spezifischer Primer. **(a)** Transkriptionelle Expressions-Kinetik des Chemokins MCP-1 während des Infektionsverlaufs von rVACV GLV-1h80. **(b)** Exemplarische dargestellte Schmelzkurve für das MCP-1-spezifische Fragment. Der Vergleich der einzelnen Schmelzkurven dient als Nachweis einer einheitlichen Amplifikation und zum Ausschließen unspezifischer PCR-Produkte.

Eine Infektion von GI-101A-Zellen mit GLV-1h80 führte auf transkriptioneller Ebene zu einer steigenden MCP-1-Expression während des Infektionsverlaufs. 24 hpi erreichte die Konzentration der MCP-1-mRNA ein Maximum und nahm 48 hpi ab, was vermutlich auf eine fortschreitende Zellyse durch das Virus zurückzuführen war.

4.2.2.2 In vitro Quantifikation der MCP-1-Expression durch das ELISA-Testverfahren

Anhand der real-time PCR konnte nachgewiesen werden, dass das durch GLV-1h80 codierte *MCP-1*-Gen nach Infektion humaner Zellen transkribiert wurde. Für eine erfolgreiche Immuntherapie jedoch ist die Translation der spezifischen mRNA und somit die Expression des Proteins nötig. Zur Untersuchung der Expressions-Kinetik des MCP-1-Proteins wurden GI-101A- bzw. HT-29-CBG-Zellen ausgesät und nach Erreichen einer 95%igen Konfluenz mit den rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80 infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen der jeweiligen Zelllinie. Da das exprimierte Chemokin, bedingt durch ein Exportsignal aus der Zelle transportiert wird und seine funktionelle Wirkung nach Sekretion entfaltet, wurde zu den Zeitpunkten 1, 4, 6, 12, 24 und 48 hpi der Überstand der infizierten bzw. mock-infizierten Zellen entnommen und mittels eines MCP-1-spezifischen ELISA die Konzentrationen bestimmt. Zur Quantifizierung der Protein-Konzentrationen in den einzelnen Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe des rekombinanten Proteins von 1000 bis 16 pg/ml angesetzt (Abb. 4.19).

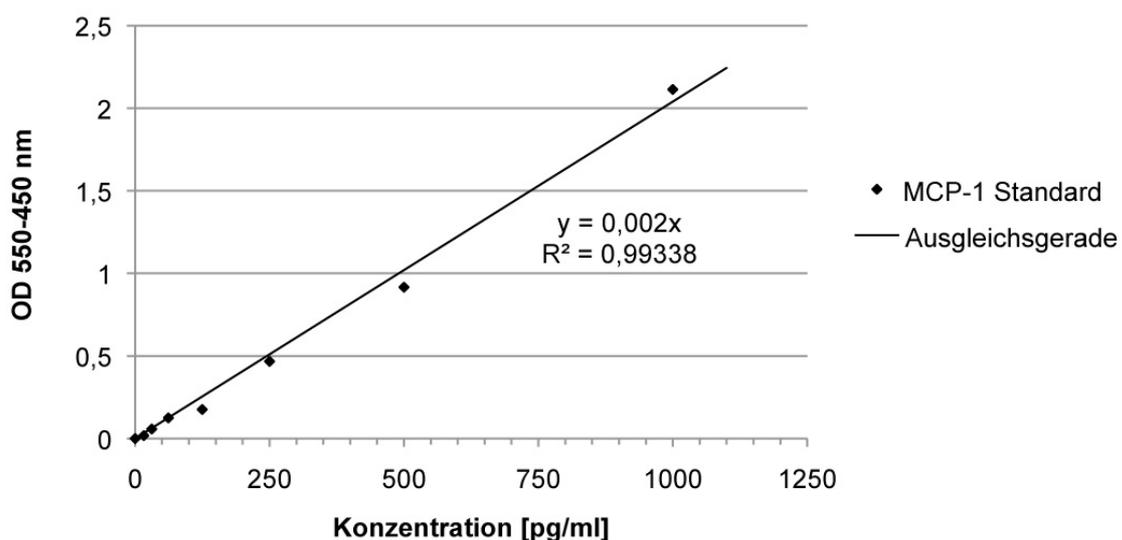


Abbildung 4.19 MCP-1-Standard des rekombinanten Proteins. Zur anschließenden Ermittlung der MCP-1-Konzentrationen in den untersuchten Proben wurde eine Standardverdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31 und 16 pg/ml erstellt.

Anhand der erhaltenen Geradengleichung konnten die MCP-1-Konzentrationen in Zellkulturüberständen nach Infektion mit GLV-1h80 ermittelt werden (Abb. 4.20). Weder in mock-infizierten noch in GLV-1h68-infizierten GI-101A-Zellen konnte eine Expression des murinen MCP-1 nachgewiesen werden.

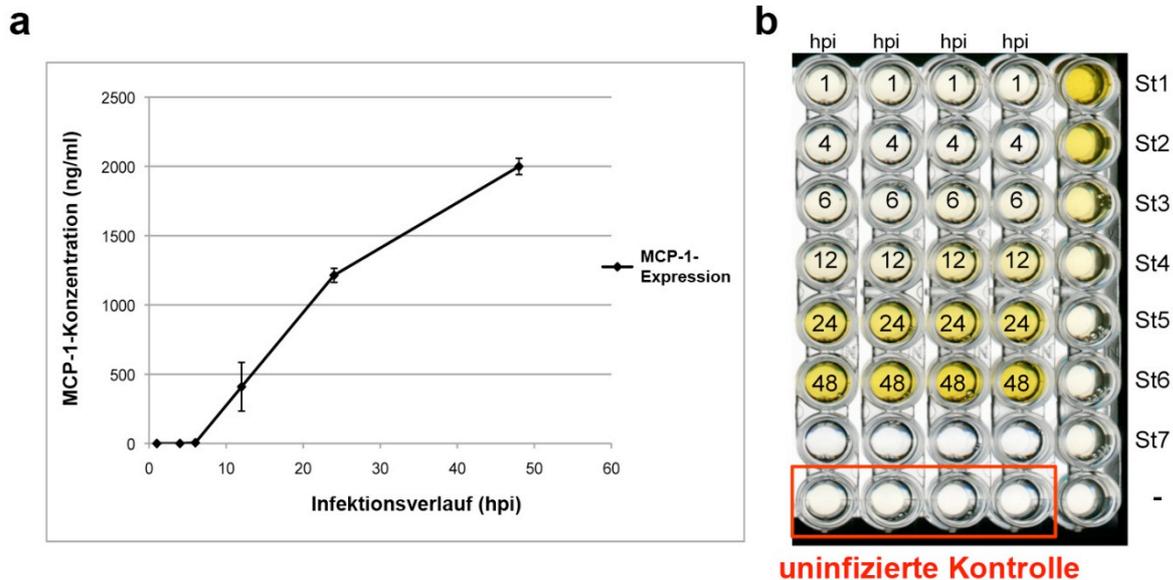


Abbildung 4.20 Bestimmung der MCP-1-Proteinkonzentration nach Infektion mit GLV-1h80. GI-101A-Zellen wurden bei Erreichen einer 95%igen Konfluenz mit rVACV GLV-1h80 infiziert (MOI 10) und 1, 4, 6, 12, 24 und 48 hpi die Überstände der Zellen entnommen. **(a)** Anhand eines MCP-1-Standards (St1–St7) wurden die Konzentrationen in den einzelnen Proben ermittelt. **(b)** ELISA-Testplatte nach Zugabe der Substrat-Reaktion. Anhand des enzymatisch hervorgerufenen Farbumschlags wurde durch Messung der optischen Dichte die Konzentration, basierend auf der Standardverdünnungsreihe ermittelt.

Infektion der humanen Brustkrebs-Zelllinie GI-101A mit GLV-1h80 führte zu einer während des Infektionsverlaufs ansteigenden Expression des Virus-codierten murinen MCP-1-Proteins. Bereits 6 hpi konnte eine Konzentration von 0,1 ng/ml MCP-1 im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Bis zum Zeitpunkt 48 hpi stieg diese Konzentration auf 2 µg/ml an. Durch ELISA-Test konnte gezeigt werden, dass es über die transkriptionelle Ebene hinaus auch auf Translations-Ebene zur Expression von MCP-1 nach Infektion humaner Krebszellen mit GLV-1h80 kommt.

Die Infektion von HT-29-CBG-Zellen führte zu einer vergleichbaren Expressionskinetik von rekombinantem MCP-1, mit steigenden Konzentrationen im Infektionsverlauf von GLV-1h80 (Abb. 4.21). Jedoch waren die Konzentrationen wesentlich niedriger als nach Infektion von GI-101A-Zellen.

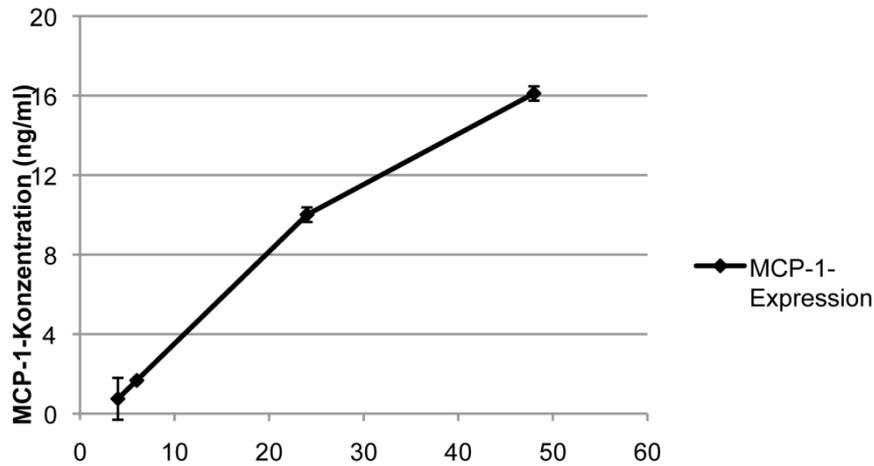


Abbildung 4.21 Bestimmung der MCP-1-Proteinkonzentration nach Infektion mit GLV-1h80. HT-29-CBG-Zellen wurden bei Erreichen einer 95%igen Konfluenz mit rVACV GLV-1h80 infiziert (MOI 10) und 4, 6, 24 und 48 hpi die Überstände der Zellen entnommen. Durch einen MCP-1-spezifischen ELISA wurden die MCP-1-Konzentrationen basierend auf der Standardverdünnungsreihe ermittelt.

Infektion der humanen Kolon-Adenokarzinom-Zellen HT-29-CBG mit GLV-1h80 führte, analog zu den Ergebnissen nach Infektion von GI-101A-Zellen, zu einer mit dem Infektionsverlauf ansteigenden Expression des Virus-codierten murinen MCP-1-Proteins. Jedoch lagen die Konzentrationen deutlich niedriger als die MCP-1-Konzentration in Zellkultur-Überständen GLV-1h80-infizierter GI-101A-Zellen. Zwar erreichte die MCP-1-Konzentration 6 hpi mit 1,6 ng/ml in Zellkultur-Überständen 16fach höhere Werte als nach Infektion von GI-101A-Zellen, jedoch stieg die Konzentration im weiteren Infektionsverlauf bis 48 hpi nur noch geringfügig auf 16 ng/ml an. Damit war die MCP-1-Konzentration 42 hpi in Zellkultur-Überständen GLV-1h80-infizierter HT-29-CBG-Zellen 120fach niedriger als nach Infektion von GI-101A-Zellen. In Zellkultur-Überständen GLV-1h68- und mock-infizierter Zellen konnte analog zu den Ergebnissen bei Infektion von GI-101A-Zellen murines MCP-1 nicht nachgewiesen werden.

4.2.2.3 In vivo Quantifizierung der MCP-1-Expression in den Tumormodellen GI-101A und HT-29-CBG

Um mögliche therapeutische Effekte durch Veränderungen des Chemokin-Milieus zu erzielen, muss eine Expression des rekombinanten Proteins MCP-1 auch in lebenden Tumor-tragenden Mäusen erfolgen. Um diese Expression zu untersuchen, wurden 4-6 Wochen alten Nude-Mäusen 5×10^6 GI-101A-Zellen an der rechten Flanke subkutan injiziert. Diese Injektion führte 30 Tage nach Injektion zur Bildung von ca. 450 mm^3 großen Tumoren. Die Mäuse wurden jeweils in Gruppen von 12 Tieren aufgeteilt und PBS oder 5×10^6 pfu des Virus GLV-1h68 oder GLV-1h80 intravenös injiziert. Um die MCP-1-Expression während des Infektionsverlaufs zu untersuchen, wurden 8, 21, 28, 35 und 42 dpi jeweils 4 Tumore entnommen und anschließend Tumor-Proteinlysate hergestellt. Mittels ELISA-Technik konnte die Konzentration des murinen MCP-1 in den einzelnen Tumorproben bestimmt werden (Abb. 4.22).

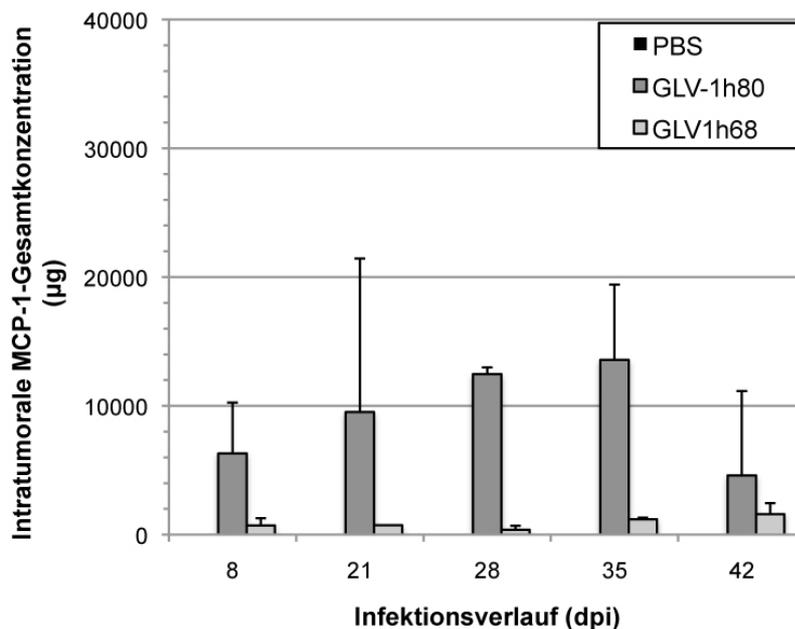


Abbildung 4.22 Quantifikation der MCP-1-Konzentration in GI-101A-Tumoren. Tumor-tragenden Nude-Mäusen wurde 30 Tage nach Implantation $100 \mu\text{l}$ PBS oder 5×10^6 pfu/ml von rVACV GLV-1h68 oder GLV-1h80 injiziert. 8, 21, 28, 35 und 42 dpi wurde das Tumorgewebe entfernt und Protein-Lysate hergestellt. Anhand einer Standardverdünnungsreihe wurden die Konzentrationen in den einzelnen Proben ermittelt. Dargestellt ist die durchschnittliche intratumorale MCP-1-Gesamtkonzentration (a) bzw. die MCP-1-Konzentration pro g Tumorgewebe (b) mit Standardabweichung ($n=4$).

Die Infektion von GI-101A-Tumoren mit GLV-1h80 führte zu einer, während des Infektionsverlaufs steigenden, Expression des murinen MCP-1. Bereits 8 dpi erreichte die intratumorale Gesamtkonzentration durchschnittlich 6 mg, nahm bis 35 dpi auf ca. 13 mg zu und fiel 42 dpi wieder auf ca. 4,5 mg. Darüber hinaus führte eine Infektion mit dem GLV-1h68-Stamm, welcher kein inseriertes MCP-1-Gen aufweist, dennoch zu einer Zunahme der MCP-1-Konzentration im Tumor, verglichen mit den unbehandelten PBS-Kontrollen, deren MCP-1-Konzentration in einigen Proben unterhalb der nachweisbaren Grenze lag. Die Konzentration nahm auch in GLV168-infizierten GI-101A-Tumoren während des Infektionsverlaufs zu, überstieg jedoch nicht 1,5 mg.

Um mögliche Unterschiede zwischen GI-101A- und HT-29-CBG-Tumormodell zu ermitteln, wurden 5×10^5 HT-29-CBG-Zellen an der rechten Flanke 4-6 Wochen alter Nude-Mäuse subkutan injiziert. 14 Tage nach Implantation der Zellen wurden den Mäusen 5×10^6 pfu der rVACV GLV-1h80 bzw. GLV-1h68 in die Schwanzvene injiziert. Kontrolltiere erhielten eine PBS-Injektion. Nach 42 dpi wurden die Tumoren entnommen und Proteinlysate angefertigt, welche mittels eines MCP-1-spezifischen ELISA untersucht wurden (Abb. 4.23).

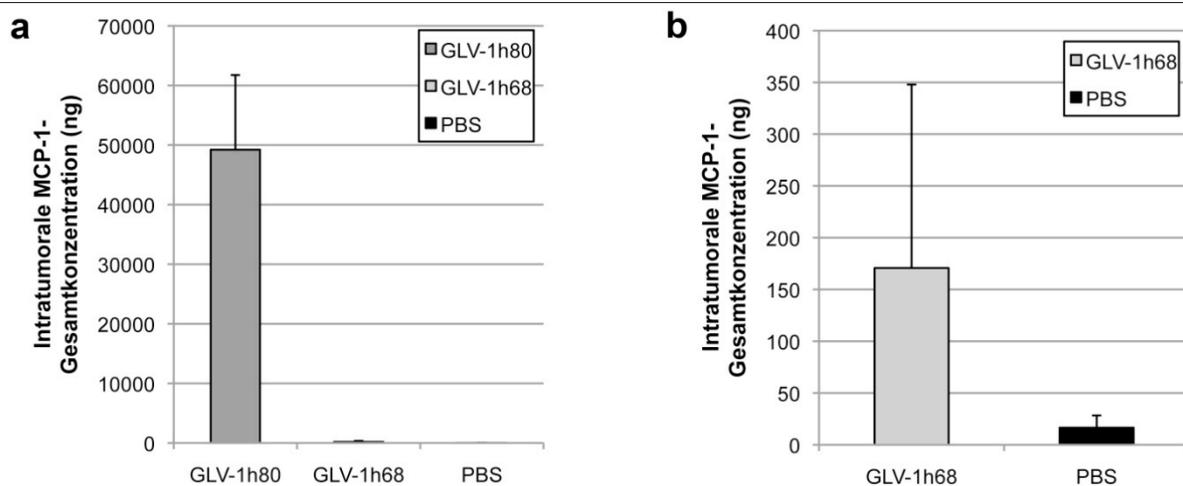


Abbildung 4.23 Quantifizierung der MCP-1-Konzentration in HT-29-CBG-Tumoren. 14 Tage nach Implantation von 5×10^5 HT-29-CBG-Zellen in die rechte Flanke von 4-5 Wochen alten Nude-Mäusen wurden 100 μ l PBS oder 5×10^6 pfu/ml der rVACV GLV-1h68 oder GLV-1h80 injiziert. Nach 42 dpi wurde das Tumorgewebe entfernt und Protein-Lysate hergestellt. Anhand einer Standardverdünnungsreihe wurden die Konzentrationen in den einzelnen Proben bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche intratumorale MCP-1-Gesamtkonzentration in ng mit Standardabweichung (a) nach GLV-1h80-, GLV-1h68- bzw. mock-Infektion und (b) die Konzentrationen ausschließlich nach GLV-1h68- und mock-Infektion. (n=6, Ausnahme PBS: n=3 da die Mäuse der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 42 dpi teilweise aufgrund der TumorgroÙe aus dem Versuch entnommen werden mussten)

Die durch ELISA ermittelten intratumoralen MCP-1-Konzentrationen lagen 42 dpi in HT-29-CBG-Tumoren deutlich unter den Konzentrationen der untersuchten GI-101A-Tumoren. Dieser Konzentrationsunterschied war nicht ausschließlich auf GLV-1h80-infiziertes Tumorgewebe begrenzt, sondern trat auch zwischen GLV-1h68- und mock-infizierten Tumoren der beiden Tumormodelle auf. 42 dpi lag die intratumorale MCP-1-Konzentration in HT-29-CBG-Tumoren durchschnittlich bei 49 µg und somit 90fach unterhalb des Wertes in GI-101A-Tumoren zum gleichen Zeitpunkt. Diese Divergenz war in den Proben GLV-1h68-infizierter Tumore noch stärker und führte 42 dpi zu einer deutlich geringeren MCP-1-Konzentration von 0,17 µg in HT-29-CBG-Heterotransplantaten. Eine Injektion von GLV-1h68 führte auch in diesem Tumormodell zu einer Erhöhung der MCP-1-Konzentration, allerdings war diese im Vergleich zur Erhöhung der durch GLV-1h80-Injektion verursachten Konzentration gering.

4.2.2.4 Monitoring der lokalen MCP-1-Expression im Blutserum und in Organen Tumor-tragender Mäuse

Zur Ausübung funktioneller Aktivität müssen Chemokine nach der Synthese zur Zellmembran transportiert und sezerniert werden. Erst nach dem Export kann MCP-1 an den korrespondierenden Rezeptor CCR2 binden und die chemotaktische Wirkung entfalten [168, 169]. Untersuchung der Tumorsysate mittels ELISA zeigte, dass es nach Injektion von GLV-1h80 zu einer starken Zunahme der MCP-1-Konzentration im Tumorgewebe kommt. Das Virus-codierte Chemokin wurde somit transkribiert und translatiert. Um jedoch einen Konzentrationsgradienten herbei zu führen und somit eine Chemotaxis der verschiedenen Zielzellen auszulösen, ist die Freisetzung des gebildeten MCP-1 notwendig. Um zu untersuchen, ob das synthetisierte MCP-1 aus infizierten Zellen freigesetzt wird, wurden Blutseren (Abb. 4.24) und Organlysate (Abb. 4.23) GLV-1h80-, GLV-1h68- und mock-infizierter Tiere in einem MCP-1-spezifischen ELISA getestet.

