

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



**Detektion und Therapie von Metastasen des humanen
Prostatakarzinoms durch das onkolytische Vaccinia-Virus
GLV-1h68**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Ulrike Donat

aus Rostock

Würzburg, Januar 2011

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

Prof. Dr. T. Dandekar

Erstgutachter : _____

Prof. Dr. A. A. Szalay

Zweitgutachter: _____

Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	7
1.1 Das Prostatakarzinom	7
1.2 Entstehung und Bedeutung von Lymphknotenmetastasen	9
1.2.1 Das Lymphsystem.....	9
1.2.2 Lymphknotenmetastasierung	12
1.2.3 Der prämetastatische Zustand	14
1.2.4 Zusammenhang von Lymphgefäßdichte, lymphatischen und hämatogenen Metastasen	14
1.3 Die Rolle von Tumorstammzellen bei der Metastasierung	16
1.4 Therapeutische Ansätze zur Bekämpfung metastasierender Karzinome	18
1.5 Onkolytische Virustherapie.....	19
1.6 Das Vaccinia-Virus.....	20
1.6.1 Vaccinia-Virus-Taxonomie.....	20
1.6.2 Morphologie von Vaccinia-Viren	21
1.6.3 Replikation von Vaccinia-Viren.....	21
1.6.4 Rekombinantes Vaccinia-Virus GLV-1h68.....	23
1.7 Ziele der Arbeit.....	25
2 Material	26
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	26
2.2 Puffer und Lösungen	28
2.3 Verwendete Kits	31
2.4 Zelllinien und Zellkulturmedien	31
2.4.1 Zelllinien.....	31
2.4.2 Zellkulturmedien.....	31
2.5 Synthetische Oligonukleotide	32
2.6 Antikörper.....	33

Inhaltsverzeichnis

2.7	Rekombinantes Viruskonstrukt GLV-1h68.....	34
2.8	Versuchstiere	34
2.9	Geräte und sonstige Materialien.....	35
2.10	Verwendete Software	36
3	Methoden	37
3.1	Zellbiologische Methoden.....	37
3.1.1	Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzelllinien	37
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer	38
3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
3.1.4	Generierung von PC-3-RFP-Zellen durch lentivirale Transduktion	38
3.2	Mausexperimentelle Methoden	39
3.2.1	Implantation von PC-3- und PC-3-RFP-Zellen.....	39
3.2.2	Injektion von GLV-1h68.....	40
3.2.3	Narkose.....	40
3.2.4	Visualisierung von PC-3-Tumoren und Metastasen.....	40
3.2.4.1	Visualisierung mit Hilfe des Fluoreszenz-Imaging	40
3.2.4.2	Visualisierung mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT)	41
3.2.5	Entnahme von Tumoren, Metastasen und Organen	41
3.3	Isolierung und Analyse von RNA aus Tumoren, Metastasen und Lungen	42
3.3.1	RNA-Isolierung aus humanen und murinen Zellen	42
3.3.2	RNA-Isolierung aus Tumor- und Lymphknotengewebe	43
3.3.3	Analyse der RNA im Agarosegel	43
3.3.4	DNA-Verdau und RNA-Konzentrationsbestimmung	44
3.3.5	cDNA-Synthese.....	44
3.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.3.7	Analyse des PCR-Produkts im Agarosegel	45
3.4	Isolierung und Analyse von Proteinen aus Tumoren und Metastasen	46
3.4.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	46
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	46