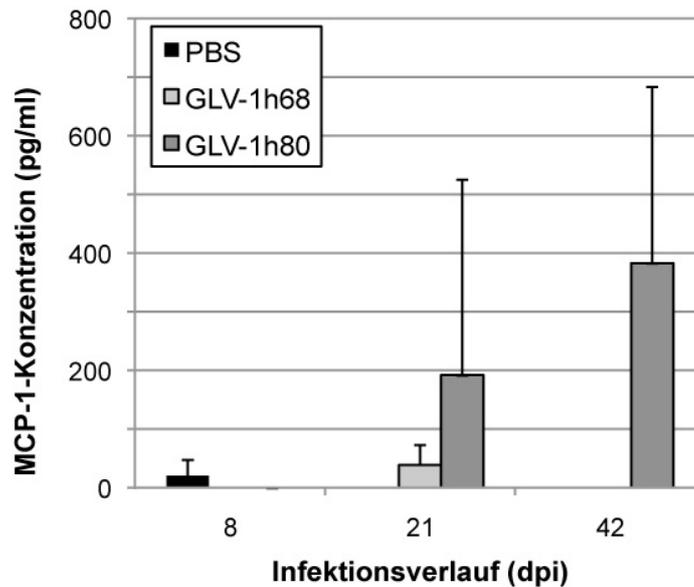


Abbildung 4.24 Quantifizierung der MCP-1-Expression in Blutseren Tumor-tragender Nude-Mäuse nach Injektion von rVACV bzw. PBS. Mittels Herzpunktion wurden Blutproben mock-, GLV-1h80- und GLV-1h68-infizierter Tiere 8, 21, und 42 dpi gewonnen. Die MCP-1-Konzentration des nach der Zentrifugation in Microtainer-Tubes erhaltenen Blutserums wurde mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt ist die mittlere Konzentration in pg/ml mit Standardabweichung (n=3).

Innerhalb des Infektionsverlaufs mit GLV-1h80 kommt es ab 21 dpi zu einer nachweisbaren Erhöhung der MCP-1-Konzentration im Blutserum Tumor-tragender Tiere. Die Konzentration ist hierbei 5fach erhöht im Vergleich zu den MCP-1-Konzentrationen im Blutserum GLV-1h68-infizierter Mäuse. Im Blut mock-infizierter Kontroll-Tiere konnte ausschließlich zum frühen Zeitpunkt 8 dpi eine geringe Konzentration MCP-1 im Blut nachgewiesen werden. 42 dpi lagen die Konzentrationen im Blutserum mock- und GLV-1h68-infizierter Tiere unterhalb der Nachweisgrenze, erreichten nach Infektion mit GLV-1h80 dagegen Konzentrationen von über 600 pg/ml.

Darüber hinaus wurden Organlysate mock-, GLV-1h68- und GLV-1h80-infizierter Tiere mit soliden GI-101A-Tumoren auf eine mögliche Expression von murinem MCP-1 getestet (Abb. 4.25).

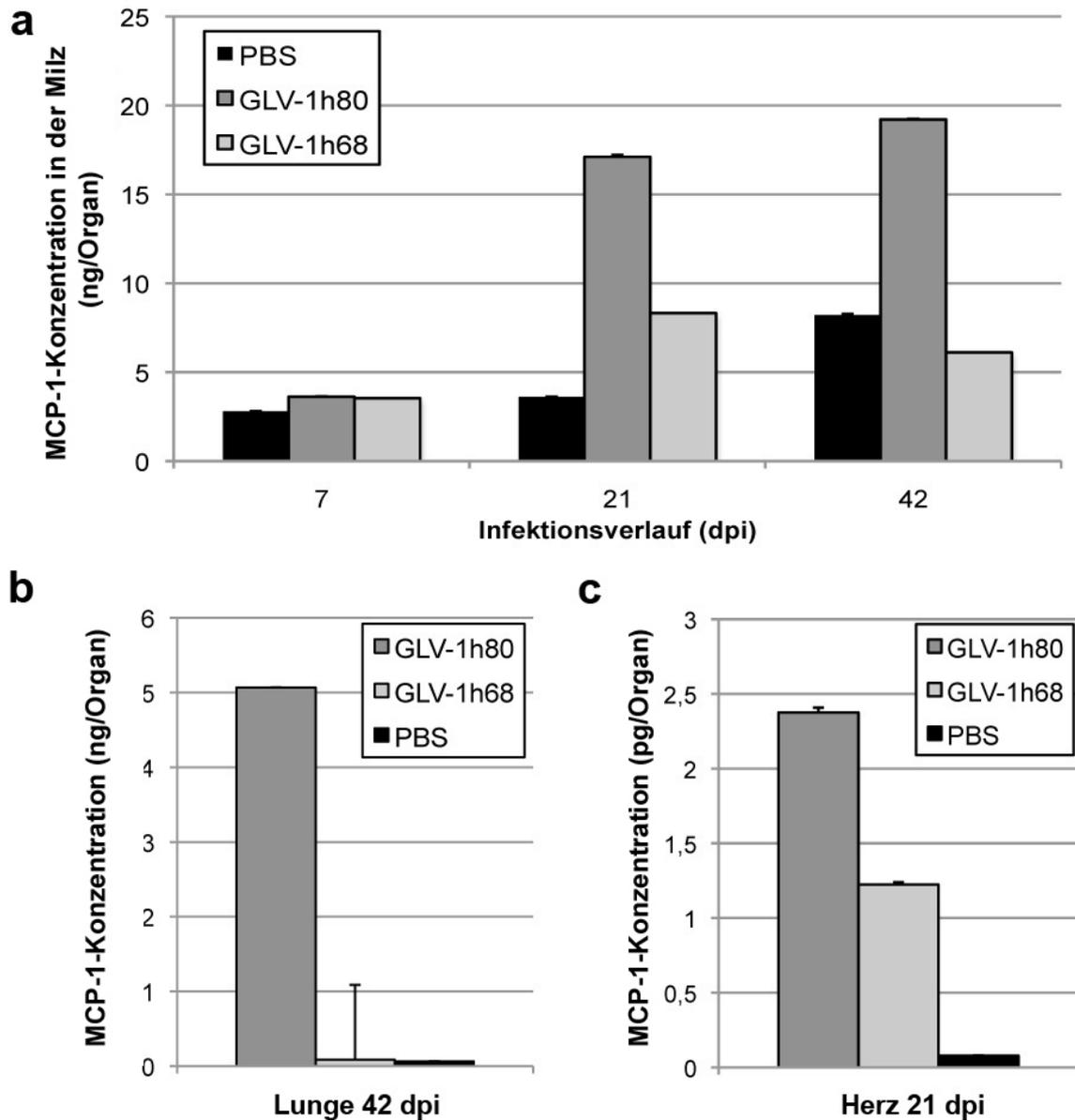


Abbildung 4.25 Quantifizierung der MCP-1-Expression in Organen Tumor-tragender Nude-Mäuse nach Injektion von rVACV bzw. PBS. Die Organe Milz (a), Lunge (b) und Herz (c) mock-, GLV-1h80- und GLV-1h68-infizierter Tiere wurden entnommen und homogenisiert. Anhand eines MCP-1-spezifischen ELISA wurde die MCP-1-Konzentration in der Organlysaten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der MCP-1-Konzentration in ng/Organ bzw. in pg/Organ mit Standardabweichung (n=2).

Die Untersuchung der MCP-1-Expressions-Kinetik in der Milz GI-101A-Tumor-tragender Nude-Mäuse (Abb. 4.25 (a)) ergab eine mit fortschreitender Infektion steigende Konzentration nach Injektion von rVACV GLV-1h80 und erreichten 42 dpi eine maximale Gesamtmenge von ca. 20 ng. Während sich 8 dpi noch keine wesentlichen Konzentrations-Unterschiede in der Milz mock-, GLV-1h80- und GLV-1h68-infizierter Mäuse zeigten, waren diese dagegen 21 dpi sehr deutlich. Die Gesamtmenge von 17 ng in der Milz GLV-1h80-infizierter Tiere lag zu diesem Zeitpunkt fast 5fach über den 3,6 ng der Kontrolltiere. Auch im

Vergleich zu den MCP-1-Mengen in der Milz nach GLV-1h68-Expression waren diese nach GLV-180-Injektion deutlich höher.

Noch deutlichere Unterschiede zeigten sich bei der pulmonalen MCP-1-Expression, die 42 Tage nach GLV-1h80-Injektion 80-90fache Konzentrationen im Vergleich zur Expression nach PBS- bzw. GLV-1h68-Injektion erreichte (Abb. 4.25 (b)). Darüber hinaus konnten bereits 21 dpi im Vergleich zu den Kontrolltieren 30fach erhöhte MCP-1-Konzentrationen im Herz GLV-1h80-injizierter Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 4.25 (c)).

Der Nachweis erhöhter MCP-1-Konzentrationen in Blutseren und Organen GLV-1h80-infizierter Tumor-tragender Nude-Mäuse lässt darauf schließen dass innerhalb infizierter Zellen in GI-101A-Xenotransplantaten synthetisiertes murines-MCP-1 sezerniert wird und darüber hinaus im Blut zirkuliert. Dieser Export des rekombinanten Proteins ist für eine anschließende mögliche chemotaktische Wirkung auf verschiedene Zielzellen des Immunsystems notwendig.

4.2.3 Lokalisation der Expression von MCP-1 in Tumorzellen

4.2.3.1 In vitro Lokalisation der Expression von MCP-1

Zur Lokalisation des exprimierten murinen MCP-1 nach Infektion humaner Krebszellen mit rVACV GLV-1h80 wurden GI-101A-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz mock-, GLV-1h80- und GLV-1h68-infiziert (MOI 0.5). Nach 24 hpi wurden die Zellen mit PFA fixiert, gewaschen und für 2 h mit einem MCP-1-spezifischen Primär-Antikörper bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörper. Nach 45 min wurden die Zellen gewaschen und durch Einbettung konserviert (Abb. 4.26).

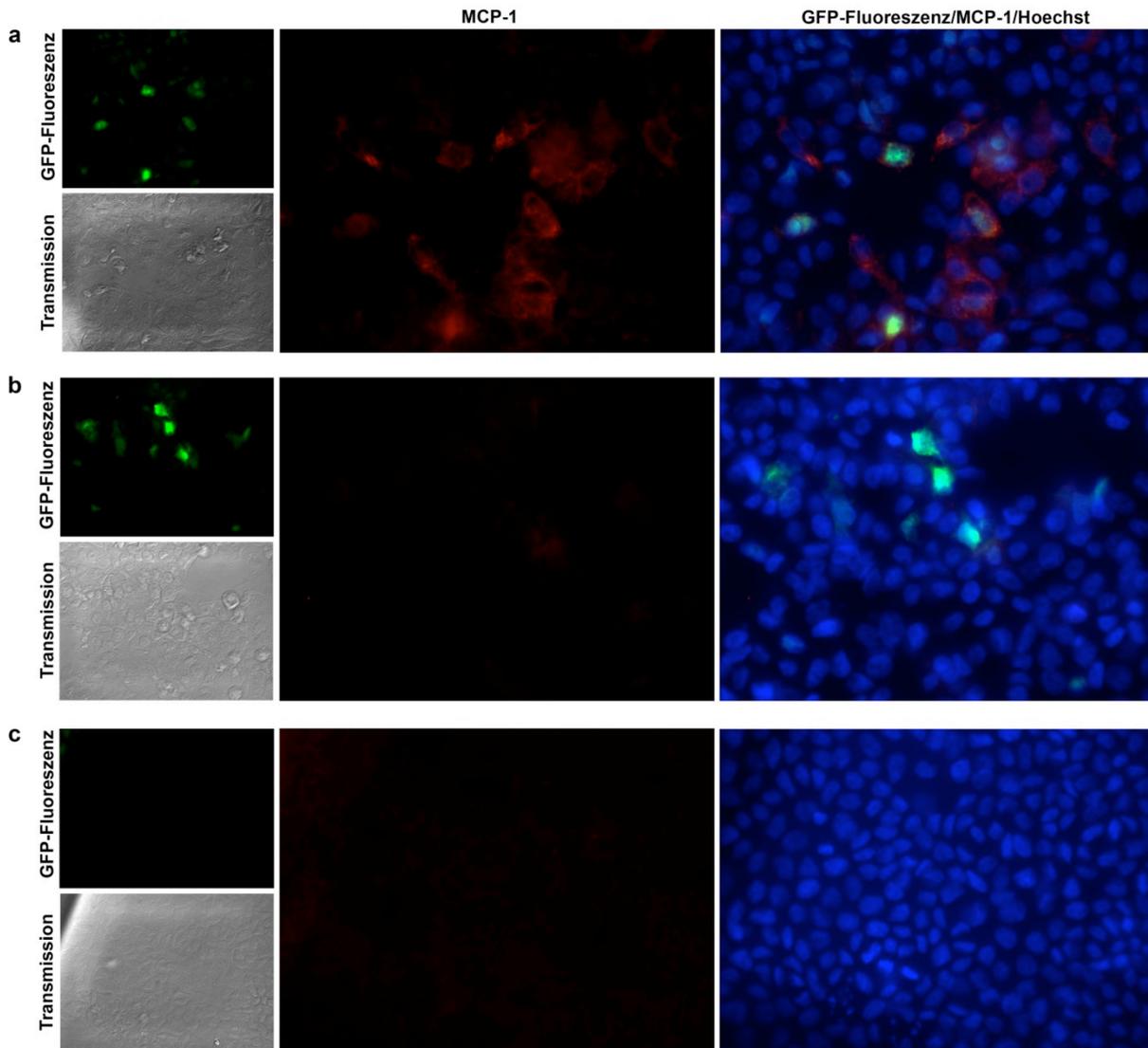


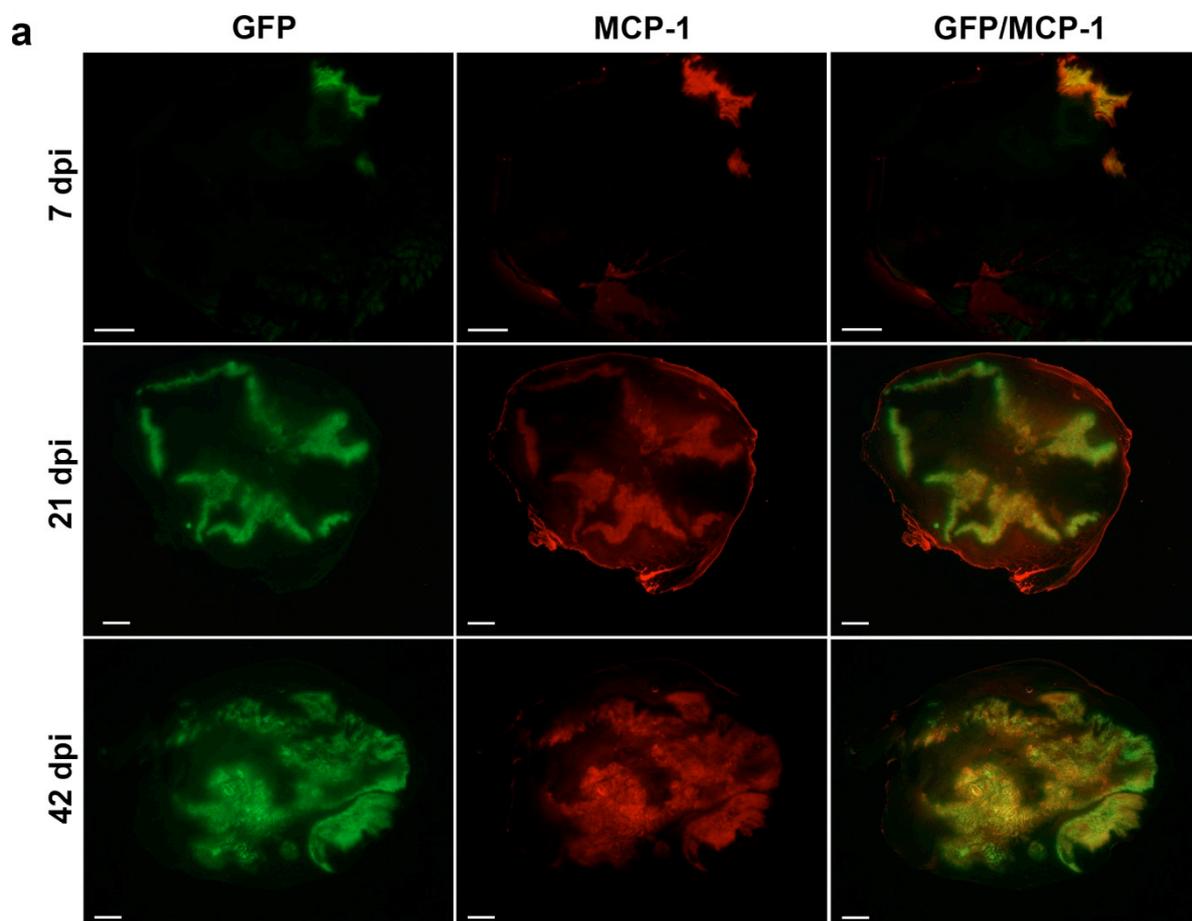
Abbildung 4.26 Lokalisation der Expression von MCP-1 nach Infektion humaner GI-101A-Zellen mit rVACV. GI-101A-Zellen wurden auf Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 2 Tagen mit den rVACV GLV-1h80 (**a**) und GLV-1h68 (**b**) infiziert (MOI 0,5) bzw. mock-infiziert (**c**). 24 hpi wurden die Zellen fixiert und 2 h mit einem MCP-1-spezifischen Primär-Antikörper inkubiert und die Kerne mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Nach 45 min Inkubation mit einem Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörper (rot) wurden die Zellen durch Einbettung konserviert. Die GFP-Expression wurde parallel dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Beispiele (63fache Vergrößerung).

24 hpi konnte murines MCP-1 im Cytoplasma GLV-1h80-infizierter GI-101A-Zellen am Rande der Virus-Plaques detektiert werden (Abb. 4.26 (**a**)). Die parallele Dokumentation der GFP-Expression zeigte, dass auch GFP-negative Zellen optisch nachweisbare Mengen des rekombinanten Proteins exprimierten. Dagegen führte eine GLV-1h68- oder mock-Infektion nicht zu einem Fluoreszenz-Signal nach MCP-1-spezifischer Antikörper-Färbung (Abb. 4.26 (**b**) und (**c**)).

Die immunhistochemische Detektion von MCP-1 korreliert mit den Ergebnissen der real-time PCR, welche 24 hpi ein Maximum MCP-1-spezifischer mRNA in GLV-1h80-infizierten, jedoch nicht in GLV-1h68- oder mock-infizierten GI-101A-Zellen aufwies (Abb. 4.18)

4.2.3.2 In vivo Lokalisation der Expression von MCP-1

Um die Expression des GLV-1h80-codierten Chemokins MCP-1 im dreidimensionalen heterogenem Tumorgewebe zu lokalisieren, wurden GI-101A-Xenotransplantate GLV-1h80-, GLV-1h68- und mock-infizierter Mäuse zu den Zeitpunkten 7, 21 und 42 dpi entnommen und ÜN in PFA fixiert. Die Gewebeproben wurden in Agarose eingebettet und Gewebeschnitte von 100 µm Dicke an einem Vibratom angefertigt. Diese wurden permeabilisiert und mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper inkubiert. Nach Inkubation mit einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden die Gewebeschnitte durch Einbettung konserviert und die immunhistochemische Anfärbung an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (Abb. 4.27).