Inhaltsverzeichnis

3.4.3	Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen (SDS-PAGE)	47
3.4.4	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran durch Western-Blot	48
3.4.5	Immundetektion mittels ECL.....	48
3.5	Analyse des Virustiters in Tumoren und Metastasen	49
3.6	Analyse von Tumoren und Metastasen auf histologischer Ebene.....	50
3.6.1	Auswertung der Fluoreszenzintensität.....	50
3.6.2	Auswertung der Anzahl von Gefäßstrukturen	51
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Vergrößerte Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen	52
4.2	Zeitlicher Verlauf der Vergrößerung von Lymphknoten.....	53
4.3	Nachweis humaner PC-3-Zellen in vergrößerten Lymphknoten.....	54
4.4	Visualisierung von PC-3-Zellen	56
4.4.1	Generierung von PC-3-RFP-Zellen	56
4.4.2	Implantation von PC-3-RFP-Zellen.....	57
4.4.3	Visualisierung unterschiedlicher Metastasierungsstadien.....	58
4.4.4	Detektion von PC-3-RFP-Metastasen <i>prä mortem</i> und <i>post mortem</i>	60
4.4.5	Migration von PC-3-RFP-Zellen zwischen Metastasen.....	60
4.4.6	Migration von PC-3-RFP-Zellen in Lymphknoten.....	62
4.4.7	Metastasenbildung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	63
4.4.8	Visualisierung hämatogener Metastasen.....	64
4.4.9	Bildgebung von PC-3-Tumor und -Metastasen in der lebenden Maus durch MRT	65
4.5	Analyse der Migration von PC-3-RFP-Zellen	66
4.6	Vorhandensein von Lymphgefäßen in PC-3-Tumoren.....	67
4.7	Effekt von GLV-1h68 auf PC-3-Metastasen.....	68
4.7.1	Kolonisierung von PC-3-Metastasen und migrierenden PC-3-Zellen durch GLV-1h68.....	68
4.7.2	Einfluss von GLV-1h68 auf PC-3-Lymphknotenmetastasen	70
4.7.3	Der Einfluss von GLV-1h68 auf hämatogene Metastasen	73

Inhaltsverzeichnis

4.7.4	Untersuchung des Effekts verschiedener Injektionsarten von GLV-1h68 auf die Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen und Tumoren.....	74
4.7.5	Untersuchung der Kolonisierung von PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen nach i.v. Injektion von GLV-1h68	77
4.7.6	Kolonisierung verschiedener Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68	80
4.8	Ursache der präferentiellen Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen	81
4.8.1	Untersuchung der Amplifikation von GLV-1h68 in lymphatischem Gewebe.....	81
4.8.1.1	GLV-1h68-Injektion in nicht-Tumor-tragende Mäuse	81
4.8.1.2	Untersuchung des lymphatischen Gewebes in Lymphknotenmetastasen	83
4.8.2	Nekrotische Zonen in Tumoren und Metastasen	84
4.8.3	Untersuchung von Blutgefäßen in PC-3-Tumoren und -Metastasen.....	85
4.8.3.1	Anzahl von Blutgefäßen und CD31-Konzentration in Tumoren und Lymphknotenmetastasen.....	85
4.8.3.2	Analyse der CD31-Expression auf Proteinebene	87
4.8.4	Anzahl und LYVE-1-Konzentration der Lymphgefäße in PC-3-Tumoren und -Metastasen	88
5	Diskussion	91
5.1	Das Metastasenmodell der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3	91
5.2	Ausbreitung von PC-3-Zellen über das Lymphsystem	93
5.3	Zusammenhang zwischen lymphatischer und hämatogener Metastasierung von PC-3-Zellen	95
5.4	Prämetastatischer Zustand von Lymphknoten.....	96
5.5	Einfluss von GLV-1h68 auf PC-3-Metastasen	96
5.6	Besonderheiten der Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68.....	98
5.6.1	Mögliche Gründe für die präferentielle Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen	98
5.6.2	Einfluss von GLV-1h68 auf Blut- und Lymphgefäßdichte von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen	99
6	Literaturverzeichnis	101

Inhaltsverzeichnis

7	Anhang.....	116
7.1	Abkürzungsverzeichnis	116
7.2	Danksagung.....	119
7.3	Eidesstaatliche Erklärung.....	121
8	Lebenslauf	122
9	Publikationen.....	123
9.1	Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen	123
9.2	Weitere Publikationen	123

Zusammenfassung

Zurzeit sterben jährlich ca. 11.000 Männer in Deutschland am Prostatakarzinom. Damit stellt dies die zweithäufigste Krebstodesursache von Männern dar. Da das Prostatakarzinom häufig asymptomatisch verläuft, wird die Erkrankung oftmals erst so spät erkannt, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Metastasierung stattgefunden hat. Durch metastasierende Prostatakarzinomzellen werden meist Lymphknoten, Knochen und Lungen befallen. Es sind zwei unterschiedliche Verbreitungsarten von metastasierenden Tumorzellen beschrieben. Zum einen kann eine Migration über Lymphgefäße erfolgen, ein Prozess der als lymphatische Metastasierung bezeichnet wird. Zum anderen können Tumorzellen über das Blutsystem im Körper zirkulieren: die sogenannte hämatogene Metastasierung.

In dieser Arbeit wurde die lymphatische Metastasierung der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 im Detail analysiert und Teilaspekte der hämatogenen Verteilung untersucht. Ausgangspunkt der Untersuchungen bildete die Vergrößerung lumbaler und renaler Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 60 Tage nach der Implantation von PC-3-Zellen. Es wurde daraufhin der zeitliche Verlauf der Vergrößerung untersucht und festgestellt, dass sowohl das Volumen als auch die Anzahl vergrößerter Lymphknoten von Woche zu Woche nach Implantation der PC-3-Tumore zunehmen. Anschließend wurden alle vergrößerten Lymphknoten bezüglich des Vorhandenseins von metastasierenden humanen PC-3-Zellen in den Mäusen untersucht. Dies geschah mit Hilfe einer RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin. Sechs Wochen nach Implantation konnten in 90 % der vergrößerten Lymphknoten PC-3-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde durch lentivirale Transduktion das Gen für das rot fluoreszierende Protein (RFP) in die PC-3-Zellen inseriert, wodurch eine Visualisierung dieser Zellen in der Maus ermöglicht wurde. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnten metastasierende PC-3-RFP-Zellen in lumbalen und renalen Lymphknoten PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse nachgewiesen werden. Ebenso konnte mittels RFP gezeigt werden, dass die Lymphknotenmetastasierung in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-RFP-Tumors erfolgt. Es kam zur Metastasierung jener Lymphknoten, in deren Einzugsgebiet sich der PC-3-Tumor befand. Es wurde eine PC-3-RFP-Zellmigration zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen nachgewiesen und bei immunhistologischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass PC-3-RFP-Zellen tatsächlich in lymphatischen Bahnen zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen migrieren. Außerdem wurde gezeigt, dass es von Woche zu Woche nach Implantation von PC-3-Zellen zu einer Zunahme der Anzahl von Lymphgefäßen in PC-3-Tumoren kommt. Die Zunahme der Lymphgefäßdichte korrelierte hierbei positiv mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen.

Es konnten weiterhin neben Lymphknotenmetastasen hämatogene Mikrometastasen in den Lungen PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse beobachtet werden.

Da die Haupttodesursache von Prostatakarzinompatienten in der Bildung von Metastasen liegt, ist es von herausragender Bedeutung eine effektive Therapie gegen lymphatische und hämatogene Metastasen zu entwickeln. Aus diesem Grund erlangt die onkolytische Virustherapie große Bedeutung. Deshalb wurde als zweiter Aspekt in dieser Arbeit der Einfluss des onkolytischen Vaccinia-Virus GLV-1h68 auf den Prozess der PC-3-Zellmetastasierung untersucht.

Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass GLV-1h68 in der Lage ist, erfolgreich sowohl migrierende PC-3-Zellen als auch metastasierende PC-3-Zellen in Lymphknoten zu kolonisieren. In der Folge wurde deshalb ein möglicher Metastasen-inhibierender Effekt von GLV-1h68 untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass GLV-1h68 drei Wochen nach intravenöser Injektion eine Abnahme des Volumens und der Anzahl vergrößerter Lymphknoten verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass GLV-1h68 eine signifikante Reduktion der Anzahl der für PC-3-Zellen positiven Lymphknoten bewirkt. Des Weiteren konnte ein inhibierender Effekt von GLV-1h68 auf die im Blut zirkulierenden PC-3-Zellen und auf hämatogene Metastasen in den Lungen beobachtet werden. Durch intravenöse Injektion von GLV-1h68 in PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einer präferentiellen Virus-Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den Tumoren kommt. Dabei wurden zu frühen Zeitpunkten nach Injektion die renalen Lymphknotenmetastasen in höherem Maße als die lumbalen durch GLV-1h68 kolonisiert vorgefunden. Auch nach intraperitonealer und intratumoraler Injektion von GLV-1h68 konnte eine präferentielle Virus-Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen gezeigt werden.