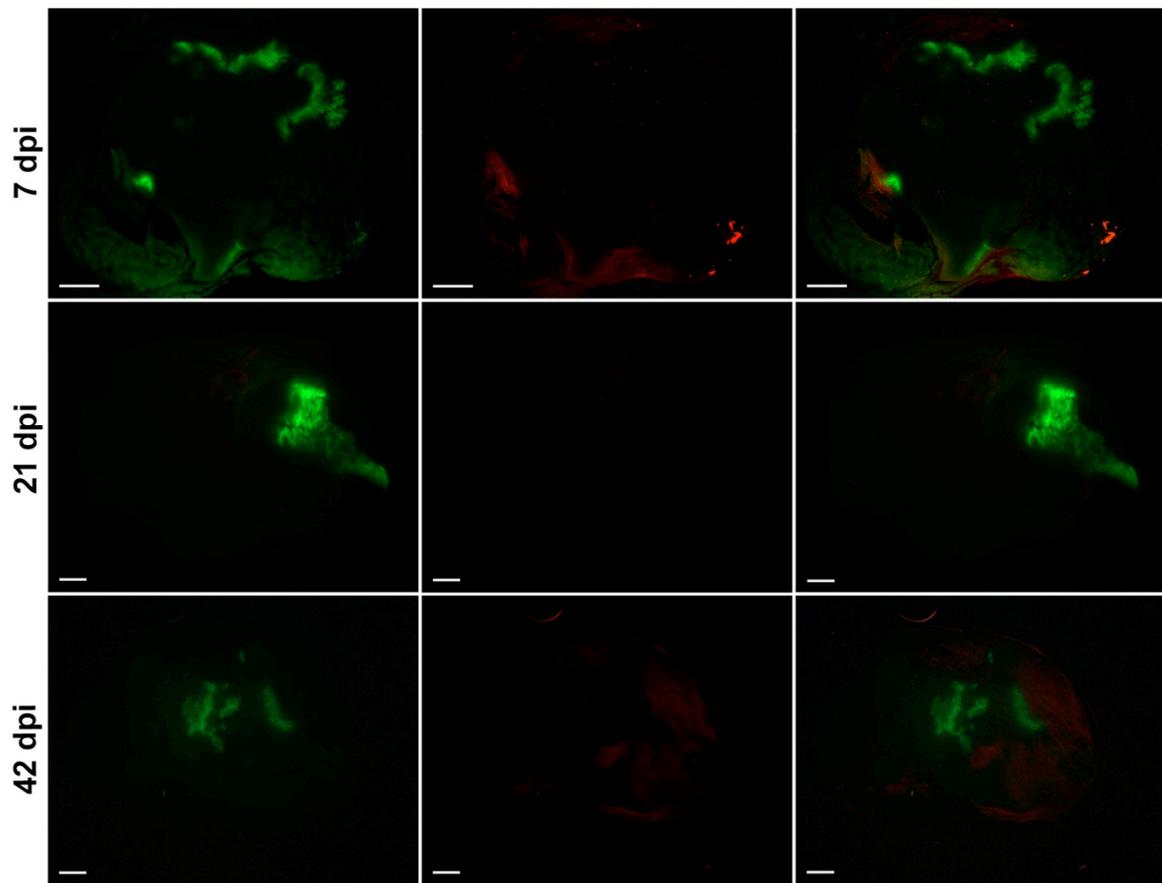
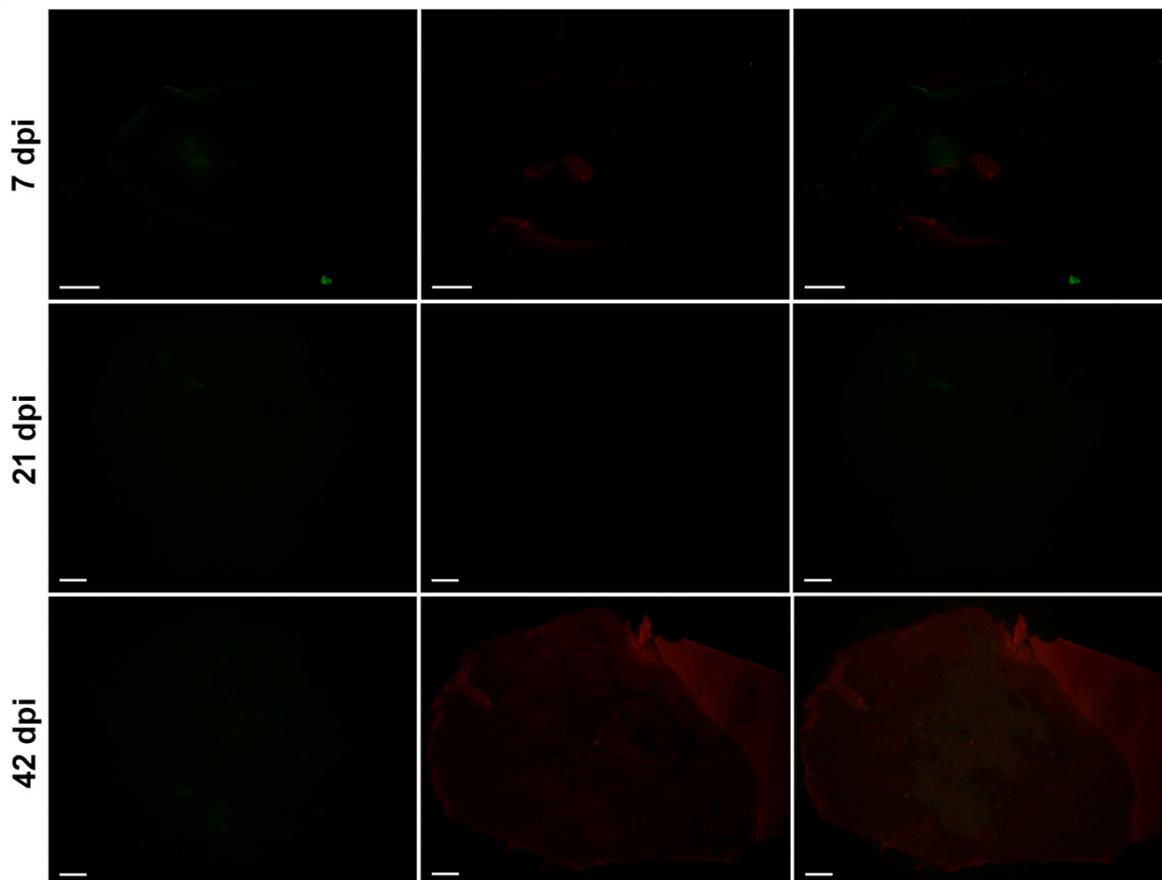
b**c**

Abbildung 4.27 Immunhistochemische Detektion des murinen Chemokins MCP-1 nach Infektion mit rVACV. GI-101A-Tumore wurden nach (a) GLV-1h80-, (b) GLV-1h68- und (c) mock-Infektion 7, 21 und 42 dpi entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 μm angefertigt, welche mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper inkubiert wurden. Durch anschließende Inkubation mit einem spezifischen Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurde murines MCP-1 (rot) markiert. Dargestellt sind GFP (links), die MCP-1 (Mitte) sowie eine Überlagerung GFP/MCP-1 (rechts). Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Bereits 7 dpi konnte eine Kolonisierung des GI-101A-Tumorgewebes mit rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 optisch nachgewiesen werden. Die Infektion breitete sich von anfänglich einzelnen Virus-Patches im Randbereich des Tumorgewebes im weiteren Infektionsverlauf weiter aus, erkennbar an der räumlichen Verteilung GFP-exprimierender Gewebeareale. In mock-infizierten Tumor-Präparaten konnte keine GFP-Expression nachgewiesen werden. Entsprechend der GFP-Expression konnte bereits 7 dpi die Expression des Chemokins MCP-1 nach GLV-1h80-Infektion immunhistochemisch dargestellt werden. Korrelierend mit der GFP-Fluoreszenz konnte eine Zunahme der MCP-1-Expression bis 42 dpi beobachtet werden. Die Expression des Chemokins in GLV-1h68- bzw. mock-infizierten Tumoren konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, wohingegen der ELISA sich als spezifischer erwies und einen Nachweis auch hier ermöglichte (Abb. 4.21).

Stärkere Vergrößerungen einzelner Virus-infizierter Geweberegionen zeigten zudem, dass eine MCP-1-Expression in GLV-1h80-infizierten Tumoren nicht ausschließlich auf GFP-positive Zellen beschränkt war (Abb. 4.28).

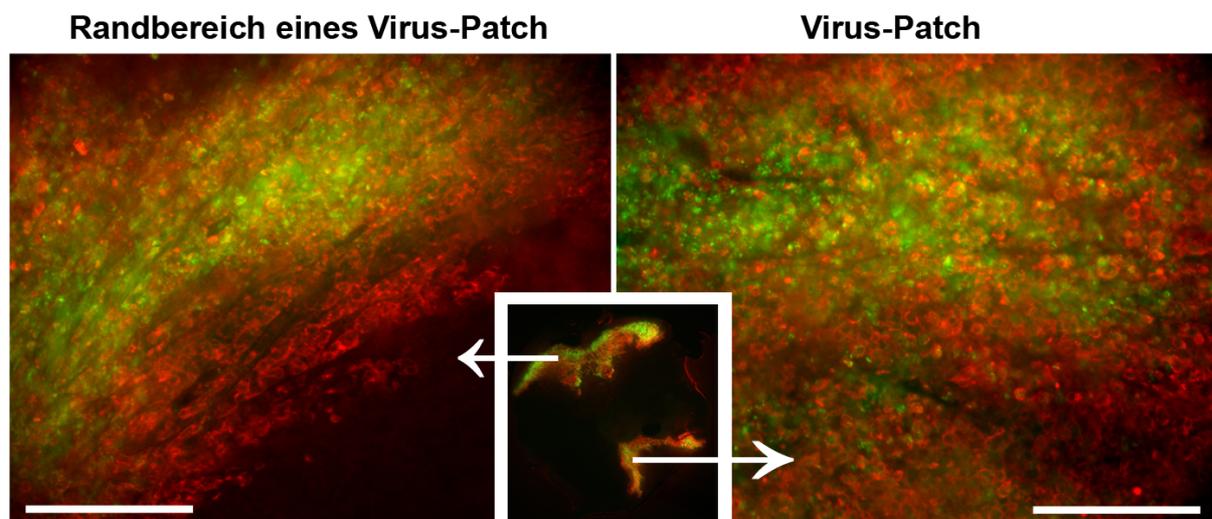
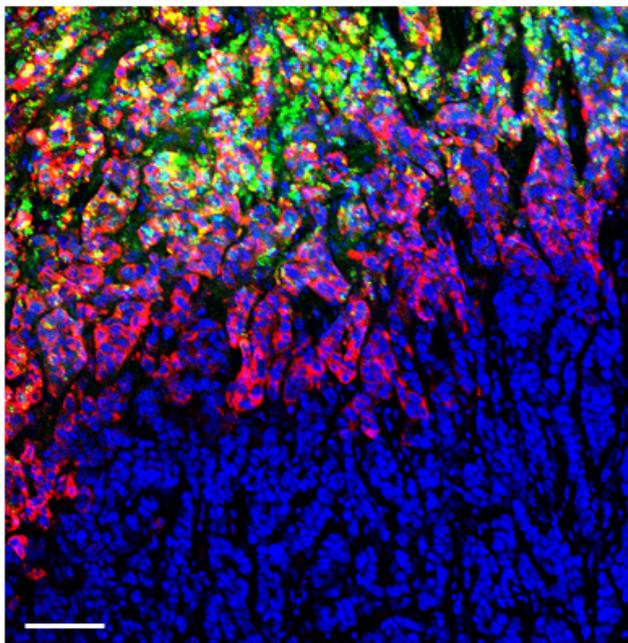


Abbildung 4.28 Immunhistologischer Nachweis der GFP- und MCP-1-Expression in GLV-1h80-infiziertem Tumorgewebe. GI-101A-Tumore wurden nach GLV-1h80-Infektion entnommen und nach PFA-Fixierung in

Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt, welche mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper inkubiert wurden. Durch anschließende Inkubation mit einem spezifischen cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurde murines MCP-1 (rot) angefärbt. Dargestellt eine Überlagerung der GFP- (grün) und MCP-1-Expression (rot) eines Randbereichs (links) sowie in einem Virus-Patch (rechts) zum Zeitpunkt 21 dpi. Die Größenbalken repräsentieren 100 µm. Die Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Die höhere Auflösung zeigte dass innerhalb virus-infizierter Regionen ein großer Anteil MCP-1-exprimierender Zellen vorlag, welche GFP-negativ waren. Durch konfokale Aufnahmen der Gewebeschnitte konnten diese Befunde zusätzlich bestätigt werden (Abb.-4.29).



Zone fortgeschrittener Infektion

Zone früher Infektion

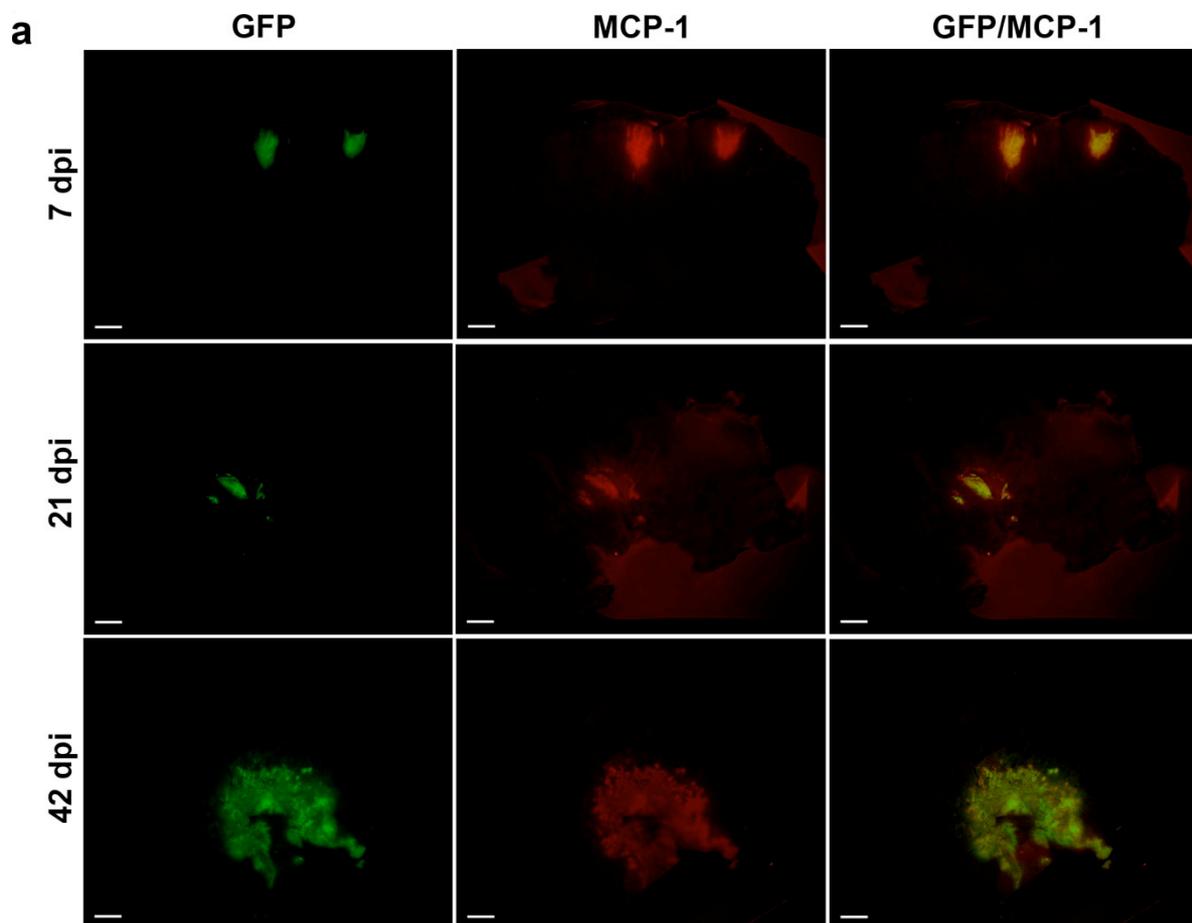
Uninfiziertes Gewebe

Abbildung 4.29 GFP- und MCP-1-Expression am Randbereich eines Virus-Patch nach Infektion mit rVACV GLV-1h80. GI-101A-Tumore wurden nach GLV-1h80-Infektion entnommen, fixiert und in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt und eine immunhistologische Detektion des Chemokins MCP-1 (rot) durchgeführt. Die Kerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Dargestellt ist Überlagerung konfokaler Aufnahmen eines Randbereichs zum Zeitpunkt 21 dpi. Die Größenbalken repräsentieren 200 µm. Die Aufnahmen stellen repräsentative Beispiele dar.

Durch konfokale Mikroskopie konnten unterschiedliche Regionen infizierter Zellen innerhalb des Tumorgewebes abgegrenzt werden. Während die Zellen der Zone früher Virus-Infektion kein GFP jedoch das viral-codierte MCP-1 exprimierten, konnten in Zellen der Zone später Infektion beide Proteine nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte eine Markierung der Kerne in der frühen Infektionszone noch deutlich abgrenzbare Zellkerne, wohingegen diese

in der Zone fortgeschrittener Infektion durch vermehrte Zellyse nicht mehr eindeutig erkennbar waren.

Darüber hinaus wurde die MCP-1-Expression auch im humanen Kolon-Adenokarzinom-Modell HT-29-CBG zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs immunhistochemisch untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Tumorgewebe GLV-1h80-, GLV-1h68- und mock-infizierter Mäuse 7, 21 und 42 dpi entnommen fixiert und nach Einbettung in Agarose Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden permeabilisiert und mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper markiert und die Präparate am Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (Abb. 4.30).



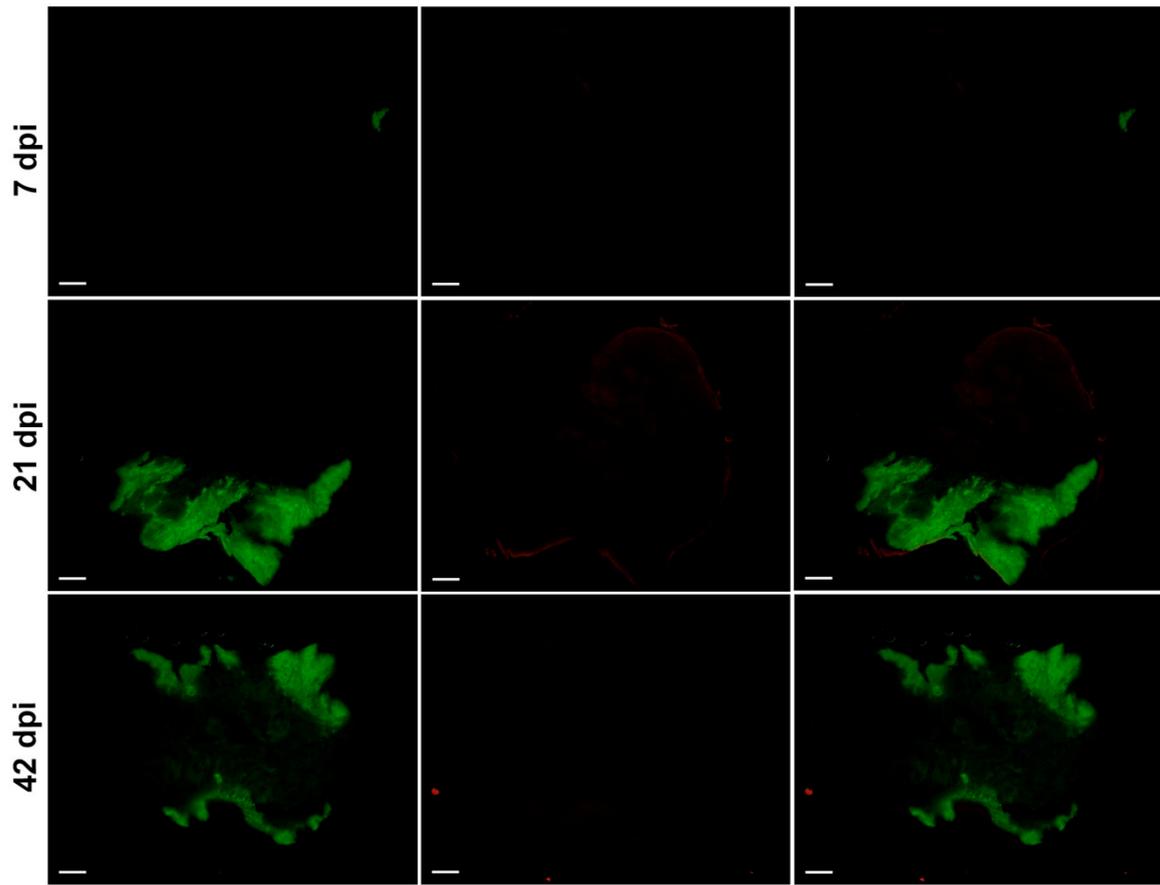
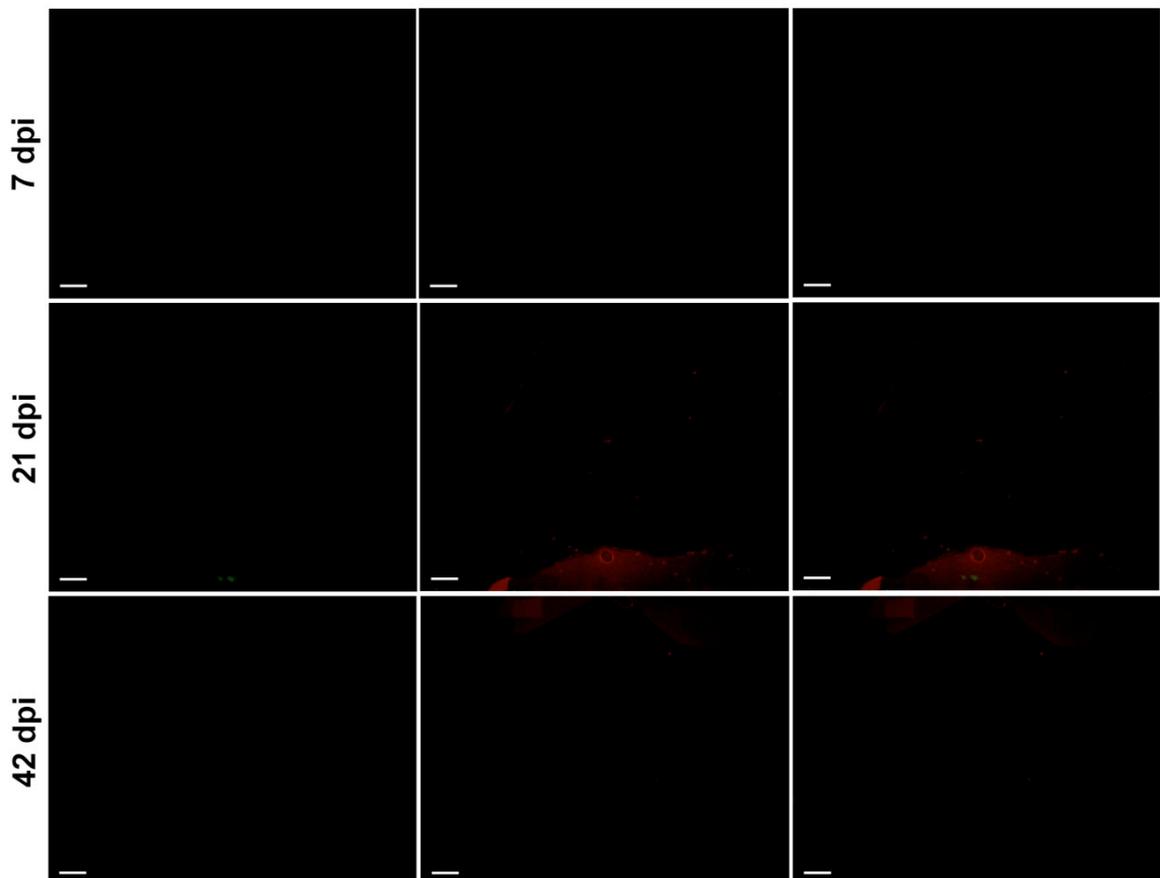
b**c**

Abbildung 4.30 Immunhistochemische Detektion des murinen Chemokins MCP-1 in Gewebeschnitten nach Infektion mit rVACV. HT-29-CBG-Tumore wurden nach (a) GLV-1h80-, (b) GLV-1h68- und (c) mock-Infektion 7, 21 und 42 dpi entnommen und nach PFA-Fixierung in Agarose eingebettet. An einem Mikrotom wurden Gewebeschnitte der Schichtdicke 100 µm angefertigt und eine immunhistochemische Detektion des Chemokins MCP-1 durchgeführt. Durch Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörpers wurde murines MCP-1 (rot) angefärbt. Dargestellt sind die GFP-Expression (links), die MCP-1-Expression (Mitte) sowie eine Überlagerung GFP/MCP-1 (rechts). Die Größenbalken repräsentieren 1 mm. Alle Aufnahmen sind repräsentative Beispiele.