Zur Klärung möglicher Ursachen dieser präferentiellen Kolonisierung wurden weitere Experimente durchgeführt. So wurde u.a. geprüft, ob der lymphatische Ursprung der Metastasen eine Rolle für die Kolonisierung durch GLV-1h68 spielt. Um zu analysieren, ob sich GLV-1h68 vermehrt im Lymphsystem der Mäuse anreichert, wurde in nicht-Tumor-tragenden Mäusen GLV-1h68 intravenös injiziert und der Virustiter in den Lymphknoten im zeitlichen Verlauf bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass keine Anreicherung von GLV-1h68 in den Lymphknoten erfolgt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Invasion von PC-3-RFP-Zellen in lumbale und renale Lymphknoten zu einer Verdrängung des lymphatischen Gewebes kommt. Es ist daher nicht anzunehmen, dass die präferentielle Kolonisierung durch einen lymphatischen Ursprung der Metastasen verursacht wird.

Außerdem wurde beobachtet, dass PC-3-Tumore im Vergleich zu Lymphknotenmetastasen einen höheren Anteil an nekrotischen Arealen aufwiesen. Da die Amplifikation von GLV-1h68

in nekrotischen Geweben erschwert ist, dürfte durch den geringeren Anteil an nekrotischen Arealen in Lymphknotenmetastasen die GLV-1h68-Amplifikation in diesen begünstigt sein. Dies könnte zur präferentiellen Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 beitragen.

Darüber hinaus wurden die Lymph- und Blutgefäße von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen analysiert. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Anzahl von Lymph- oder Blutgefäßen zwischen Tumoren und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass es sieben Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 zu einer signifikanten Abnahme von beiden Gefäßarten kam. Das könnte die Reduktion der Anzahl der Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 erklären, da sowohl die Versorgung mit Nährstoffen als auch mit Sauerstoff durch Verminderung der Blutgefäßsystems herabgesetzt wird. Ebenso wird die Migration von PC-3-Zellen durch Reduktion der Lymphgefäße inhibiert.

Es wurde in dieser Arbeit somit gezeigt, dass GLV-1h68 in der Lage ist, sowohl lymphatische als auch hämatogene Metastasen der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 erfolgreich zu eliminieren. Folglich dürften onkolytische Vaccinia-Viren ein vielversprechendes Therapeutikum für die Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms darstellen. Um sicherzustellen, dass die Metastasen-eliminierende Wirkung von GLV-1h68 nicht auf PC-3 beschränkt ist, ist es wichtig die Virus-Wirkung auf weitere metastasierende Karzinommodelle zu untersuchen.

Summary

Every year about 11,000 men in Germany are dying because of prostate carcinoma. Thus, prostate carcinoma represents the second leading cause of cancer related death in men. Since the prostate carcinoma usually proceeds asymptotically the diagnosis is often made when metastases have already formed. Human prostate cancer usually spreads to lymph nodes, bones and lungs. There are two ways for tumor cells to migrate to other parts of the body: through lymphatic vessels, a process called lymphatic metastasis, or through the blood system, the hematogenous metastasis.