Die Infektion von HT-29-CBG-Tumoren führte, analog zu den Ergebnissen nach Infektion GI-101A-Tumor-tragender Mäuse, zu einer bereits 7 dpi anhand der GFP-Expression nachweisbaren Kolonisierung mit rVACV. In mock-infizierten Gewebeschnitten konnte zu keinem Zeitpunkt eine GFP-Expression detektiert werden. Entsprechend der GFP-Expression konnte ab 7 dpi das murine Chemokin MCP-1 nachgewiesen werden, wenn eine GLV-1h80-Injektion erfolgte. Sowohl GFP- als auch MCP-positive Geweberegionen nahmen im Infektionsverlauf bis 42 dpi an Fläche zu. In GLV-1h68- bzw. mock-infizierten Tumoren konnte mit dieser Methode keine MCP-1-Expression nachgewiesen werden. Erneut stellte sich heraus, dass der ELISA eine sensitivere Nachweismethode für MCP-1 ist (Abb. 4.23).

4.2.4 Untersuchung der funktionellen Aktivität von rekombinantem MCP-1

Das Chemokin MCP-1 zählt zu einem der besten charakterisierten Chemokinen und hat wichtige Funktionen bei vielen immunologischen Prozessen. Seine Hauptfunktion hierbei ist die Rekrutierung mononukleärer Zellen [99, 117]. Durch Einsatz des rVACV GLV-1h80 wurde eine gezielte Überexpression von MCP-1 in humanen Tumoren hervorgerufen. Um mögliche therapeutische Effekte dieser Überexpression zu erzielen, muss das rekombinante Protein nach Transkription und Translation funktionelle Aktivität aufweisen.

Aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Monocyten wurden histologische Präparate GLV-1h80-, GLV-1h68 sowie mock-infizierter GI-101A-Tumoren angefertigt. Die Präparate wurden immunhistochemisch durch Verwendung des Peroxidase-Systems in Kombination mit einem CD68-spezifischen Antikörper untersucht (Abb. 4.31). CD68 (Cluster of Differentiation 68) ist ein Glykoprotein welches durch seine spezifische Expression auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Monocyten oftmals als pathologischer Makrophagen-Marker Anwendung findet [170].

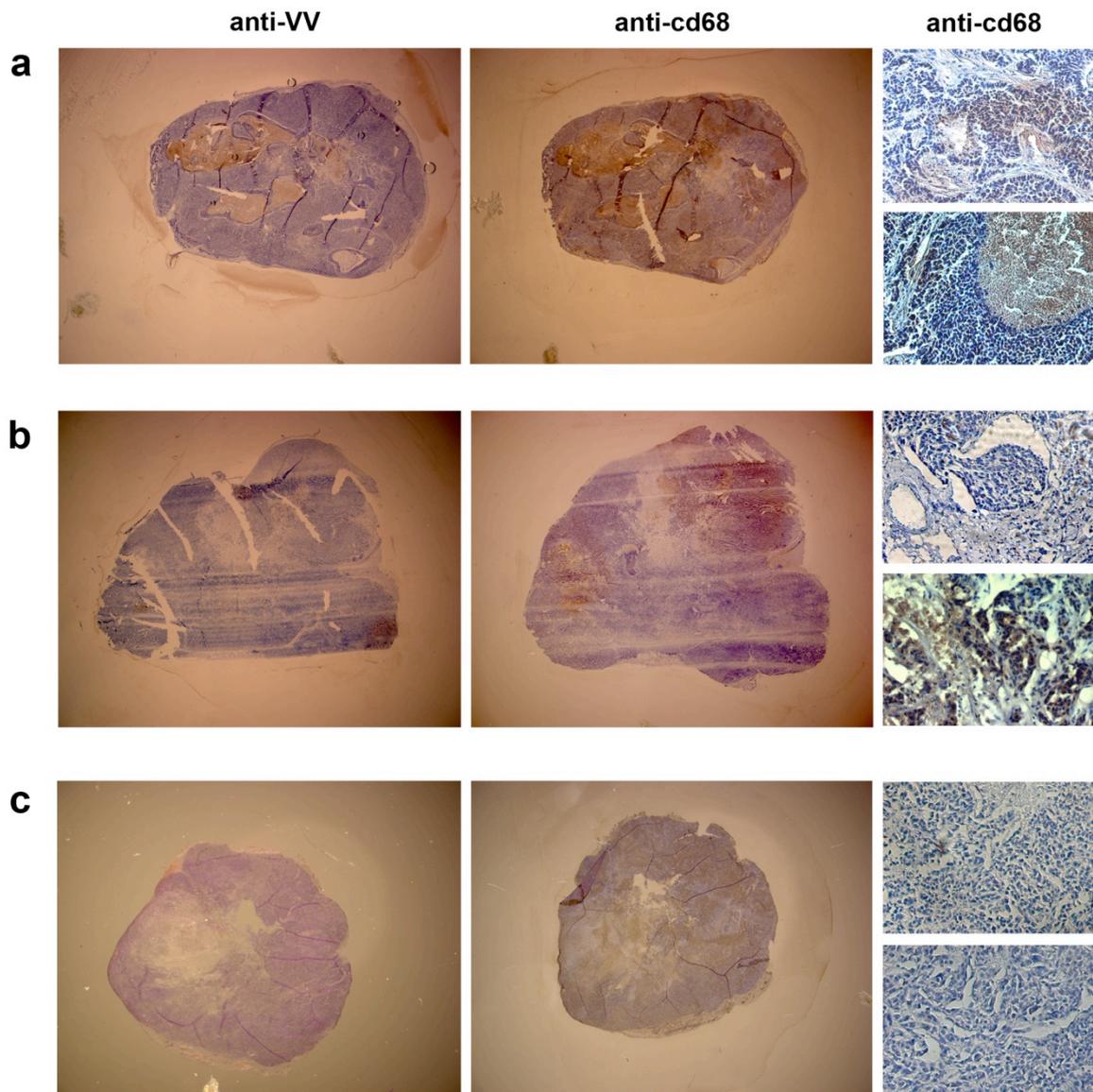


Abbildung 4.31 Histologische Paraffin-Präparate nach Markierung des Makrophagen-spezifischen CD68-Epitops. Nach Fixierung der (a) GLV-1h80-, (b) GLV-1h68- und (c) mock-infizierten GI-101A-Tumoren wurden diese zunächst dehydriert und schließlich in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung der Blöcke wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 10 μm mit einem Mikrotom angefertigt. Um Epitope für Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Präparate deparaffinisiert, rehydriert und Fixierungs-bedingte Proteinvernetzungen durch Citrat-Puffer-Behandlung demaskiert. Die immunhistologische Färbung erfolgte unter Verwendung des VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories). Durch das Peroxidase-System wurden CD68-positive Zellen braun gefärbt (Mitte). Gleichzeitig wurde in passenden Serien-Schnitten eine Vaccinia-Virus-spezifische Färbung durchgeführt (links). Zur zusätzlichen Identifizierung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden erneut dehydriert und zur Herstellung der Dauerpräparate in organischer Einbettlösung fixiert. Dargestellt sind repräsentative Beispiele.

Die Markierung CD68-positiver Zellen in den Paraffin-Präparaten führte sowohl in GLV-1h80- und GLV-1h68-infizierten als auch in mock-infizierten GI-101A-Tumoren zu einem Signal. Während positiv gefärbte Zellen in den Kontroll-Tumoren diffus über das gesamte Tumorgewebe verteilt waren, führte eine rVACV-Infektion zu stärker konzentrierteren Signalen. Vor allem in den Gewebeschnitten GLV-1h80-injizierter Mäuse war die Färbung besonders stark in Bereichen, welche positiv für Vaccinia-Virus waren. Jedoch stellte sich heraus, dass es zu unspezifischen Färbungen nekrotischer Bereiche innerhalb des Tumorgewebes mit dem verwendeten CD68-Antikörper kam. Durch diese unspezifische Anfärbung konnten histologisch keine eindeutigen Unterschiede der Verteilung und Konzentration CD68-positiver Zellen zwischen den unterschiedlich infizierten Tumoren gefunden werden.

Um die Anreicherung von Makrophagen im Tumorgewebe GLV-1h80-infizierter Tiere mit der GLV-1h68- und mock-infizierter Tiere zu vergleichen, wurde 4-5 Wochen alten Nude-Mäusen 5×10^6 GI-101A-Zellen bzw. 1×10^5 HT-29-CBG-Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Bei Erreichen einer TumorgroÙe von $300-400 \text{ mm}^3$ wurden 5×10^6 pfu der rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 intravenös injiziert. Kontrolltiere erhielten eine PBS-Injektion. Primäre Knochenmarks-Makrophagen (BMM; *bone marrow macrophages*) transgener, Luziferase-exprimierender FVB-Mäuse wurden aus den Oberschenkel-Knochen isoliert und mit L929-konditioniertem Medium *in vitro* kultiviert (Abb. 4.32).

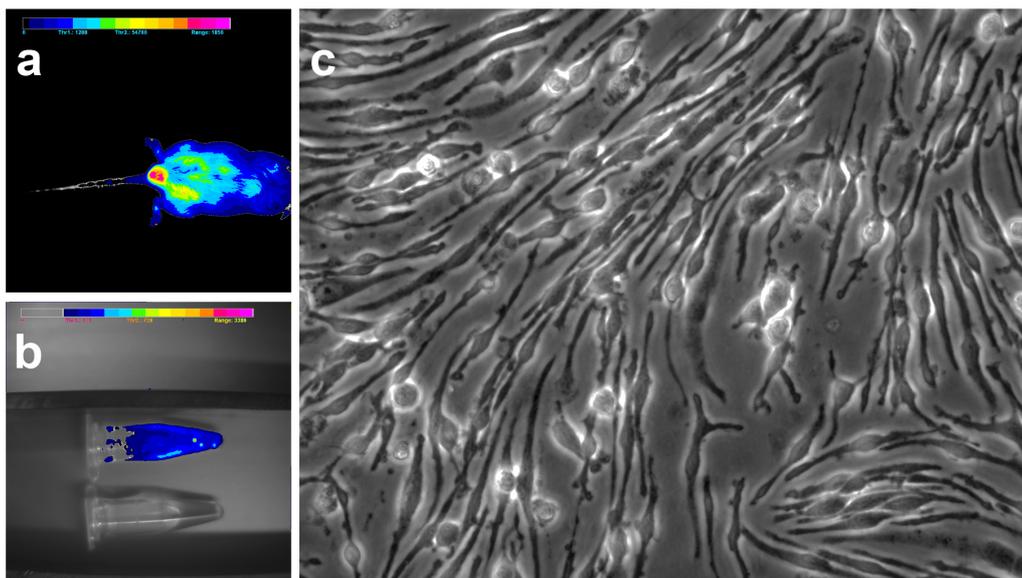


Abbildung 4.32 Isolation primärer Knochenmarks-Makrophagen aus transgenen Luziferase-exprimierenden FVB-Mäusen. (a) Optischer Nachweis der Luziferase-Expression in transgenen FVB-Mäusen nach intraperitonealer Injektion des Substrats D-Luziferin. (b) Luziferase-exprimierende primäre Knochenmarks-

Makrophagen nach Isolation und Substrat-Zugabe. (c) BMM nach Zugabe des L929-konditionierten Kultivierungs-Mediums.

Die isolierten BMM wurden nach 2wöchiger Kultivierung durch Inkubation mit Accutase vom Boden der Zellkultur-Schalen gelöst und den Tumor-tragenden Mäusen 21 dpi in einer Konzentration von $1,7 \times 10^6$ Zellen/Maus intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Injektion erfolgte jeweils bei der Hälfte der Tiere einer jeden Gruppe, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Durch *real-time* Monitoring sollte die Verteilung der injizierten, lumineszierenden BMM verfolgt werden. Aufgrund zu niedriger Signalstärken konnten jedoch keine Zellen nach intravenöser Injektion detektiert werden.

Zum Zeitpunkt 42 dpi wurden die Tumoren entnommen und Proteinlysate angefertigt. Da durch die Überexpression der rekombinanten MCP-1 und im Falles einer funktionellen Aktivität dieses Proteins eine Rekrutierung von Immunzellen ins Tumorgewebe GLV-1h80-injizierter Mäuse erfolgen soll, wurden die Proteinlysate auf die Expression verschiedener Proteine hin untersucht. Tumor-assoziierte Makrophagen produzieren eine Reihe pro-inflammatorischer Cytokine, so z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), welche über Auslösung einer Caspase-Kaskade Apoptose induzieren und zu einer vermehrten Abtötung von Tumorzellen führen kann [120]. Da TNF- α darüber hinaus vorwiegend von Makrophagen synthetisiert wird, wurden die Konzentrationen dieses Cytokins in Tumorlysaten GLV-1h80-, GLV-1h68- und mock-infizierter Tiere mittels ELISA untersucht und in direkten Vergleich gesetzt. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte parallel in Tumorlysaten, abstammend von BMM-injizierten Tieren (BMM+) und in Lysaten der Tumore unbehandelter Mäuse (BMM-) (Abb. 4.33).

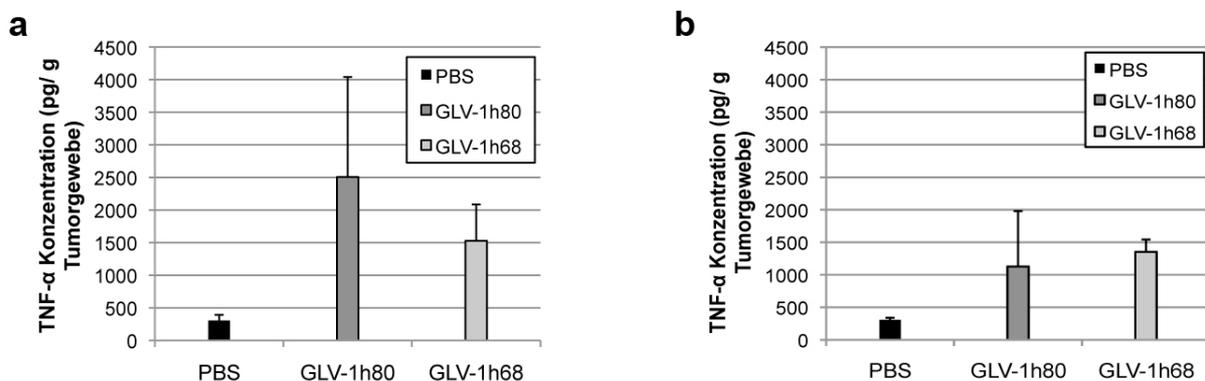


Abbildung 4.33 Quantifizierung der TNF- α -Expression in GI-101A-Tumoren nach Infektion mit rVACV bzw. mock-Infektion. GLV-1h80-, GLV-1h68 und mock-injizierte Mäuse mit GI-101A-Tumoren wurden jeweils in 2 Gruppen mit gleicher Anzahl an Tieren aufgeteilt. Während die Hälfte der Tiere unbehandelt blieben (BMM-) (a),

wurde der anderen Hälfte 15 dpi $1,7 \times 10^6$ BMM intravenös appliziert (**b**). 42 dpi wurden die Heterotransplantate entnommen und Proteinlysate angefertigt, welche unter Anwendung eines TNF- α -spezifischen ELISA untersucht wurden. Dargestellt sind die durchschnittlichen TNF- α -Konzentrationen in pg/g Tumorgewebe mit Standardabweichungen (n=3).

Intravenöse Injektion von GLV-1h80 führte in unbehandelten (BMM-) Tieren 42 dpi zu erhöhten Konzentrationen des Cytokins TNF- α im Vergleich zu denen der Tumore GLV-1h68- und mock-injizierter Mäuse. Infektion mit GLV-1h68 führte im Vergleich zu mock-Infektion auch zu einer erhöhten TNF- α -Konzentration, die jedoch unterhalb der GLV-1h80-infizierter Tumore blieb. Erfolgte eine Injektion von Knochenmarks-Makrophagen, kam es zu einer Konzentrationsänderung in GLV-1h80-infiziertem Tumorgewebe, dagegen wiesen mock- und GLV-1h68-infizierte Tumore BMM-behandelte und –unbehandelter Mäuse vergleichbare Konzentrationen auf. Durch die Injektion der BMM wurde der Unterschied zwischen GLV-1h80- und GLV-1h68-injizierten Tumoren aufgehoben.

Analog zu den Studien am G1-101A-Tumormodell nach BMM-Injektion wurde die TNF- α -Expression im HT-29-CBG-Tumormodell untersucht (Abb. 4.34).

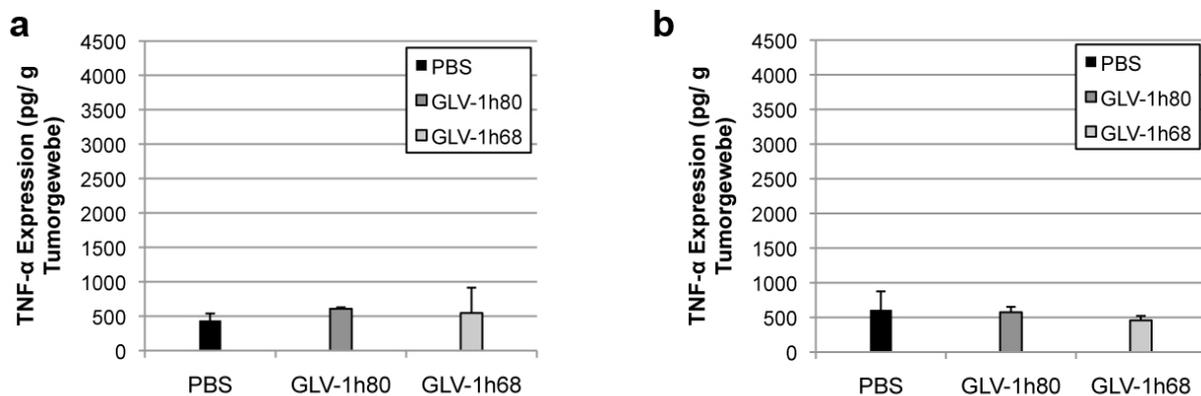


Abbildung 4.34 Quantifizierung der TNF- α -Expression in HT-29-CBG-Tumoren nach Vaccinia-Virus-Infektion. GLV-1h80-, GLV-1h68 und mock-injizierte Mäuse mit HT-29-CBG-Tumoren wurden jeweils in 2 Gruppen mit gleicher Anzahl an Tieren aufgeteilt. Eine Gruppe blieb unbehandelt (BMM-) (a), wohingegen den Tieren der anderen Gruppe 15 dpi $1,7 \times 10^6$ BMM intravenös appliziert wurden (b). Das Tumorgewebe wurde 42 dpi entnommen und Proteinlysate angefertigt, welche unter Anwendung eines TNF- α -spezifischen ELISA untersucht wurden. Dargestellt sind die durchschnittlichen TNF- α -Konzentrationen in pg/g Tumorgewebe mit Standardabweichungen (n=3).

Die TNF- α -Konzentrationen in HT-29-CBG-Tumoren lag in allen 3 Gruppen im selben Konzentrationsbereich von 400-600 pg/g Tumorgewebe, unabhängig davon ob eine BMM-Behandlung erfolgte oder nicht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen GLV-

1h80-, GLV-1h68 und mock-infizierten Tumoren nachgewiesen werden. Die Injektion von BMM führte nicht zur Veränderung der intratumoralen TNF- α -Konzentration.