In this thesis the lymphatic metastasis of the human prostate carcinoma cell line PC-3 was analyzed in detail while the hematogenous spread was only partially investigated. The initial point of these investigations was the enlargement of lumbar und renal lymph nodes in PC-3 tumor-bearing mice 60 days post implantation of PC-3 cells. Thereafter the time course of the enlargement was assessed. It turned out that the volume as well as the number of enlarged lymph nodes increased from week to week post implantation of PC-3 tumors. Subsequently, all enlarged lymph nodes were tested for the presence of human PC-3 cells in mice. This was done with the help of an RT-PCR using primers for human β -actin. Six weeks post implantation 90% of all enlarged lymph nodes were positive for PC-3 cells. Furthermore, the gene of the red fluorescent protein (RFP) was inserted into PC-3 cells via lentiviral transduction. By using fluorescence microscopy PC-3-RFP cells could be detected in lumbar and renal lymph nodes of PC-3-RFP tumor-bearing mice. With the help of RFP it could also be shown that lymph node metastases depend on the PC-3 tumor location. Metastases occurred in draining lymph nodes next to the tumor. Moreover, a PC-3-RFP cell migration between lumbar and renal lymph node metastases was shown. In the following immunohistochemical analysis it was proven that PC-3-RFP cells are indeed migrating in lymphatic vessels between these lumbar and renal lymph node metastases. Additionally, an increasing number of lymphatic vessels in PC-3 tumors was shown from week to week post implantation of PC-3 cells. This enhancement positively correlates with the formation of lymph node metastases.

Besides lymph node metastases hematogenous micro metastases in the lungs of PC-3-RFP-tumor-bearing mice could be detected, too.

The major cause of death in prostate cancer patients is the formation of metastases. Therefore, the development of effective therapies for lymphatic and hematogenous metastases is of major importance. One of the most promising novel cancer therapies for humans is oncolytic virotherapy. According to that, the second aspect of this thesis was to

investigate the influence of the oncolytic vaccinia virus GLV-1h68 on the process of PC-3 cell metastasis.

Thereby, it was initially shown that GLV-1h68 can efficiently colonize both migrating PC-3 cells and metastasized PC-3 cells in the lymph nodes. Ensuing, a possible metastasis inhibiting effect of GLV-1h68 was analyzed. It was shown that GLV-1h68 reduces the volume and the number of enlarged lymph nodes in PC-3 tumor-bearing mice three weeks after intravenous injection. It could also be shown that GLV-1h68 significantly reduces the number of lymph nodes that are positive for PC-3 cells. Additionally, GLV-1h68 has an inhibiting effect on PC-3 cells that are circulating in the blood of PC-3 tumor-bearing mice and on hematogenous metastases of the lungs. In analysing the intravenous injection of GLV-1h68 in PC-3-RFP tumor-bearing mice it turned out that there is a preferential viral colonisation of lymph node metastases compared to the tumors. At early points after injection renal lymph node metastases were colonized more thoroughly by GLV-1h68 than lumbar ones. The same preferential viral colonisation of lymph node metastases was shown upon intraperitoneal und intratumoral viral injection.

To elucidate the cause of preferential colonisation, further experiments were performed. At first we studied whether or not the lymphatic origin of lymph node metastases plays a role for the colonisation by GLV-1h68. The virus was injected into non-tumor-bearing mice to analyze if GLV-1h68 accumulates predominately in the lymphatic system. However, no such accumulation was observed. Furthermore, there was a displacement of lymphatic tissue by invasion of PC-3 cells. Therefore, it is assumed that the preferential colonisation of lymph nodes is not caused by a lymphatic origin of the metastases.

Moreover, there was a higher amount of necrotic tissues in PC-3 tumors compared to lymph node metastases. Since the replication of GLV-1h68 is abolished in necrotic tissue, the reduced amount of necrotic areas in lymph node metastases could facilitate the GLV-1h68 replication. This effect could contribute to the preferential colonization of lymph node metastases by GLV-1h68.

Further, lymphatic and blood vessels of PC-3 tumors and lymph node metastases were analyzed. No differences of lymphatic and blood vessel density could be found between tumor and lymph node metastases. However, there was a significant reduction of lymphatic and blood vessels seven days post intravenous injection of GLV-1h68. This could explain the effect of GLV-1h68 on the reduction of the number of lymph node metastases, because the supply of nutrients as well as of oxygen is reduced due to the decrease of blood vessel density. Also, migration of PC-3 cells is minimized upon the reduction of lymphatic vessels.

Summary

Thus, it was shown that GLV-1h68 has a great potential in eliminating lymphatic and hematogenous metastases of the human prostate carcinoma PC-3. Therefore, oncolytic vaccinia viruses apparently represent promising therapeutic agents for the treatment of advanced human prostate carcinoma.

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist eine bösartige Veränderung der Prostata. Bei dieser Krebsart werden langsam wachsende von aggressiven, rasch metastasierenden Verlaufsformen unterschieden. Da das Prostatakarzinom im frühen Stadium der Erkrankung meist keine Symptome verursacht, wird die Erkrankung oft erst so spät erkannt, dass sich bei etwa einem Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen gebildet haben. Befallen sind meist Lymphknoten, Knochen oder die Lunge. Mit dem Auftreten der Metastasen wird die Behandlung erheblich erschwert und im fortgeschrittenen Stadium ist eine Heilung zurzeit meist nicht mehr möglich. Die Anzahl von Neuerkrankungen ist in den letzten Jahren stetig gestiegen. Mittlerweile ist es das am häufigsten vorkommende Karzinom des Mannes in Deutschland. Das Prostatakarzinom macht 20 % aller Krebsneuerkrankungen des Mannes aus, gefolgt von Darm- und Lungenkrebs mit ca. 16 % bzw. 15 %. Jährlich treten nach einer Schätzung des Robert Koch-Instituts knapp 49.000 neue Fälle an Prostatakrebs auf. Die Inzidenz beträgt 120 pro 100.000 Männer über alle Altersklassen hinweg. Bei den über 75-Jährigen steigt die Erkrankungsrate auf über 800 Fälle pro 100.000 an (Abb. 1). 10 % aller Krebstodesfälle bei Männern sind auf das Prostatakarzinom zurückzuführen. Es liegt damit nach Lungen- und Darmkrebs an dritter Stelle. Jährlich sterben 11.000 Männer an dieser Krebsart.

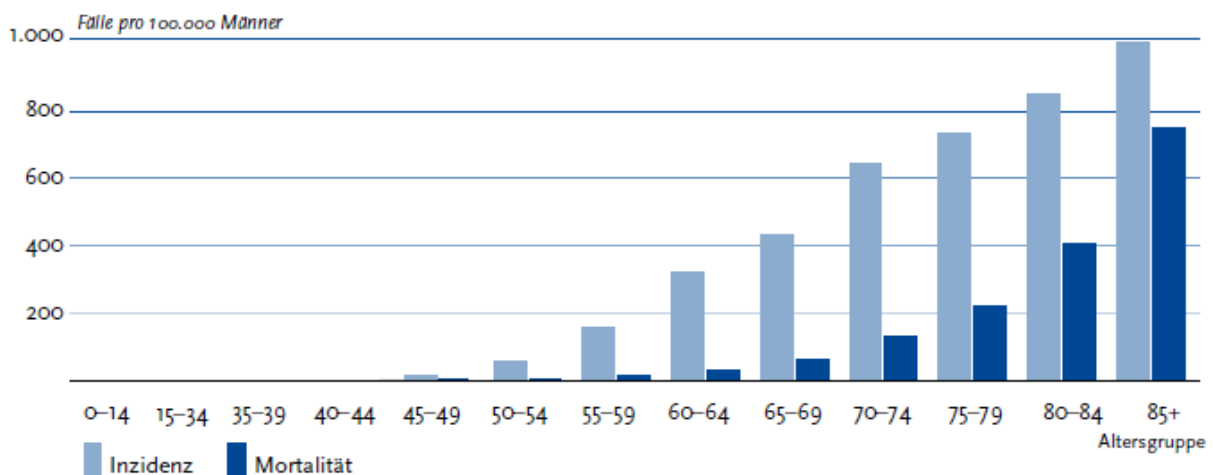


Abbildung 1: Altersspezifische Erkrankungsrate (Inzidenz) und Sterblichkeit (Mortalität) für Prostatakrebs in Deutschland 2002 [1]. Die Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms nimmt mit steigendem Alter stetig zu.

Risikofaktoren für das Prostatakarzinom sind ansteigendes Alter, Ernährung, Lebensweise und eine familiäre Disposition. Mehr als 90 % der Erkrankten sind älter als 60 Jahre.