Monocyten zeichnen sich besonders durch ein definiertes Muster an funktionell wichtigen Oberflächenantigenen aus, welches sich nach Aktivierung ändert. Der pro-inflammatorische Phänotyp exprimiert auf seiner Oberfläche CD14, ein funktionelles Hauptantigen in Antigen-präsentierenden Zellen. Das 375 Aminosäuren große Protein mit N-terminaler Signalsequenz wird nach Anlagerung einer Phosphatidylinositol-Gruppe und Glykosilierung als Zelloberflächenmolekül auf zirkulierenden Monocyten exprimiert [171, 172]. Aufgrund dessen diente in dieser Arbeit das CD14-Oberflächenprotein als Marker für die Rekrutierung proinflammatorischer Immunzellen. Die Konzentration dieses Proteins wurde in den Proteinlysaten der GI-101A-Tumoren BMM-behandelter und –unbehandelter Tiere durch einen CD14-spezifischen ELISA ermittelt (Abb. 4.35).

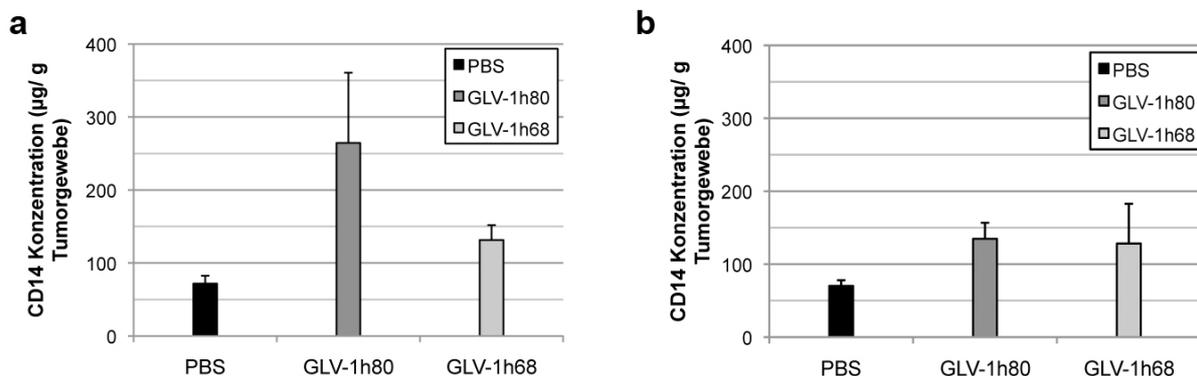


Abbildung 4.35 Quantifizierung der Expression des murinen CD14-Oberflächenproteins in GI-101-Tumoren nach Vaccinia-Virus-Infektion. Tumor-tragende, GLV-1h80-, GLV-1h68 und mock-injizierte Mäuse wurden jeweils in 2 Gruppen mit gleicher Anzahl an Tieren aufgeteilt. Eine Gruppe blieb unbehandelt (BMM-) (a), wohingegen den Tieren der anderen Gruppe 15 dpi $1,7 \times 10^6$ BMM intravenös appliziert wurden (b). Das Tumorgewebe wurde 42 dpi entnommen und Proteinlysate angefertigt. Die intratumorale CD14-Konzentration wurde durch einen CD14-spezifischen ELISA ermittelt. Dargestellt sind die durchschnittlichen CD14-Konzentrationen in $\mu\text{g/g}$ Tumorgewebe mit Standardabweichungen ($n=3$).

Die Konzentration des murinen CD14-Oberflächenproteins inflammatorischer Immunzellen war nach Infektion mit rVACV GLV-1h80 im Vergleich zu GLV-1h68- und mock-Infektion deutlich erhöht und lag mit durchschnittlich $264 \mu\text{g/g}$ Tumorgewebe doppelt so hoch wie in GLV-1h68-infizierten Tumoren und nahezu 4fach höher als in Tumorslysaten mock-infizierter Tiere. Durch Injektion der Knochenmarks-Makrophagen zeigten sich Veränderungen in der

CD14-Konzentration GLV-1h80-infizierter Tumore, analog zu den Veränderungen der TNF- α -Konzentration. Die CD14-Konzentration sank auf 134 $\mu\text{g/g}$ Tumorgewebe und lag somit im selben Bereich wie in GLV-1h68-infizierten Tumoren. Dagegen hatte die BMM-Injektion in mock- und GLV-1h68-infizierten Tumoren keine Auswirkung auf die CD14-Expression.

Des Weiteren erfolgte eine Bestimmung der CD14-Konzentrationen in HT-29-CBG-Tumoren zum Zeitpunkt 42 dpi (Abb. 4.36).

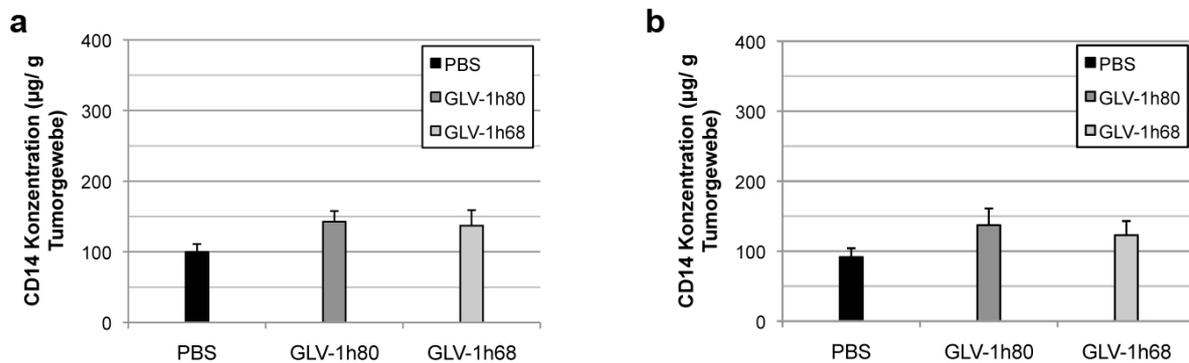


Abbildung 4.36 Expressionsprofil des murinen Oberflächenmoleküls CD14 in HT-29-CBG-Tumoren. GLV-1h80-, GLV-1h68 und mock-injizierte Mäuse mit HT-29-CBG-Tumoren wurden in 2 Gruppen von jeweils 3 Tieren aufgeteilt. Während die Hälfte der Tiere unbehandelt blieb (BMM-) (a), erfolgte bei der anderen Hälfte 15 dpi eine intravenöse Injektion von $1,7 \times 10^6$ BMM (b). 42 dpi wurden die Heterotransplantate entnommen und Proteinlysate angefertigt. Die Konzentrationsbestimmung des CD14-Proteins erfolgte unter Anwendung eines CD14-spezifischen ELISA. Dargestellt sind die durchschnittlichen TNF- α -Konzentrationen in pg/g Tumorgewebe mit Standardabweichungen ($n=3$).

Die CD14-Konzentrationen in HT-29-CBG-Tumoren lag in allen 3 Gruppen im Konzentrationsbereich von 100-150 pg/g Gewebe. Wie bereits bei der Ermittlung der TNF- α -Konzentrationen im Tumorgewebe dieses humanen Kolon-Adenokarzinom-Modells beobachtet werden konnte, führte eine BMM-Injektion auch bezüglich der CD14-Expression zu keiner Veränderung der intratumoralen Konzentration. Die Konzentrationen in GLV-1h80- und GLV-1h68infizierten Tumoren waren nahezu identisch, in mock-infizierten Tumoren konnte eine nur minimal geringere CD14-Konzentration nachgewiesen werden.

4.2.5 Immuntherapeutische Effekte der MCP-1-Expression auf die Tumorregression in den humanen Tumormodellen GI-101A und HT-29-CBG

Die therapeutischen Effekte der Überexpression des murinen Chemokins durch Infektion mit GLV-1h80 sollten in zwei verschiedenen humanen Tumormodellen genauer untersucht werden.

Hierzu wurden 5-6 Wochen alten Nude-Mäusen 5×10^6 GI-101A-Zellen an der rechten Flanke subkutan injiziert. Diese Injektion führte nach 30 Tagen zur Bildung von ca. 450 mm^3 großen Tumoren. Die Mäuse wurden jeweils in Gruppen von 6 Tieren aufgeteilt und PBS oder 5×10^6 pfu des Virus GLV-1h80 bzw. GLV-1h68 intravenös appliziert. Das Tumolvolumen wurde über den gesamten Versuchsverlauf hinweg wöchentlich mit einer digitalen Schieblehre bestimmt. Zum Zeitpunkt 42 dpi wurde das Tumorgewebe entnommen und das Gewicht bestimmt (Abb. 4.37).

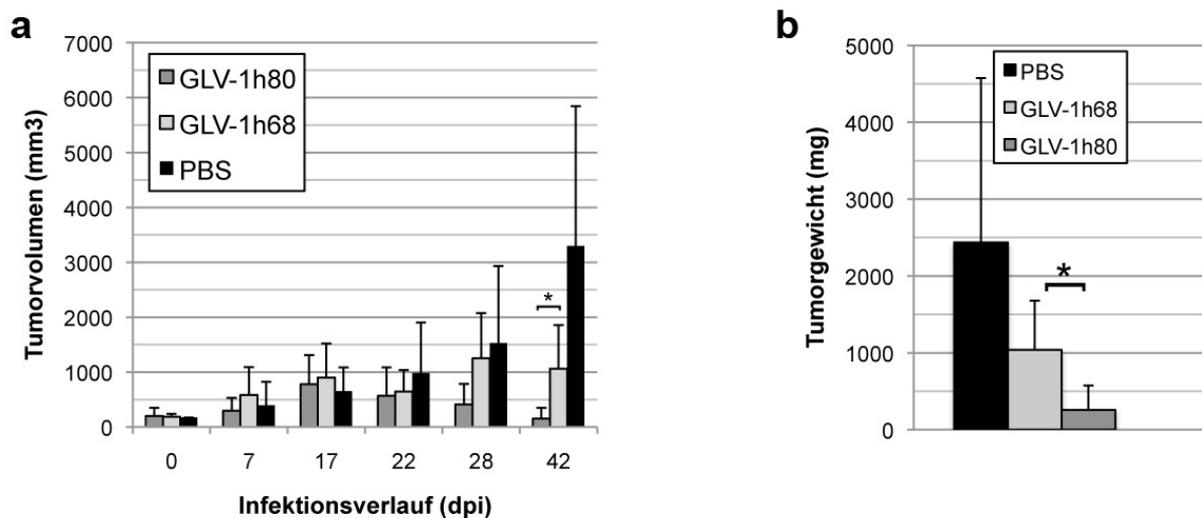


Abbildung 4.37 GI-101A-Tumorprogression nach rVACV-Behandlung. Nude-Mäuse mit 450 mm^3 großen Tumoren wurden mit PBS oder 5×10^6 pfu GLV-1h80 bzw. GLV-1h68 intravenös injiziert. **(a)** Während des Versuchsverlaufs wurden die Tumoren vermessen und das Tumolvolumen mit der Formel ($0,5 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$) berechnet. Dargestellt ist das durchschnittliche Tumolvolumen mit Standardabweichung. **(b)** Zum Zeitpunkt 42 dpi wurde das Tumorgewebe entnommen und die Gewichte der einzelnen Tumoren jeder Gruppe bestimmt. Dargestellt ist das durchschnittliche Tumorgewicht in mg mit Standardabweichung. (n=6; * zeigt eine statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ im Vergleich zwischen GLV-1h80- und GLV-1h68-infizierten Gruppen).

Das Monitoring der Tumorprogression zeigte sowohl nach GLV-1h68- als auch nach GLV-1h80-Injektion positive Tumor-therapeutische Effekte im humanen GI-101A-Brustkrebsmodell. Zunächst kam es nach rVACV-Infektion zu einem Anstieg der Tumorgröße im Vergleich zu PBS-behandelten Tumoren. Ab 22 dpi jedoch waren positive Unterschiede der Tumorprogression zwischen Virus- und mock-infizierten Tieren anhand der Tumorgröße nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt nahmen die Tumorgrößen GLV1h80-injizierter Mäuse weiter ab und erreichten 42 dpi mit durchschnittlich 152 mm^3 ein geringeres Volumen als zum Zeitpunkt der Vaccina-Virus-Injektion. Dieses durchschnittliche Tumolvolumen war 21fach niedriger als nach PBS-Behandlung. Ab 28 dpi konnte auch nach GLV-1h68-Injektion eine Tumorregression erzielt werden. Jedoch lagen die Volumina zum Zeitpunkt 42 dpi mit durchschnittlich 1064 mm^3 statistisch signifikant noch deutlich über den Tumorgrößen nach GLV-1h80-Behandlung und über dem anfänglichen Volumen bei Injektion von rVACV.

Nicht jede Tumorzelllinie erweist sich als sensitiv für eine onkolytische Virustherapie. Während einige Tumormodelle nach Virus-Behandlung vollkommen normales Progressionsverhalten zeigen, reagieren andere mit einem veränderten Wachstumsverhalten, welches in 3 Phasen untergliedert werden kann. Zunächst kann ein schnelleres Anschwellen der Virus-behandelten Tumoren im Vergleich zu Kontroll-Tumoren beobachtet werden. Nach dieser Phase folgt eine Periode minimaler bzw. stagnierender Größenzunahme, welche schließlich in eine Phase der kompletten Regression übergeht [29, 173]. Das humane Kolon-Adenokarzinom-Modell HT-29-CBG reagiert nur schwach auf eine Therapie mit rVACV GLV-1h68 und wird daher als „*weak-responder*“ bezeichnet. Die Tumor-therapeutischen Effekte des MCP-1-kodierenden Virus GLV-1h80 sollten auch in diesem Tumormodell mit den Effekten nach GLV-1h68-Infektion verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden 4-5 Wochen alten Nude-Mäusen 1×10^5 HT-29-CBG-Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Bei Erreichen einer Tumorgröße von $250\text{-}300 \text{ mm}^3$ wurden 5×10^6 pfu der rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 intravenös injiziert. Kontrolltiere erhielten eine PBS-Injektion. Das Tumolvolumen in regelmäßigen Abständen wöchentlich mit einer digitalen Schieblehre bestimmt (Abb. 4.38).

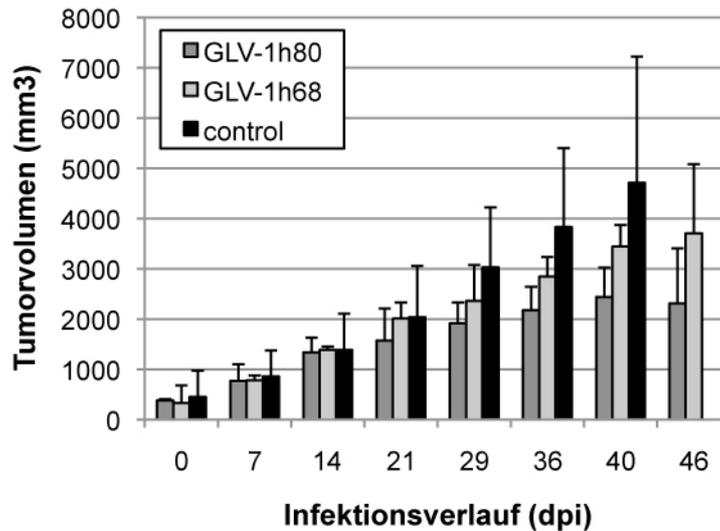


Abbildung 4.38 Tumorprogression des Kolon-Adenokarzinom-Modells HT-29-CBG nach rVACV-Behandlung. Nude-Mäusen mit 250-300 mm³ großen Tumoren wurden mit PBS oder 5x 10⁶ pfu GLV-1h80 bzw. GLV-1h68 intravenös injiziert. Während des Versuchsverlaufs wurden die Tumoren vermessen und das Tumolvolumen mit der Formel (0,5 x Länge x Breite²) berechnet. Dargestellt ist das durchschnittliche Tumolvolumen mit Standardabweichung (n=6).

Eine Injektion von GLV-1h68 führte im HT-29-CBG-Tumormodell zu nur schwachen therapeutischen Effekten im direkten Vergleich zur Behandlung von GI-101A-Tumoren. Die Tumorprogression konnte zwar abgeschwächt werden im Vergleich zum Tumorwachstum PBS-behandelter Tiere, jedoch stellte sich keine Regressions-Phase ein. Zum Zeitpunkt 46 dpi mussten die PBS-Kontrolltiere aufgrund zu großer Tumorumfänge aus dem Versuch genommen werden. Durch Injektion des MCP-1-kodierenden rVACV GLV-1h80 konnte eine Stagnation des Tumorwachstums ab 40 dpi bei durchschnittlich 2500 mm³ erzielt werden, jedoch blieb eine Regressions-Phase aus.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass Infektion mit GLV-1h80 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Expression des rekombinanten murinen Chemokins MCP-1 führt. Das Virus-codierte MCP-1 konnte sowohl quantifiziert als auch immunhistologisch lokalisiert werden. Durch Beobachtung einer Zunahme der intratumoralen TNF- α - und CD14-Konzentration konnte eine Rekrutierung pro-inflammatorischer Immunzellen nach GLV-1h80-Infektion wahrscheinlich gemacht werden. Darüber hinaus führte eine Infektion mit GLV-1h80 zu einer erhöhten Tumor-Regression des humanen Brustkrebs-Modells GI-101A und einer Stagnation der Tumorprogression im humanen Kolon-Adenokarzinom-Modell HT-29-CBG.

Durch gezielte Veränderung des intratumoralen Chemokin-Milieus konnte somit eine Verstärkung der onkolytischen Therapie-Effekte von Vaccinia-Viren erzielt werden.

5. Diskussion

5.1 Verstärkung der onkolytischen Effekte mittels gene-directed prodrug therapy im humanen Brustkrebskarzinom-Model GI-101A

Brustkrebs ist die am weitesten verbreitete Krebserkrankung weltweit und die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen unter den Frauen. Studien ergaben, dass allein im Jahr 2009 in den USA 1,5 Millionen neue Brustkrebskrankungen bei Frauen diagnostiziert wurden und über 40.000 Frauen an diesen folgenschweren Krebserkrankungen starben. Diese enorme Anzahl an Neuerkrankungen fordert neue effektive Therapieansätze neben der konventionellen Behandlung, um die Sterblichkeitsrate zu senken.

Eine vielversprechende Therapieform nutzt den kombinierten Einsatz von onkolytischen Viren und Prodrugs um die Selektivität einer Chemotherapie zu steigern und unerwünschte Nebeneffekte zu verhindern. Hierbei dienen Tumor-spezifische Viren, wie z.B. das Vaccinia Virus, als Gentransfer-Vektoren um Prodrugs in cytotoxisch-aktive Drugs durch Expression verschiedener Enzyme umzuwandeln. Diese Umwandlung in die aktive Form soll dabei ausschließlich auf das Tumorgewebe begrenzt sein [61]. Der Einsatz von Vaccinia Viren in Kombination mit dem gut charakterisierten Prodrug 5-Fluorcytosin, auch bekannt als Flucytosin, führte zu vielversprechenden Ergebnissen in verschiedenen Tumormodellen [174-176]. Basierend auf diesen Berichten wurde in dieser Arbeit das onkolytische Vaccinia Virus GLV-1h68 im Zuge einer gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) eingesetzt. Hierbei führt die Expression von β -Galaktosidase zu einer Aktivierung eines Prodrugs. Das für β -Galaktosidase kodierende *lacZ*-Gen ist Bestandteil eines vielfach angewendeten Reporter-Gen-Systems und findet neben dem Einsatz in der Molekular- sowie Zellbiologie auch in verschiedenen klinischen Studien Anwendung [177, 178].

In vitro Infektionsstudien zeigten, dass sowohl GLV-1h68 als auch das Kontrollvirus GLV-1h43, welchem das *lacZ*-Gen im Genom fehlt, GI-101A-Zellen gleichermaßen infizieren und nahezu identisches Replikationsverhalten in diesen Zellen zeigen. Voneinander abweichende Effekte auf die Tumorzellen, basierend auf unterschiedlichen Replikationsraten beider Viren konnten somit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die Expression der beiden Reporter-Gene Ruc-GFP und β -Galaktosidase nach Infektion mit GLV-1h68 mittels RT-PCR sowie auf Protein-Ebene durch Western Blot nachgewiesen, und im Falle einer GLV-1h43-Infektion eine β -Galaktosidase-Expression ausgeschlossen werden. Da ausschließlich enzymatisch aktive β -Galaktosidase zu einer Aktivierung des Prodrugs führt,

wurde die Enzym-Aktivität in Zelllysaten und Zellkultur-Überständen infizierter GI-101A-Zellen getestet und quantifiziert. Während des Infektionsverlaufs von GLV-1h68 kam es zu einer steigenden Konzentration zellulär assoziierter β -Galaktosidase bis 48 hpi. Zwischen 48 und 72 hpi fiel die Konzentration in den Zellen ab, wohingegen die Konzentration im Überstand zu diesem Zeitpunkt weiter anstieg. Dies ist erklärbar durch die, mit fortschreitender Infektion verbundenen Zelllyse und eine folglich zunehmende Freisetzung des Enzyms in den Zellkultur-Überstand. Eine Koinkubation von sterilfiltrierten, β -Galaktosidase-haltigen Zelllysaten bzw. -überständen mit Prodrug führte zur Abtötung von GI-101A-Zellen. Dies spricht für eine Aktivierung des Prodrugs durch das viral-codierte Enzym. Dagegen führte die Inkubation mit Proben mock- oder GLV-1h43-infizierter Zellen nicht zur Veränderung der Proliferationsrate. Darüber hinaus zeigte dieses prodrug-vermittelte Abtöten der Zellen nach Inkubation mit virus-freien Filtraten, dass das aktive Drug die Zellmembran passieren kann. Dies legt nahe, dass bei Anwendung dieser Kombinationstherapie *in vivo* nicht jede einzelne Zelle selbst im Tumor β -Galaktosidase exprimieren muss, um durch GDEPT abgetötet zu werden. Folglich ist eine vollständige Infektion jeder einzelnen Tumorzelle für den prodrug-vermittelten Effekt nicht erforderlich.