Epidemiologische Arbeiten zum Prostatakarzinom zeigten, dass in Asien die Inzidenz deutlich geringer ist als in Mittel- und Nordeuropa oder Nordamerika. Bei Asiaten, die in die USA ausgewandert sind, wird in der zweiten Generation in der gleichen Häufigkeit ein Prostatakarzinom nachgewiesen wie bei amerikanischen Männern. Da bisher keine genetischen oder hormonellen Unterschiede beschrieben worden sind, wird dieses Phänomen derzeit am ehesten den Ernährungsangewohnheiten zugeordnet. Insbesondere wird hier die Rolle tierischer Fette diskutiert [2]. Bei 9 % der diagnostizierten Prostatakarzinome liegt eine genetische Disposition vor. Verglichen mit der Normalbevölkerung ist das Risiko verdoppelt, wenn ein Verwandter ersten Grades oder zwei Verwandte vor dem 55. Lebensjahr erkrankt sind. Eine eindeutige Diagnose des Prostatakarzinoms kann nur durch die Entnahme von Gewebeproben erfolgen. Am häufigsten wird die Prostatabiopsie ultraschallgesteuert über den Mastdarm durchgeführt.

Das Prostatakarzinom wird in verschiedene Stadien eingeteilt, welche sich vor allem nach der Ausbreitung des Tumors bei Diagnosestellung richten. Die Stadieneinteilung der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) hat weltweit die größte Akzeptanz erlangt. Zur Klassifizierung wird wie bei allen Krebserkrankungen die Einteilung nach drei Kriterien vorgenommen: das lokale Ausbreitungsstadium, die Lymphknotenmetastasierung und die Bildung von Fernmetastasen. Die T-Stadien beschreiben das lokale Ausbreitungsstadium des Prostatakarzinoms. Es wird darin unterschieden, ob der Tumor noch auf die Prostata beschränkt ist oder ob schon Nachbargewebe betroffen sind. Je höher das T-Stadium, desto schlechter die Prognose. T1-3 Stadien besagen meist, dass der Tumor noch auf die Prostata begrenzt ist, während bei einem T4-Stadium bereits Nachbargewebe befallen sind. Die N-Stadien beschreiben die Metastasierung des Tumors in örtliche Lymphknoten und besagen sowohl wie viele Lymphknotenmetastasen vorliegen als auch welche Größe sie haben. Es wird unterschieden, ob es zur Metastasierung in örtlichen Lymphknoten kam, oder bereits entfernte Lymphknotenregionen befallen wurden. Bei einem fortgeschrittenen Lymphknotenbefall ist meist keine Heilung mehr möglich. Die M-Stadien beschreiben die Fernmetastasierung, also die Metastasierung des Prostatakarzinoms über den Blutkreislauf in entfernt gelegene Organe, wie Leber oder Lungen. Liegen Fernmetastasen vor, ist eine Heilung in den meisten Fällen nicht mehr möglich. In Abhängigkeit davon, welches Organ betroffen ist, kann der Todeszeitpunkt nur noch hinausgezögert werden [3].

Die Therapie eines Prostatakarzinoms erfolgt individuell verschieden, je nach Stadium des Prostatakarzinoms, Alter, allgemeinem Gesundheitszustand und etwaigen Begleiterkrankungen im Hinblick auf die Lebenserwartung des Patienten. Wird ein Prostatakarzinom rechtzeitig erkannt, d.h., ist es auf die Prostata begrenzt und es wurden noch keine Metastasen gebildet, ist die Therapie oft erfolgsversprechend. Zur Option stehen dann die