Der für eine erfolgreiche Therapie wichtige *Bystander Effect* wurde in weiteren Experimenten verifiziert. So führte eine kombinierte Behandlung von GI-101A-Zellen mit Viren des Stammes GLV-1h68 und Prodrug nach einer Infektion von GI-101A-Zellen mit einer niedrigen MOI von 0,05 zu starken Synergieeffekten bei der Abtötung der Zellen. Dahingegen konnten keine Unterschiede zwischen mock- oder GLV-1h43-infizierten Zellen beobachtet werden. Das Prodrug selbst zeigt 7 Tage nach Applikation signifikante Inhibierung der Proliferation im Vergleich zu prodrug-unbehandelten Zellen, ein Effekt der durch die Cytotoxizität des Prodrugs selbst hervorgerufen wird, welche vergleichbar ist mit der Cytotoxizität des in der Chemotherapie eingesetzten Doxorubicins [151]. Jedoch war diese unspezifische Hemmung der Zellproliferation viel schwächer im Vergleich zu den additiven Effekten der kombinierten Behandlung von Prodrug und GLV-1h68-Infektion. Ähnliche Wirkung zeigte die Kombinationstherapie auch auf das Proliferationsverhalten anderer humanen oder Hunde-Brustkrebs-Zelllinien. Hunde-Brustkrebszellen werden bereits durch Infektion mit rVACV GLV-1h68 allein lysiert [167]. Die Effekte wurden durch low-light Imaging der Luziferase-exprimierenden Zellen GI-101A-CBG und MDA-MB-231-CBG nach Infektion und Prodrug-Behandlung bestätigt. Diese Ergebnisse lassen auf ein breites Anwendungsgebiet dieser Kombinationstherapie schließen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass es nach der Virus-induzierten β -Galactosidase-Expression in GLV-1h68-infizierten Zellen zu einer Spaltung des prodrugs in das cytotoxische seco-Analogon des Antibiotikums Duocarmycin SA kommt, welches durch Passieren der Zellmembranen einen Bystander Effekt in Brustkrebszellen hervorruft.

Der Wirkungsmechanismus des Duocarmycin SA wurde bereits beschrieben und läuft über den intrinsischen Apoptose-Signalweg ab [158, 159, 179]. Das Antibiotikum verursacht Sequenz-spezifische Alkylierung der Adenine in AT-reichen Regionen doppelsträngiger DNA durch Bindung in die kleine Grube [180]. Diese DNA-Schäden führen zur Spaltung der Pro-Caspase-9, zur Aktivierung der Caspase-3 und schließlich zum programmierten Zelltod. Durch Untersuchung der Expressionsraten Apoptose-assoziiierter Proteine, wie PARP und Caspasen, konnte nachgewiesen werden, dass es auch durch das in dieser Arbeit verwendete Seco-Analogon des Duocarmycins SA zu einer Aktivierung der intrinsischen Apoptose-Kaskade kommt. Durch diese Kaskade kommt es zu einer Aktivierung der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom-C ins Cytoplasma der Zelle. Das freigesetzte Cytochrom C bindet dort an Apaf-1 und lagert sich in einer ATP-abhängigen Reaktion zu einem Heptamer zusammen. Es folgt eine Rekrutierung der Initiator-Caspase-9 und deren Aktivierung im sogenannten Apoptosom-Komplex. Nach Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7 folgt die Degradation von Cytoskellret und DNA [181]. Dagegen konnte in unbehandelten Kontroll-Zellen sowie nach einer Behandlung mit dem Prodrug allein keine aktivierte Caspase-3 und kein PARP nachgewiesen werden. Somit dürfte keine Apoptose erfolgen.

Da Poxviren, unter anderem auch das Vaccinia Virus, einige Mechanismen entwickelt haben, um Apoptose in ihren Wirtszellen zu inhibieren und eine möglichst große Amplifikation viraler Partikel vor Zellyse zu erzielen [162], war es wichtig zu untersuchen, ob es trotz dieser Mechanismen zu einer Apoptose-Induktion durch das verwendete Prodrug kommt. Offenbar sind vor allem Vaccinia Virus-infizierte Zellen vor Auslösung des intrinsischen Apoptose-Wegs geschützt. Dieser Schutz wird unter anderem durch Expression des Proteins F1L vermittelt. F1L wird an die Mitochondrien angelagert und Verhindert so die Freisetzung von Cytochrom C, ein zentraler Vorgang bei der Auslösung der Apoptose-Kaskade [182, 183]. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es nach einer Prodrug-Behandlung, trotz Infektion mit Vaccinia Virus GLV1-h68, zu einer Auslösung dieser Kaskade kommt. In der Tat konnten nach einer Kombinationsbehandlung von GI-101A-Zellen mit Prodrug und GLV-1h68 große Mengen an gespaltener PARP mittels Western Blot nachgewiesen werden. Hingegen konnte sowohl in GLV-1h68-infizierten Zellen ohne Prodrug-Behandlung, als auch in GLV-1h43-infizierten Zellen nur geringe Mengen und in mock-infizierten Zellen nahezu kein PARP nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine rVACV-Infektion allein zwar in einigen GI-101A-Zellen zu einer Apoptose-Induktion führt, jedoch war diese Induktion erheblich stärker in GLV-1h68-Prodrug-behandelten Zellen. Dieser Unterschied wurde auch bei der Expression von aktivierter Caspase-3 deutlich. Diese wichtige Protease war ausschließlich in prodrug-behandelten Zellen nachweisbar war, welche das Enzym β -Galaktosidase exprimierten. Darüber hinaus spricht die in diesen Zellen ausgelöste Spaltung der Caspase-9 für eine Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs. Da nicht

auszuschließen war, dass die Apoptose ausschließlich auf uninfierte Zellen begrenzt war und durch einen *Bystander Effekt* hervorgerufen ist, wurden prodrug-behandelte GLV-1h68-infizierte Zellen mit Hoechst 33342 und Propidium-Iodid (PI) angefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass kondensierte DNA auch in GFP-exprimierenden Zellen erkennbar war, welche negativ für eine Färbung mit PI und folglich nicht tot sondern apoptotisch waren. Dies zeigt, dass es zumindest in einigen Zellen trotz der Virusvermittelten Anti-Apoptose-Mechanismen zu einer Induktion durch das prodrug kommt. Zellen welche durch diese Mechanismen nach Virusinfektion an einer Apoptose gehindert werden, tragen zu einer Virusvermehrung bei und führen somit zu einer weiter fortschreitenden Produktion der prodrug-aktivierenden β -Galactosidase.

Dieses Überleben Virus-infizierter Zellen wird auch in *in vivo*-Experimenten deutlich, denn der Virustiter im Tumorgewebe nahm nach einer prodrug-Behandlung nicht ab, im Vergleich zu Prodrug-unbehandelten, infizierten Kontrollen. Diese unveränderten Virustiter könnten auch auf eine Anreicherung von *lacZ*-negativen Virusmutanten innerhalb des prodrug-behandelten Tumors zurückzuführen sein. Eine Anreicherung dieser Mutanten konnten jedoch durch positive X-Gal-Färbungen in Tumorgewebe nach GLV-1h8-Infektion ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse wurden weiter bestätigt durch X-Gal-Färbungen der viralen Plaques nach Herstellung von Tumorlysaten prodrug-behandelter GLV-1h68-injizierter Tiere. Da das prodrug erst nach Aktivierung in seiner aktiven Form Zellmembranen passieren kann [151], hat diese Aktivierung keinerlei Auswirkungen auf die Virusinfektion selbst. Denn erst nach Freisetzung von β -Galactosidase aus Virus-infizierten Zellen nach deren Lyse kommt es in der extrazellulären Matrix des Tumors zu einer prodrug-Aktivierung. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die höchste Konzentration des aktiven Enzyms β -Galactosidase im Tumorgewebe verbleibt oder nach Entlassung in den Blutkreislauf ausgeschieden bzw. inaktiviert wird. Ein Ausbleiben dieser Inaktivierung würde zu systemischer Toxizität in den Versuchstieren führen, da es außerhalb des Tumorgewebes zu einer ständigen Aktivierung des injizierten Prodrugs käme. Da in den prodrug-behandelten Versuchstieren keine Unterschiede in Gewicht oder allgemeinem Gesundheitszustand im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren auftraten, wird angenommen, dass die freigesetzte Menge an aktiver β -Galactosidase aus dem Tumorgewebe vernachlässigbar gering ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass das injizierte Vaccinia Virus GLV-1h68 im Tumorgewebe lebender Tiere repliziert, unabhängig davon ob eine prodrug-Behandlung erfolgte oder nicht. Die prodrug-Behandlung führte darüber hinaus auch nicht zu einer Abnahme der Expression des funktionellen Enzyms nach Infektion mit GLV-1h68, vielmehr führte die Kombinations-

Therapie zu synergistischen Effekten und einer signifikanten Steigerung der Tumorregression.

Die hochselektive Replikation von Vaccinia-Viren in Tumorzellen führt zu einer spezifischen Anreicherung von Viren im Tumor [29, 167]. Diese ermöglicht hocheffiziente Expression Virus-kodierter prodrug-aktivierender Enzyme im Tumorgewebe. Dagegen führt der Einsatz tumor-spezifischer Antikörper mit gekoppelten prodrug-aktivierenden Enzymen vergleichsweise zu sehr niedrigen intratumoralen Konzentrationen. Auch können sowohl Menge als auch Lokalisation der aktiven β -Galactosidase vor Beginn der prodrug-Behandlung durch Fluoreszenz-Imaging kontrolliert werden (Stritzker *et al.*, in Vorbereitung).

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine Kombination einer gene-directed prodrug Therapie mit rekombinanten Vaccinia Viren wie GLV-1h68 vielversprechende Möglichkeiten für eine erfolgreiche Tumorthherapie bieten. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um die bereits entwickelten Systeme zu optimieren.

5.2 Immuntherapie durch Einsatz des rVACV GLV-1h80 – Gezielte Beeinflussung des intratumoralen Chemokin-Netzwerks

Trotz des zunehmenden Verständnisses der Biologie von Krebserkrankungen in den letzten Jahrzehnten, sind die Aussichten auf eine komplette Heilung ernüchternd. Diese schlechten Erfolgsaussichten der traditionellen Krebstherapie führen zur Entwicklung vieler alternativer Therapieformen. Das Forschungsgebiet der Immuntherapie ist ein ständig wachsender und spannender Bereich und zielt auf eine Mobilisierung des körpereigenen Immunsystems für eine mögliche Zerstörung von Tumoren. Oftmals findet eine Cytokin-basierende Immuntherapie Anwendung. Aufgrund der Schwierigkeit eine geeignete Dosis des therapeutischen Cytokins zu erzielen, ohne große Toxizitäten für normales Gewebe hervorzurufen, wurden neuartige Methoden entwickelt. Durch den Einsatz von Gen-Vektoren, z.B. onkolytischer Viren, wie das Vaccinia-Virus, kann eine therapeutische Konzentration auf das Tumorgewebe begrenzt und dadurch Nebeneffekte minimiert werden [184]. Somit können die onkolytischen Effekte von Viren verstärkt werden um eine effektivere Behandlung verschiedener Tumorarten zu gewährleisten.

Basierend auf der Grundlage Cytokin-basierender Immuntherapie wurde in dieser Arbeit das rekombinante, onkolytische Vaccinia-Virus GLV-1h80 genutzt, um eine lokal begrenzte Expression des Chemokins MCP-1 zu erzielen.

Durch Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass aus der Expression des Fremd-Gens *mcp-1 in vitro* keinerlei negative Beeinflussung des Replikationsverhaltens in den humanen Zelllinien GI-101A und HT-29-CBG resultiert. Die Replikation wurde hierbei direkt mit der Replikation, des als Kontrollvirus dienenden rVACV GLV-1h68 verglichen. Für beide Viren konnte eine Zunahme viraler Partikel während des Infektionsverlaufs nachgewiesen werden. Hierbei lagen die Konzentrationen nach GLV-1h80-Infektion geringfügig über den Werten nach GLV-1h68-Infektion. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass eine intravenöse Injektion von GLV-1h68 zu einer zielgerichteten Replikation des Virus im Tumorgewebe führt [29, 167, 185]. Durch Untersuchungen der intratumoralen Viruskonzentration im GI-101A- und HT-29-CBG-Modell nach GLV-1h80-Infektion konnte gezeigt werden, dass eine Expression des rekombinanten murinen MCP-1 auch *in vivo* keinerlei negative Effekte bezüglich der viralen Replikation hervorruft. Nach Injektion beider rVACV konnten bereits 7 dpi nachweisbare Viruskonzentrationen im Tumorgewebe ermittelt werden. Die Replikation konnte des Weiteren durch Untersuchung der Expression des Markerproteins GFP durch real-time Monitoring bestätigt werden. Eine Infektion von GLV-1h80 führte zu anfänglich höheren Viruskonzentrationen verglichen mit der Injektion von GLV-1h68 und bestätigt somit die Daten der *in vitro* Replikationsstudien. Während die Konzentration viraler Partikel nach GLV-1h80-Infektion im HT-29-CBG-Modell deutlich über denen in GI-101A-Tumoren lag, führte eine GLV-1h68-Injektion dagegen zu niedrigeren Konzentrationen in HT-29-CBG-Tumoren. Somit konnten voneinander abweichende Effekte auf Tumorzellen, basierend auf unterschiedliche Replikationsraten der beiden Viren selbst bzw. Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien GI-101A und HT-29-CBG ausgeschlossen werden. Da eine Infektion durch onkolytische Viren und die damit verbundene Toxizität ausschließlich auf das Tumorgewebe lokal begrenzt sein sollte, um mögliche Nebeneffekte zu verhindern, wurden die Viruskonzentrationen in Organen Tumor-tragender Nude-Mäuse bestimmt. Zu den Zeitpunkten 21 und 42 dpi konnten keine viralen Partikel in Milz, Leber, Herz und Lunge nachgewiesen werden, wodurch eine auf das Tumorgewebe begrenzte Toxizität von GLV-1h80 und GLV-1h68 belegt werden konnte.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch Austausch der Renilla Luziferase-GFP Expressions-Kassette im Genort F14.5L durch homologe Rekombination eine Expression des humanen Norepinephrin-Transporters erzielt werden kann [186]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Austausch der lacZ- und Transferrin-Rezeptor-Kassette von GLV-1h68 durch eine für das murine MCP-1-codierende Sequenz im Genort TK zur Expression des rekombinanten Proteins in Virus-infizierten Zellen führt. In Infektionsstudien konnte durch Quantifizierung der intrazellulären MCP-1-mRNA nach vorangegangener real-time PCR eine Transkription des für MCP-1 codierenden Gens in GLV-1h80-infizierten GI-101A-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung in

Überständen infizierter GI-101A- und HT-29-CBG-Zellen mittels eines MCP-1-spezifischen ELISA zeigten zudem, dass das kodierte Proteine in infizierten Wirtszellen translatiert und sezerniert wird. Zudem stellte sich heraus, dass eine Infektion von HT-29-CBG-Zellen mit GLV-1h80 zu deutlich niedrigeren MCP-1-Konzentrationen in Zellkulturüberständen als nach Infektion von GI-101A-Zellen führte, obgleich Replikationsexperimente eine erhöhte Replikationsrate in dieser Zelllinie zeigten. Diese Konzentrationsunterschiede konnten auch bei Quantifizierung der MCP-1-Proteinkonzentration in soliden Tumoren beobachtet werden. Darüber hinaus wurde deutlich, dass nicht nur eine GLV-1h80-Infektion zur Zunahme der intratumoralen MCP-1-Expression führte, denn auch durch GLV-1h68-Infektion konnte ein Anstieg des Chemokins im Vergleich mit Kontroll-Tumoren beobachtet werden. Dieser Anstieg könnte auf einer durch die Vaccinia-Virus-Infektion hervorgerufenen Immunantwort beruhen.

Eine chemotaktische Wirkung von MCP-1 erfolgt ausschließlich durch Bindung des Chemokins an den korrespondierenden Rezeptor CCR-2 der Zielzellen [168, 169]. Um diese Bindung zu ermöglichen, muss das in Virus-infizierten Tumorzellen synthetisierte MCP-1 aus diesen exportiert werden. Untersuchung der MCP-1-Konzentration im Blutserum Tumortragender Nude-Mäuse zeigten ab 21 dpi eine deutliche Erhöhung der MCP-1-Konzentration GLV-1h80-infizierter Tiere, welche bis 42 dpi auf über 600 pg/ml anstieg. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Konzentrationen in den Blutseren mock- und GLV-1h68-infizierter Tiere dagegen unterhalb der Nachweisgrenze. Dies bestätigte eine systemische Freisetzung des intratumoral, durch die Infektion von Tumorzellen mit GLV-1h80 gebildeten Chemokins MCP-1, welche für therapeutische Effekte notwendig ist.

Die Ergebnisse der MCP-1-Quantifizierung nach Infektion humaner Tumorzellen mit GLV-1h80 bestätigten sich zudem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in immunhistologischen Untersuchungen. So führte eine GLV-1h80-Infektion von GI-101A-Zellen in Zellkultur 24 hpi zu einem positiven Fluoreszenzsignal nach Inkubation mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper. Die Expression des Chemokins war dabei nicht auf GFP-positive Zellen begrenzt, sondern konnte auch in angrenzenden Zellen nachgewiesen werden. Möglicherweise könnten die Unterschiede darauf zurückzuführen sein, dass zum optischen Nachweis des Proteins GFP eine höhere Konzentration nötig ist. Das Chemokin wurde durch einen MCP-1-spezifischen Antikörper markiert und könnte so durch eine erhöhte Sensitivität auch zu einer Anfärbung geringerer Konzentrationen geführt haben. Erwartungsgemäß konnte das murine Protein weder in mock- noch in GLV-1h68-infizierten humanen Zellen detektiert werden. Ein immunhistologischer Nachweis konnte auch im Tumorgewebe solider GI-101A- und HT-29-CBG-Tumoren ab dem Zeitpunkt 7 dpi erbracht werden. Dies korreliert direkt mit den Ergebnissen der Quantifizierung des Proteins in Tumorlysaten infizierter Tiere. Abweichend

zu den ELISA-Daten war jedoch durch diese histologischen Untersuchungen keine MCP-1-Expression in GLV-1h68-infizierten Gewebeschnitten nachweisbar. Die unterschiedlichen Beobachtungen beruhen auf verschiedene Sensitivitäten der angewandten Nachweismethode. Erneut konnte durch die spezifische Markierung des Chemokins auf eine niedrigere Konzentration im HT-29-CBG-Modell geschlossen werden. Anhand konfokaler Aufnahmen GLV-1h80-infizierter Gewebeschnitte konnten unterschiedliche Infektionszonen innerhalb des Tumors dargestellt werden. Eine Zone früher Virus-Infektion exprimierte das viral codierte MCP-1, wohingegen keine GFP-Expression in diesen Zellen nachweisbar war. Mit fortschreitender Infektion dagegen konnten beide Proteine in den infizierten Zellen nachgewiesen werden, möglicherweise resultierend aus der höheren Konzentration des Proteins GFP. Eine Markierung der Zellkerne zeigte zudem eine vermehrte Zelllyse nach Virusinfektion.

Die Hauptfunktion des Chemokins MCP-1 liegt in seiner Rekrutierung von Monocyten [99], zudem konnte *in vitro* eine Stimulierung der Chemotaxis von memory-T-Lymphozyten und Dendritischen Zellen nachgewiesen werden [187,188]. Aufgrund dieser chemotaktischen Effekte wird für MCP-1 in einigen Tumormodellen eine cytotoxische Funktion berichtet [108, 189], wohingegen für andere Tumormodelle eine Förderung der Tumorprogression durch MCP-1 gezeigt werden kann [190, 191]. Eine histologische Untersuchung von Paraffin-Präparaten GLV-1h80-, GLV-1h68- und mock-infizierter Tumoren konnte keine eindeutigen Unterschiede der Infiltrierung CD68-positiver Immunzellen zwischen den beiden rVACV nachweisen, da es zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers kam. Die Quantifizierung Makrophagen-typischer Proteine wie TNF- α und CD14 zeigte jedoch, dass die GLV-1h80-vermittelte Expression des rekombinanten MCP-1 Einflüsse auf die Population infiltrierender Immunzellen hatte. Die Expression des pro-inflammatorischen Cytokins TNF- α durch TAMs kann zu einer vermehrten Abtötung von Tumorzellen führen [155]. Eine Ermittlung der Konzentration dieses Cytokins in GI-101A-Tumoren zeigte eine Erhöhung nach Infektion mit GLV-1h80, verglichen mit Proben mock- bzw. GLV-1h68-infizierter Tiere. Erneut konnte auch durch das rVACV GLV-1h68 ein Anstieg der Expression erzielt werden, welche jedoch deutlich unterhalb der nach GLV-1h80-Infektion ermittelten Konzentration lag. Durch die Expression von MCP-1 erfolgte ein Anstieg der intratumoralen TNF- α -Expression, was auf eine Zunahme der pro-inflammatorischen TAMs innerhalb des Tumorgewebes schließen lässt. Untersuchungen der Expression in HT-29-CBG-Tumoren zeigten ein Ausbleiben des Anstiegs dieses Cytokins im Tumorgewebe GLV-1h80-infizierter Tiere.

Ein weiteres Oberflächenprotein, welches den pro-inflammatorischen Phänotyp infiltrierender Immunzellen auszeichnet, ist CD14. Durch einen spezifischen ELISA konnte die

Konzentration dieses Proteins in Tumorlysaten nach GLV-1h80-, GLV-68- und mock-Infektion ermittelt und in direkten Vergleich gesetzt werden. Analog zu den Ergebnissen des TNF- α -ELISA konnte auch bei der Quantifizierung des CD14-Proteins eine GLV-1h80-vermittelte Zunahme im GI-101A-Tumorgewebe gezeigt werden, welche in HT-29-CBG-Tumoren nicht nachweisbar war.

Vaccinia-Virus hat eine Vielzahl immunmodulatorischer Mechanismen entwickelt, um einer Immunantwort des Wirts zu entkommen und eine intrazelluläre Replikation innerhalb der Wirtszellen zu ermöglichen [192]. So kodiert es verschiedene sekretorischer Proteine, welche mit sehr hoher Affinität Chemokine binden können und somit als Antagonisten der ursprünglichen Chemokin-Rezeptoren dienen. Diese Proteine werden als *CC-chemokine-binding proteins* (CBPs) bezeichnet. Eines dieser Vaccinia-Proteine, das *35-kDa CC-chemokine binding protein*, bindet unter anderem das Chemokin MCP-1 [193]. Trotz dieser Strategien konnte jedoch durch Überexpression von MCP-1 im Tumorgewebe eine Veränderung der intratumoralen TNF- α - und CD14-Konzentration erzielt werden und somit eine Rekrutierung von Immunzellen vermutet werden.

Eine Injektion von $1,7 \times 10^6$ Knochenmarks-Makrophagen führte zu einem Verlust der Effekte einer GLV-1h80-Infektion von GI-101A-Tumoren auf die TNF- α - und CD14-Expression. In beiden Fällen führte die BMM-Injektion zwar zu einer im Vergleich zu Kontrollproben erhöhten Konzentration, jedoch blieb diese auf dem Level GLV-1h68-infizierter Proben und führte daher sehr wahrscheinlich zu keiner Beeinflussung der Population infiltrierender Immunzellen. Die Injektion dieser Menge an BMM, führt zu einer Überschwemmung des Organismus mit körperfremden Immunzellen und scheint die MCP-1-vermittelten intratumoralen Effekte zu verhindern.

Die therapeutischen Effekte der erzielten MCP-1-Expression wurden durch Monitoring der Tumorprogression nach Implantation von GI-101A- oder HT-29-CBG-Zellen *in vivo* untersucht. Eine Injektion der rVACV GLV-1h80 und GLV-1h68 führte im Fall des GI-101A-Modells zunächst 17 dpi zu einem Anstieg der Tumorgöße verglichen mit den Kontrolltumoren. Ab 22 dpi konnten jedoch bei beiden Viren onkolytische Effekte gezeigt werden, welche zu einem Rückgang des Tumolvolumens führten. Jedoch konnte durch eine GLV-1h80-Infektion und der damit verbundenen MCP-1-Expression eine Verstärkung der onkolytischen Effekte im Vergleich zu einer GLV-1h68-vermittelten Onkolyse erzielt werden, welche durch eine signifikante Abnahme des Tumolvolumens deutlich wurden.

Das HT-29-CBG-Tumormodell zählt zu einem nur schwach auf die GLV-1h68-vermittelte onkolytische Virustherapie reagierende Tumormodell und wird auch als *poor-Responder/*

non-Responder bezeichnet. Nach Injektion des rVACV GLV-1h80 konnte zwar keine eindeutige Tumorregression beobachtet werden, jedoch konnte auch in diesem humanen Tumormodell eine Verstärkung der onkolytischen Effekte erzielt werden, welche zunächst 21 dpi die Wachstumsrate gegenüber GLV-1h68- und mock-infizierten Tumoren abschwächte und 42 dpi zu einer Stagnation des Tumorwachstums führte. Die ausbleibende Regression geht einher mit einem Ausbleiben des Anstiegs intratumoraler TNF- α - und CD14-Konzentrationen in diesem Tumormodell, und lässt auf eine fehlende bzw. abgeschwächte Beeinflussung infiltrierender Immunzellen schließen. Die GLV-1h80-induzierte Expression von MCP-1 konnte auch in diesem Tumormodell nachgewiesen werden, jedoch lagen die Konzentrationen deutlich unter den im GI-101A-Modell ermittelten Konzentrationen. Replikationsstudien zeigten jedoch, dass diese Konzentrationsunterschiede keinesfalls auf einem unterschiedlichen Replikationsverhalten basieren können. Die schwächeren onkolytischen Effekte von GLV-1h80 gehen einher mit einem zum GI-101A-Modell veränderten Tumor-Mikromilieu. Dies wird deutlich anhand der Abweichungen der Expressionsraten von TNF- α und CD14, die möglicherweise aus der geringeren Expression des rekombinanten Chemokins MCP-1 resultieren. Die Infektion humaner HT-29-CBG-Tumoren führt möglicherweise nur zu unzureichender Induktion einer Antwort des angeborenen Immunsystems.

Solide Tumoren, sowohl primären Ursprungs als auch deren Metastasen, werden von einer großen Anzahl von Immunzellen infiltriert. In Zusammenhang mit dieser heterogenen Zellpopulation spielen insbesondere Makrophagen eine wichtige Rolle und können im Brustkarzinom bis zu 80 % der Zellmasse ausmachen [71]. Makrophagen zählen zu den Haupteffektoren bei inflammatorischen Prozessen und der Abwehr von Pathogenen durch das angeborene sowie das adaptive Immunsystem. Dabei haben sie eine pleiotrope biologische Funktion welche Antigen-Präsentation, Cytotoxizität auf Zielzellen, Entfernung von Zelldebris und Umstrukturierung von Gewebe, Regulation der Inflammation, Vermittlung von Immunität und verschiedene Formen von Endozytose umfasst [194]. Zirkulierende Monocyten differenzieren nach Rekrutierung ins Tumorgewebe über die Blutgefäße in *tumor-associated macrophages* (TAMs) und Dendritische Zellen (DCs) [145]. Die Heterogenität dieser Immunzellen basiert auf verschiedenen Phänotypen und wird sowohl durch genetische Hintergründe als auch durch gewebe- und immun-spezifische Stimuli hervorgerufen [145, 195]. Die Rekrutierung in das Tumorgewebe erfolgt durch chemotaktische Signale verschiedener Chemokine, wobei MCP-1 eine Schlüsselfunktion bildet und oftmals als Hauptdeterminante für die Makrophagen-Infiltrierung angesehen werden [196]. So korreliert die Konzentration chemotaktischer Proteine in vielen humanen Tumoren positiv mit der Anzahl der TAMs [197]. Die große Anzahl der Aktivierungsmöglichkeiten und eine damit verbundene Plastizität führte zu einer Einordnung der TAMs in M1- und M2-Typ. Diese

Polarisierung muss jedoch als sehr vereinfachte theoretische Darstellung der verschiedenen Extreme dieser vielfältigen Immunzellen angesehen werden [198]. Während der M1-Phenotyp, auch bezeichnet als klassisch aktivierte Makrophagen, durch IFN- γ , TNF- α oder GM-CSF induziert wird und cytotoxische Eigenschaften aufweist, führt die Expression von IL-4/IL-13 zu einer alternativen Aktivierung des M2-Phenotyps. M1-Makrophagen haben erhöhte Antigen-präsentierende Eigenschaften, produzieren die Cytokine IL-12 und IL-23 und haben sehr effektive cytotoxische Eigenschaften gegenüber Tumorzellen bzw. Zellen welche intrazelluläre Pathogene beinhalten. Die Cytotoxizität wird über eine Freisetzung hoher Konzentrationen toxischer Intermediäre wie Stickstoff-Monoxid (NO), reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) und TNF vermittelt [145, 147]. Somit können M1-Makrophagen auch als pro-inflammatorischer Phänotyp bezeichnet werden, welcher dem Körper Schutz vor Pathogenen und Tumorzellen bieten. Das andere Extrem stellt der M2-Phenotyp dar, welcher im Tumorgewebe dominieren zu scheint und zur Progression beiträgt [199, 200]. M2-Makrophagen weisen nur schwache Antigen-präsentierende Eigenschaften aus, fördern Wundheilung und Angiogenese und hemmen die Aktivität sowie Proliferation von T-Zellen [147]. Ihr Expressionsprofil wird geprägt durch anti-inflammatorische Proteine, z.B. IL-10 oder TGF- β und Proteasen. Darüber hinaus erfolgt bei einer alternativen Aktivierung zum M2-Typ ein metabolischer Wechsel der zur Produktion von Polyaminen führt und so die NO-Produktion hemmt [201]. Die in dieser Arbeit dargelegte Verstärkung der onkolytischen Effekte durch die Expression des Chemokins MCP-1 könnten auf einer Beeinflussung des intratumoralen TAM-Phänotyps basieren. Durch die Expression des rekombinanten MCP-1 erfolgt eine verstärkte Rekrutierung zirkulierender Monocyten entlang eines Chemokin-Gradienten ins Tumorgewebe. Gleichzeitig führt die Virusinfektion zur Synthese von Interferonen, ein Vorgang der auch nach Infektion der rVACV GLV-1h68 und GLV-1h80 im Tumorgewebe zu einem 20-30fachen Anstieg der IFN- γ -Expression im Vergleich zu Konzentrationen der Kontrolltumoren führte. Eine Stimulierung von TAMs durch Interferone fördert die klassische Aktivierung zum M1-Phenotyp [202, 203]. Dieser Phänotyp führt zur vermehrten Expression pro-inflammatorischer Cytokine, welche direkte cytotoxische Eigenschaften auf Tumorzellen aufweisen können [78, 204]. Die nachgewiesene erhöhte Expression von TNF- α könnte die cytotoxischen Effekte zusätzlich amplifizieren [205, 206]. Darüber hinaus kann eine TNF- α - sowie IFN- γ -Stimulierung der Tumorzellen selbst zu einer Expression der induzierbaren NO-Synthase führen und eine NO-Produktion auslösen. NO wiederum führt in einigen Krebszelllinien nach einer Blockierung des Zellzyklus und Arretierung in der G₁-Phase zur Apoptose [207]. Des Weiteren wurde kürzlich ein Modell nahegelegt, nach welchem TNF- α den Zellzyklus in Brustkrebszellen beeinflusst und das Überleben der Krebszellen durch Hemmung verschiedener Wachstumssignale reduziert [204]. Somit könnte die MCP-1-Expression zunächst eine Rekrutierung von Monocyten ins

Tumorgewebe auslösen. Dort werden sie durch pro-inflammatorische Cytokine aktiviert, können die Apoptose der Tumorzellen induzieren und fördern zusätzliche MCP-1-Freisetzung. Diese führt zu einer weiteren Amplifizierung der Makrophagen-Rekrutierung. Der Effekt von MCP-1 ist zudem nicht nur auf eine indirekte Wirkung durch Rekrutierung von Makrophagen begrenzt, sondern erfolgt möglicherweise auch direkt durch Aktivierung Makrophagen-vermittelter Apoptose [78].

Die Ergebnisse zeigen, dass die onkolytischen Effekte von Vaccinia-Viren durch Induktion einer MCP-1-Expression im Tumorgewebe humaner Heterotransplantate verstärkt werden können und einen vielversprechenden Ansatz für eine Tumorthherapie darstellen. Die komplexen Interaktionen und Expressionsmuster von Cytokinen im Tumorgewebe sind jedoch noch nicht erforscht und es bedarf weiteren Untersuchungen, um die immunologischen Prozesse vollkommen zu verstehen.

Die Behandlung von Krebserkrankungen durch gentherapeutische Strategien kann in 3 Kategorien untergliedert werden: Enzym/Prodrug-Systeme im Zuge von GDEPT [61], Immun-Gentherapie [208] und *tumor suppressor-gene Replacement therapy* [209]. In dieser Arbeit wurden 2 mögliche Therapieansätze zur Verstärkung onkolytischer Effekte von Vaccinia-Viren in getrennten Studien untersucht. Möglicherweise könnte die Konstruktion eines rVACV, welches sowohl die Expression des Chemokins MCP-1, als auch des Prodrug-aktivierenden Enzyms β -Gal im Tumorgewebe induziert, zu einer weiteren therapeutischen Verstärkung führen. Die Prodrug-induzierte Apoptose könnte durch Makrophagen-vermittelte Apoptose verstärkt werden und zu einer schnelleren und effektiveren Hemmung der Tumorprogression führen. Darüber hinaus könnte möglicherweise eine onkolytische Virustherapie in *poor-* bzw. *non-Responder*-Modellen durch die Kombination von GDEPT und Immuntherapie zu besseren therapeutischen Prognosen führen.

6. Literaturverzeichnis

1. National Center for Health Statistics, C.f.D.C.a.P., *US Mortality Data 2006*. 2009.
2. zur Hausen, H., *Viruses in human cancers*. Eur J Cancer, 1999. 35(14): p. 1878-85.
3. Carrillo-Infante, C., et al., *Viral infections as a cause of cancer (review)*. Int J Oncol, 2007. 30(6): p. 1521-8.
4. GBE, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs*. 2007.
5. Le, X.F., F. Pruefer, and R.C. Bast, Jr., *HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways*. Cell Cycle, 2005. 4(1): p. 87-95.
6. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. 307(5706): p. 58-62.
7. Ruegg, C. and N. Mutter, *Anti-angiogenic therapies in cancer: achievements and open questions*. Bull Cancer, 2007. 94(9): p. 753-62.
8. Dock, G., *The influence of complicating diseases upon leukemia*. American Journal of Medical Sciences, 1904. 127(4): p. 563-592.
9. Pack, G.T., *Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis*. AMA Arch Derm Syphilol, 1950. 62(5): p. 694-5.
10. Southam, C.M., M.R. Hilleman, and J.H. Werner, *Pathogenicity and oncolytic capacity of RI virus strain RI-67 in man*. J Lab Clin Med, 1956. 47(4): p. 573-82.
11. Martuza, R.L., et al., *Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant*. Science, 1991. 252(5007): p. 854-6.
12. Rowe, W.P., et al., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. 84(3): p. 570-3.
13. Cattaneo, R., et al., *Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded*. Nat Rev Microbiol, 2008. 6(7): p. 529-40.
14. Coffey, M.C., et al., *Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway*. Science, 1998. 282(5392): p. 1332-4.
15. Mastrangelo, M.J., et al., *Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated*. J Clin Invest, 2000. 105(8): p. 1031-4.
16. Gromeier, M., et al., *Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6803-8.

17. Miyatake, S., et al., *Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication*. J Virol, 1997. 71(7): p. 5124-32.
18. Wickham, T.J., et al., *Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins*. J Virol, 1997. 71(11): p. 8221-9.
19. Kirn, D., R.L. Martuza, and J. Zwiebel, *Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions*. Nat Med, 2001. 7(7): p. 781-7.
20. Heise, C.C., et al., *Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects*. Cancer Gene Ther, 1999. 6(6): p. 499-504.
21. Harrison, S.C., *Discovery of antivirals against smallpox*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., 2004. 101(31): p. 11178-11192.
22. Cono, J., *Smallpox vaccination and adverse reactions: Guidance for clinicians*. MMWR, 2003. 52: p. 1-28.
23. Moss, B., *Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11341-8.
24. Thorne, S.H., et al., *Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963*. J Clin Invest, 2007. 117(11): p. 3350-8.
25. Moss, B., *Poxvirus entry and membrane fusion*. Virology, 2006. 344(1): p. 48-54.
26. Mercer, J. and A. Helenius, *Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells*. Science, 2008. 320(5875): p. 531-5.
27. Vanderplasschen, A., et al., *Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(13): p. 7544-9.
28. Puhlmann, M., et al., *Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant*. Cancer Gene Ther, 2000. 7(1): p. 66-73.
29. Zhang, Q., et al., *Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus*. Cancer Res, 2007. 67(20): p. 10038-46.
30. Yu, Y.A., et al., *Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins*. Nat Biotechnol, 2004. 22(3): p. 313-20.
31. Moss, B., *Poxviridae: The Viruses and their Replication*. Fields Virology, Fourth Edition (D.M Knipe and P.M. Howley, eds), 2001: p. 2849-2883.

32. Appleyard, G., A.J. Hapel, and E.A. Boulter, *An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus*. J Gen Virol, 1971. 13(1): p. 9-17.
33. Payne, L., *Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus*. J Virol, 1978. 27(1): p. 28-37.
34. Payne, L.G., *Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus*. J Virol, 1979. 31(1): p. 147-55.
35. Grunewald, K. and M. Cyrklaff, *Structure of complex viruses and virus-infected cells by electron cryo tomography*. Curr Opin Microbiol, 2006. 9(4): p. 437-42.
36. Minnigan, H. and R.W. Moyer, *Intracellular location of rabbit poxvirus nucleic acid within infected cells as determined by in situ hybridization*. J Virol, 1985. 55(3): p. 634-43.
37. Vanderplasschen, A. and G.L. Smith, *A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors*. J Virol, 1997. 71(5): p. 4032-41.
38. Lin, C.L., et al., *Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo*. J Virol, 2000. 74(7): p. 3353-65.
39. Carter, G.C., et al., *Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans*. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 5): p. 1279-90.
40. Chung, C.S., et al., *A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate*. J Virol, 1998. 72(2): p. 1577-85.
41. Hsiao, J.C., C.S. Chung, and W. Chang, *Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells*. J Virol, 1999. 73(10): p. 8750-61.
42. Ichihashi, Y. and M. Oie, *The activation of vaccinia virus infectivity by the transfer of phosphatidylserine from the plasma membrane*. Virology, 1983. 130(2): p. 306-17.
43. Henson, P.M., D.L. Bratton, and V.A. Fadok, *Apoptotic cell removal*. Curr Biol, 2001. 11(19): p. R795-805.
44. Hayasaka, D., F.A. Ennis, and M. Terajima, *Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses*. Virol J, 2007. 4: p. 22.
45. Law, M., et al., *Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(15): p. 5989-94.

46. Schramm, B. and J.K. Locker, *Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication*. Traffic, 2005. 6(10): p. 839-46.
47. Sanderson, C.M. and G.L. Smith, *Cell motility and cell morphology: how some viruses take control*. Expert Rev Mol Med, 1999. 1999: p. 1-16.
48. Bablanian, R., et al., *Inhibition of protein synthesis by vaccinia virus. IV. The role of low-molecular-weight viral RNA in the inhibition of protein synthesis*. Virology, 1981. 112(1): p. 13-24.
49. Bablanian, R., et al., *Studies on the mechanisms of vaccinia virus cytopathic effects. II. Early cell rounding is associated with virus polypeptide synthesis*. J Gen Virol, 1978. 39(3): p. 403-13.
50. Hiller, G., et al., *Interaction of assembled progeny pox viruses with the cellular cytoskeleton*. Virology, 1979. 98(1): p. 142-53.
51. Cyrklaff, M., et al., *Cryo-electron tomography of vaccinia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(8): p. 2772-7.
52. Tolonen, N., et al., *Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei*. Mol Biol Cell, 2001. 12(7): p. 2031-46.
53. Hiller, G. and K. Weber, *Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment*. J Virol, 1985. 55(3): p. 651-9.
54. Schmelz, M., et al., *Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network*. J Virol, 1994. 68(1): p. 130-47.
55. Tooze, J., et al., *Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes*. Eur J Cell Biol, 1993. 60(1): p. 163-78.
56. Moss, B. and B.M. Ward, *High-speed mass transit for poxviruses on microtubules*. Nat Cell Biol, 2001. 3(11): p. E245-6.
57. Smith, G.L., A. Vanderplasschen, and M. Law, *The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 12): p. 2915-31.
58. Blasco, R. and B. Moss, *Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread*. J Virol, 1992. 66(7): p. 4170-9.
59. Kirn, D.H. and S.H. Thorne, *Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(1): p. 64-71.
60. Niculescu-Duvaz, I. and C.J. Springer, *Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy*. Mol Biotechnol, 2005. 30(1): p. 71-88.

61. Schepelmann, S. and C.J. Springer, *Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy*. *Curr Gene Ther*, 2006. 6(6): p. 647-70.
62. Moolten, F.L., *Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy*. *Cancer Res*, 1986. 46(10): p. 5276-81.
63. Imaizumi, K., et al., *Bystander tumoricidal effect and gap junctional communication in lung cancer cell lines*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. 18(2): p. 205-12.
64. Wygoda, M.R., et al., *Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by bystander cells: the Good Samaritan effect*. *Cancer Res*, 1997. 57(9): p. 1699-703.
65. Marais, R., et al., *Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G2 combination*. *Cancer Res*, 1996. 56(20): p. 4735-42.
66. Marais, R., et al., *A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy*. *Nat Biotechnol*, 1997. 15(13): p. 1373-7.
67. Vassaux, G. and P. Martin-Duque, *Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of the different approaches*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. 4(4): p. 519-30.
68. Tomacic, M.T., R. Thust, and B. Kaina, *Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation*. *Oncogene*, 2002. 21(14): p. 2141-53.
69. Tietze, L.F. and B. Krewer, *Novel analogues of CC-1065 and the duocarmycins for the use in targeted tumour therapies*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. 9(3): p. 304-25.
70. Slettenaar, V.I. and J.L. Wilson, *The chemokine network: a target in cancer biology?* *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(8): p. 962-74.
71. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. *J Pathol*, 2002. 196(3): p. 254-65.
72. Zou, W., et al., *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells*. *Nat Med*, 2001. 7(12): p. 1339-46.
73. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. *Curr Mol Med*, 2003. 3(7): p. 643-51.
74. Toulza, F., J.F. Eliaou, and V. Pinet, *Breast tumor cell soluble factors induce monocytes to produce angiogenic but not angiostatic CXC chemokines*. *Int J Cancer*, 2005. 115(3): p. 429-36.

75. Takamori, H., et al., *Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1*. *Pancreas*, 2000. 21(1): p. 52-6.
76. Murakami, T., et al., *Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells*. *Cancer Res*, 2002. 62(24): p. 7328-34.
77. Cabioglu, N., et al., *CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(16): p. 5686-93.
78. Monti, P., et al., *The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antitumorigenic activity*. *Cancer Res*, 2003. 63(21): p. 7451-61.
79. Moran, C.J., et al., *RANTES expression is a predictor of survival in stage I lung adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(12): p. 3803-12.
80. Parker, J.N., et al., *Enhanced inhibition of syngeneic murine tumors by combinatorial therapy with genetically engineered HSV-1 expressing CCL2 and IL-12*. *Cancer Gene Ther*, 2005. 12(4): p. 359-68.
81. Arenberg, D.A., et al., *Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice*. *J Clin Invest*, 1996. 97(12): p. 2792-802.
82. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. *Nature*, 2001. 410(6824): p. 50-6.
83. Bertolini, F., et al., *CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma*. *Cancer Res*, 2002. 62(11): p. 3106-12.
84. Wu, V.Y., D.A. Walz, and L.E. McCoy, *Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4*. *Prep Biochem*, 1977. 7(6): p. 479-93.
85. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. 354(6): p. 610-21.
86. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. 12(2): p. 121-7.
87. Kelner, G.S., et al., *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine*. *Science*, 1994. 266(5189): p. 1395-9.
88. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. *Nature*, 1997. 385(6617): p. 640-4.
89. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. 42: p. 469-99.
90. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 102-7.

91. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 95-101.
92. Ransohoff, R.M., *Snip-snip, kill-kill: truncated SDF-1 and HIV-associated neurodegeneration*. Nat Neurosci, 2003. 6(10): p. 1009-11.
93. Nagira, M., et al., *A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells*. Eur J Immunol, 1998. 28(5): p. 1516-23.
94. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 891-928.
95. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. EMBO J, 1997. 16(23): p. 6996-7007.
96. Mellado, M., et al., *Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 397-421.
97. Yoshimura, T., et al., *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE*. FEBS Lett, 1989. 244(2): p. 487-93.
98. Yoshimura, T., et al., *Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes*. J Immunol, 1989. 142(6): p. 1956-62.
99. Ajuebor, M.N., et al., *Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model*. J Leukoc Biol, 1998. 63(1): p. 108-16.
100. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. 394(6696): p. 894-7.
101. Dawson, T.C., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 1999. 143(1): p. 205-11.
102. Ip, W.K., C.K. Wong, and C.W. Lam, *Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways*. Clin Exp Immunol, 2006. 145(1): p. 162-72.

103. Rantapaa-Dahlqvist, S., et al., *Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2007. 66(1): p. 121-3.
104. O'Hayre, M., et al., *Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment.* Biochem J, 2008. 409(3): p. 635-49.
105. Cochran, B.H., A.C. Reffel, and C.D. Stiles, *Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor.* Cell, 1983. 33(3): p. 939-47.
106. Rollins, B.J., et al., *The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein.* Mol Cell Biol, 1989. 9(11): p. 4687-95.
107. Robinson, E.A., et al., *Complete amino acid sequence of a human monocyte chemoattractant, a putative mediator of cellular immune reactions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(6): p. 1850-4.
108. Rollins, B.J. and M.E. Sunday, *Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells.* Mol Cell Biol, 1991. 11(6): p. 3125-31.
109. Sozzani, S., et al., *The signal transduction pathway involved in the migration induced by a monocyte chemotactic cytokine.* J Immunol, 1991. 147(7): p. 2215-21.
110. Zachariae, C.O., et al., *Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line.* J Exp Med, 1990. 171(6): p. 2177-82.
111. Lubkowski, J., et al., *The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions.* Nat Struct Biol, 1997. 4(1): p. 64-9.
112. Charo, I.F., et al., *Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(7): p. 2752-6.
113. Bartoli, C., et al., *CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies.* Acta Neuropathol, 2001. 102(4): p. 385-92.
114. Sanders, S.K., et al., *Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell.* J Immunol, 2000. 165(9): p. 4877-83.

115. Barbero, S., et al., *Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt*. *Cancer Res*, 2003. 63(8): p. 1969-74.
116. Bottazzi, B., et al., *A chemoattractant expressed in human sarcoma cells (tumor-derived chemotactic factor, TDCF) is identical to monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1/MCAF)*. *Int J Cancer*, 1990. 45(4): p. 795-7.
117. Sato, K., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma*. *J Neurosurg*, 1995. 82(5): p. 874-8.
118. Valkovic, T., et al., *Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma*. *Virchows Arch*, 2002. 440(6): p. 583-8.
119. Goede, V., et al., *Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1*. *Int J Cancer*, 1999. 82(5): p. 765-70.
120. Urban, J.L., et al., *Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(14): p. 5233-7.
121. Manome, Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene transduction: an effective tumor vaccine strategy for non-intracranial tumors*. *Cancer Immunol Immunother*, 1995. 41(4): p. 227-35.
122. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. 29(6): p. 313-26.
123. Coley, W.B., II. *Contribution to the Knowledge of Sarcoma*. *Ann Surg*, 1891. 14(3): p. 199-220.
124. Ehrlich, P., *Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* (Part1), 1909. 5: p. 273-90.
125. Rygaard, J. and C.O. Povlsen, *The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 1974. 82(1): p. 99-106.
126. Ikehara, S., et al., *Functional T cells in athymic nude mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(3): p. 886-8.
127. Smyth, M.J., et al., *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma*. *J Exp Med*, 2000. 192(5): p. 755-60.
128. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): p. 991-8.
129. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 329-60.

130. Shankaran, V., et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. *Nature*, 2001. 410(6832): p. 1107-11.
131. Pham, S.M., et al., *Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer*. *Ann Thorac Surg*, 1995. 60(6): p. 1623-6.
132. Sheil, A.G., *Cancer after transplantation*. *World J Surg*, 1986. 10(3): p. 389-96.
133. Ueda, R., et al., *Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing*. *J Exp Med*, 1979. 150(3): p. 564-79.
134. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2003. 348(3): p. 203-13.
135. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, *Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells*. *Nature*, 2003. 425(6957): p. 516-21.
136. Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(3): p. 776-81.
137. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 643-9.
138. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(13): p. 7556-61.
139. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(25): p. 16168-73.
140. Khong, H.T. and N.P. Restifo, *Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes*. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): p. 999-1005.
141. Mantovani, A., et al., *The origin and function of tumor-associated macrophages*. *Immunol Today*, 1992. 13(7): p. 265-70.
142. Matsushima, K., et al., *Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line*. *J Exp Med*, 1989. 169(4): p. 1485-90.
143. Mantovani, A., et al., *Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors*. *Semin Cancer Biol*, 2004. 14(3): p. 155-60.
144. Goerdt, S. and C.E. Orfanos, *Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells*. *Immunity*, 1999. 10(2): p. 137-42.
145. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(12): p. 953-64.

146. Allavena, P., et al., *The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance*. Immunol Rev, 2008. 222: p. 155-61.
147. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. 23(4): p. 344-6.
148. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. 55(3): p. 410-22.
149. Allavena, P., et al., *IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages*. Eur J Immunol, 1998. 28(1): p. 359-69.
150. Colombo, M.P. and A. Mantovani, *Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion*. Cancer Res, 2005. 65(20): p. 9113-6.
151. Tietze, L.F., et al., *Asymmetric synthesis and biological evaluation of glycosidic prodrugs for a selective cancer therapy*. ChemMedChem, 2008. 3(12): p. 1946-55.
152. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
153. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
154. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
155. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. PLoS Pathog, 2006. 2(2): p. e4.
156. Seliger, H.H. and E.W. Mc, *Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence*. Arch Biochem Biophys, 1960. 88: p. 136-41.
157. Yu, Y.A. and A.A. Szalay, *A Renilla luciferase-Aequorea GFP (ruc-gfp) fusion gene construct permits real-time detection of promoter activation by exogenously administered mifepristone in vivo*. Mol Genet Genomics, 2002. 268(2): p. 169-78.
158. Hirota, M., et al., *Distamycin A enhances the cytotoxicity of duocarmycin A and suppresses duocarmycin A-induced apoptosis in human lung carcinoma cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(5): p. 988-96.
159. Tada-Oikawa, S., et al., *Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis*. FEBS Lett, 1999. 442(1): p. 65-9.

160. Nicholson, D.W., et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis*. Nature, 1995. 376(6535): p. 37-43.
161. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol Ther, 2001. 92(1): p. 57-70.
162. Taylor, J.M. and M. Barry, *Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death*. Virology, 2006. 344(1): p. 139-50.
163. Erbs, P., et al., *Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy*. Cancer Gene Ther, 2008. 15(1): p. 18-28.
164. Stritzker, J., et al., *Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in live mice*. Int J Med Microbiol, 2007. 297(3): p. 151-62.
165. Fu, X. and X. Zhang, *Potent systemic antitumor activity from an oncolytic herpes simplex virus of syncytial phenotype*. Cancer Res, 2002. 62(8): p. 2306-12.
166. Heise, C.C., et al., *Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy*. Cancer Res, 1999. 59(11): p. 2623-8.
167. Gentshev, I., et al., *Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent*. Cancer Gene Ther, 2009. 16(4): p. 320-8.
168. Mellado, M., et al., *The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor*. J Immunol, 1998. 161(2): p. 805-13.
169. Valente, A.J., et al., *Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture*. Biochemistry, 1988. 27(11): p. 4162-8.
170. Holness, C.L. and D.L. Simmons, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. Blood, 1993. 81(6): p. 1607-13.
171. Haziot, A., et al., *The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage*. J Immunol, 1988. 141(2): p. 547-52.
172. Bernard, A. and L. Boumsell, *The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens*. Hum Immunol, 1984. 11(1): p. 1-10.
173. Worschech, A., et al., *Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy*. BMC Genomics, 2009. 10: p. 301.

174. Foloppe, J., et al., *Targeted delivery of a suicide gene to human colorectal tumors by a conditionally replicating vaccinia virus*. *Gene Ther*, 2008. 15(20): p. 1361-71.
175. Chalikonda, S., et al., *Oncolytic virotherapy for ovarian carcinomatosis using a replication-selective vaccinia virus armed with a yeast cytosine deaminase gene*. *Cancer Gene Ther*, 2008. 15(2): p. 115-25.
176. McCart, J.A., et al., *Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression*. *Gene Ther*, 2000. 7(14): p. 1217-23.
177. Puumalainen, A.M., et al., *Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses*. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(12): p. 1769-74.
178. Griscelli, F., et al., *Recombinant adenovirus shedding after intratumoral gene transfer in lung cancer patients*. *Gene Ther*, 2003. 10(5): p. 386-95.
179. Wrasidlo, W., Johnson DS, Boger DL, *Induction of endonucleolytic DNA fragmentation and apoptosis by the duocarmycins*. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 1994. 4(4): p. 631-636.
180. Sugiyama, H., et al., *Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14405-10.
181. Riedl, S.J. and G.S. Salvesen, *The apoptosome: signalling platform of cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(5): p. 405-13.
182. Wasilenko, S.T., et al., *Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(24): p. 14345-50.
183. Stewart, T.L., S.T. Wasilenko, and M. Barry, *Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis*. *J Virol*, 2005. 79(2): p. 1084-98.
184. Dummer, R., et al., *Adenovirus-mediated intralesional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas*. *Blood*, 2004. 104(6): p. 1631-8.
185. 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*, 2009. 8(1): p. 141-51.
186. Chen, N., et al., *A novel recombinant vaccinia virus expressing the human norepinephrine transporter retains oncolytic potential and facilitates deep-tissue imaging*. *Mol Med*, 2009. 15(5-6): p. 144-51.
187. Carr, J.A., et al., *Interleukin-12 exhibits potent antiviral activity in experimental herpesvirus infections*. *J Virol*, 1997. 71(10): p. 7799-803.

188. Loetscher, P., et al., *Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes*. FASEB J, 1994. 8(13): p. 1055-60.
189. Huang, S., et al., *Expression of the JE/MCP-1 gene suppresses metastatic potential in murine colon carcinoma cells*. Cancer Immunol Immunother, 1994. 39(4): p. 231-8.
190. Ueno, T., et al., *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000. 6(8): p. 3282-9.
191. Nakashima, E., et al., *Human MCAF gene transfer enhances the metastatic capacity of a mouse cachectic adenocarcinoma cell line in vivo*. Pharm Res, 1995. 12(11): p. 1598-604.
192. Smith, G.L., et al., *Vaccinia virus immune evasion*. Immunol Rev, 1997. 159: p. 137-54.
193. Seet, B.T., et al., *Molecular determinants for CC-chemokine recognition by a poxvirus CC-chemokine inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(16): p. 9008-13.
194. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science. 327(5966): p. 656-61.
195. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. 164(12): p. 6166-73.
196. Graves, D.T., et al., *Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells*. Science, 1989. 245(4925): p. 1490-3.
197. Murdoch, C., A. Giannoudis, and C.E. Lewis, *Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues*. Blood, 2004. 104(8): p. 2224-34.
198. Allavena, P., et al., *The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. 66(1): p. 1-9.
199. Biswas, S.K., et al., *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. Blood, 2006. 107(5): p. 2112-22.
200. Schoppmann, S.F., et al., *Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis*. Am J Pathol, 2002. 161(3): p. 947-56.
201. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. 25(12): p. 677-86.
202. Brigati, C., et al., *Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?* Clin Exp Metastasis, 2002. 19(3): p. 247-58.

203. **Tsung, K., et al., *Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection.* Cancer Res, 2002. 62(17): p. 5069-75.**
204. **Shen, W.H., et al., *Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor.* Cancer Res, 2002. 62(16): p. 4746-56.**
205. **Wright, P., et al., *Adenovirus-mediated TNF-alpha gene transfer induces significant tumor regression in mice.* Cancer Biother Radiopharm, 1999. 14(1): p. 49-57.**
206. **Stoelcker, B., et al., *Tumor necrosis factor induces tumor necrosis via tumor necrosis factor receptor type 1-expressing endothelial cells of the tumor vasculature.* Am J Pathol, 2000. 156(4): p. 1171-6.**
207. **Gansauge, S., et al., *Nitric oxide-induced apoptosis in human pancreatic carcinoma cell lines is associated with a G1-arrest and an increase of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1.* Cell Growth Differ, 1998. 9(8): p. 611-7.**
208. **Cao, G., et al., *Construction of retroviral vectors to induce strong hepatoma cell-specific expression of cytokine genes.* J Gastroenterol Hepatol, 1996. 11(11): p. 1053-61.**
209. **Fricker, J., *Hepatocellular carcinoma and p53 gene therapy.* Mol Med Today, 1996. 2(9): p. 361.**

7. Anhang**7.1 Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
CD14	cluster of differentiation 14
cDNA	complementary DNA
CL	cleaved
d	Tag/Tage
DC's	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dpi	days post infection
DTT	Dithiothreit
ECL	enhanced chemiluminescence Lösung
FBS	Fötales Bovines Serum
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FL	full-length
GDEPT	gene-directed prodrug enzyme therapy
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde/Stunden

Hank's BSS	Hank's gepufferte Salzlösung
hpi	hours post infection
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemoattractive proteine-1
MTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
OD	optische Dichte
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rVACV	rekombinantes Vaccinia-Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
TAMs	tumor-associated macrophages
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ÜN	über Nacht

7.2 Primersequenzen

β-aktin forward:	5'-GGA GAA AAT CTG GCA CCA CAC-3'
β-aktin reverse:	5'-CCA TCT CTT GCT CGA AGT CCA-3'
lacZ forward RT-PCR:	5'-GGC CAG TTG CGT GAC TAC C-3'
lacZ reverse RT-PCR:	5'-CAC GGC ATT AAA GTT GTT CTG CTT C-3
lacZ reverse real-time PCR:	5'-CCG ACA TCG CAG GCT TCT G-3'
gfp forward:	5'-GCG TGC AGT GCT TTT CCA G-3'
gfp reverse:	5'-AGG GCA GAC TGG GTG GAC-3'

7.3 Danksagung

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. Szalay, der mir ermöglicht hat diese interessante Aufgabenstellung in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten und mich darüber hinaus durch Bereitstellung eines Stipendiums während der gesamten Arbeit unterstützt hat. Besonders bedanken möchte ich mich für seine uneingeschränkte Hilfe und sein Verständnis für meine krankheits- und operationsbedingten Ausfälle während des letzten Jahres.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Grummt für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und seine konstruktive Kritik. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn. Prof. Dr. Krone für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Jochen, der mir von Anfang an zur Seite stand, mir durch viele Ratschläge Hilfe gewährt und mich mit vielen Ideen inspiriert hat. Auch an dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen mich für seine ausnahmslose Unterstützung während meiner Krankheit zu bedanken. Ohne ihn wäre vieles nicht möglich gewesen. Ich danke dir für die gemeinsame Zusammenarbeit! Ich danke dir für die Einführung in die Welt des wissenschaftlichen Publizierens. (p.s. Du bist ein Fuchs ☺).

Ich danke meinen Arbeitskollegen Rike, Julia, Viki, Simon, Ivo, Micha, Johanna, Jenny, Marion, Barbara, Stefi, Elisabeth, Dana, Ricky, Klaas, Lisa, Anna, Stephan, Duong, Andrea und Thu Ha. Danke Viki für die Hilfe bei den konfokalen Aufnahmen. Bei Johanna möchte ich mich für die Unterstützung, vor allem im Bereich Zellkultur bedanken. Bei Marion möchte ich mich für die sorgsame und zuverlässige Tierpflege bedanken. Ich danke Jenny für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit und für ihre Geduld bei der unendlichen Menge Plaque Assays ☺. Barbara, danke dass du die mysteriösen Striche aus meinem .doc gezaubert hast! Micha... ich weiß nicht wie dieses Dokument ohne deine Unterstützung bei der Formatierung dieser nervenden Seitenzahlen ausgesehen hätte... Danke! Ich danke euch allen für die nette Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft in stressigen Situationen, die angenehmen Gespräche und die aufbauenden Worte, wenn mal wieder alles nicht so toll war.

Ich danke Tony Yu, Qian Zhang, Nanhai Chen, Terry Trevino, Alexa Frentzen, Camha Hoang, Kimm Duffy, Jason Aquilar, Tom Hagood und allen Mitarbeitern der Firma Genelux.

Ich danke dem Forschungslabor A.Beilhack der Medizinischen Klinik und Poliklinik II (Universtitätsklinikum Würzburg) für die Zurverfügungstellung des transgenen FVB-Mausstamms.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Fischer und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie, besonders Frau Kießling für ihre organisatorische Unterstützung und Hilfe bei allen Problemen.

Schließlich möchte ich auch all den lieben Menschen danken, die mich außerhalb des Labors unterstützt haben. Ich danke meinem Dad, der mir vor allem in den letzten Wochen immer wieder gezeigt hat, dass man vieles erreichen kann, wenn man einen starken Willen hat. Ich danke ihm, dass er mich auf meinem Weg immer zu 100% unterstützt hat und für mich da war. Dad, du bist großartig!

Von ganzem Herzen danke ich auch meinem Freund Carlo für die Liebe und Kraft die er mir in den letzten Jahren gegeben hat. Ich danke ihm, dass er immer an meiner Seite war um mich zu stützen. You mean the world to me!

Ich danke meiner Mom für die IKEA-Ablenkungsausflüge und dafür dass sie und meine ganze Familie immer für mich da waren um mir Rückhalt zu geben. Meiner Schwester Lele danke ich für die Auszeiten und die Fürsorge, ich danke ihr für den kleinen Elijah, der mir auch in den schwierigsten Situationen ein Lächeln aufs Gesicht gezaubert hat. Ich danke meiner Mutt-Monika für die einfach unbeschreibliche Unterstützung und die vielen angenehmen gemeinsamen Stunden die wir miteinander verbracht haben... natürlich auch für das unbeschreiblich gute Essen, dass wir währenddessen genießen konnten ☺. Ich danke alle meinen Freunden, vor allem Tina, die immer für mich da war und die ich nie wieder in meinem Leben missen möchte. Danke Anna für die unbezahlbare Freundschaft, auch wenn der Kontakt mal unter dem Zeitmangel leiden musste. Ich danke Ruth, die mir auch als Woronyn nicht mehr da war immer die Möglichkeit geschaffen hat für ein paar Stunden den Kopf frei zu bekommen. Und ich danke allen die ich namentlich nicht aufzählen konnte um nicht noch eine dritte Seite anfangen zu müssen.

Danke, danke und danke ☺

7.4 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Würzburg, den

.....

Carolin Seubert

9. Publikationen

Raab V, Horbaschek C, Chen N, Zhang Q, Yu YA, Seubert C, Geissinger U, Worschech A, Tietze CJ, Zellner E, Le TH, Grummt F, Stritzker J, Szalay AA. Four-color labeling of cell culture and tumors of live mice upon infection with: GFP-Ruc and RFP-CBG99 expressing Vaccinia virus strains. 2007

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

Stritzker J, Weibel S, Seubert C, Götz A, Tresch A, van Rooijen A, Oelschlaeger TA, Hill PJ, Gentschev I, Szalay AA. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility.

Int J Med Microbiol. in press

Seubert C, and Stritzker J, Heß M, Donat U, Sturm J, Chen N, Mr. Von Hof M, Krewer B, Tietze L, Gentschev I, Szalay AA. Enhanced tumor therapy using vaccinia virus strain GLV-1h68 in combination with a beta-galactosidase activatable prodrug seco-analog of duocarmycin SA

Cancer Res. In review