chirurgische Entfernung des Prostatakarzinoms oder eine Bestrahlungstherapie. Die Indikation zur radikalen Prostatektomie wird gestellt, wenn die präoperativen Befunde ein organbegrenztetes Tumorwachstum wahrscheinlich erscheinen lassen und eine mindestens zehnjährige Lebenserwartung besteht. Einige Karzinome wachsen so langsam, dass eine Entfernung in Anbetracht der Lebenserwartung des Erkrankten möglicherweise mehr schadet als nutzt. Bei der Prostatektomie wird die Prostata mit Samenblasen und Samenleiter komplett entfernt und die Harnblase mit der Harnröhre wieder verbunden. Eine Bestrahlung des Prostatakarzinoms kann von außen oder über Ultraschall gesteuertes Einbringen von strahlendem Material erfolgen. Bei beiden Verfahren bestehen gute Heilungschancen. Sowohl die Prostatektomie als auch die Bestrahlungstherapie können starke Nebenwirkungen mit sich bringen, dazu gehören Impotenz, Harninkontinenz und Darmprobleme. Im Falle eines fortgeschrittenen, nicht mehr organbegrenzten Prostatakarzinoms erfolgt die Therapie meist nur noch palliativ. Eine Behandlung kann in diesem Fall mit Hormonentzugstherapie oder Chemotherapie erfolgen. Die Hormonentzugstherapie basiert auf dem Befund, dass das Prostatakarzinom ein testosteronabhängig wachsender Tumor ist. Durch den Entzug von Testosteron wird eine Rückbildung oder eine Wachstumsverlangsamung des Tumors von zwei bis vier Jahren bewirkt. Dieser Therapieansatz ist nicht heilend. Spricht ein Prostatakarzinom nicht mehr auf einen Hormonentzug an, so stellt sich die Indikation einer Chemotherapie [1]. Die Behandlung des Prostatakarzinoms unterliegt intensiver Forschung, es werden neue Behandlungsmethoden entwickelt und derzeit verwendete Methoden verbessert. Von zentraler Bedeutung ist die Entwicklung einer effektiven Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms, die auch Patienten nach Auftreten von lymphatischen und hämatogenen Metastasen heilen oder die Bildung dieser verhindern kann.

1.2 Entstehung und Bedeutung von Lymphknotenmetastasen

1.2.1 Das Lymphsystem

Das lymphatische System ist ein Teil des Immunsystems, das sich aus lymphatischen Organen und dem feinwandigen Lymphgefäßsystem zusammensetzt. In ihm wird Lymphflüssigkeit gebildet und transportiert. Man unterscheidet primäre und sekundäre lymphatische Organe. Zu den primären lymphatischen Organen gehören der Thymus und das Knochenmark, in ihnen verläuft die Bildung und Reifung der T- und B-Lymphozyten. In den sekundären lymphatischen Organen finden der Antigenkontakt und die klonale Vermehrung von Lymphozyten statt. Zu ihnen zählen Lymphknoten, Tonsillen, Milz und mukosaassoziierte Lymphfollikel im Magen-Darmtrakt (MALT). Das Lymphgefäßsystem

besteht aus einem Netzwerk feinwandiger Gefäße, welches extravasierte Gewebeflüssigkeit, Proteine und Zellen aus peripheren Geweben sammelt, in den zwischengeschalteten Lymphknoten filtert und schließlich in den Blutkreislauf über den *Ductus thoracicus* zurückführt. Der *Ductus thoracicus*, ist das größte und bedeutendste Lymphgefäß. Er tritt mit der Aorta durch das Zwerchfell, verläuft im Brustraum zwischen Aorta und Wirbelsäule und mündet dann im linken Venenwinkel in die Blutbahn. Dadurch stellt der *Ductus thoracicus* die Hauptverbindung zwischen Lymph- und Blutsystem dar [4-6].

Als regionäre Lymphknoten bezeichnet man die Lymphknoten, welche für ein Organ oder eine bestimmte Körperregion als erste Filterstation dienen. Aus mehreren regionären Lymphknoten fließt die Lymphe über Lymphgefäße in einen Sammellymphknoten. Häufig werden regionäre Lymphknoten bei Erkrankung ihres Einzugsgebiets in Mitleidenschaft gezogen. Der Mensch besitzt circa 600-700 Lymphknoten. Große Ansammlungen von Lymphknoten finden sich z.B. im Hals, in der Leistengegend, in der Achselhöhle sowie neben der Aorta [7].

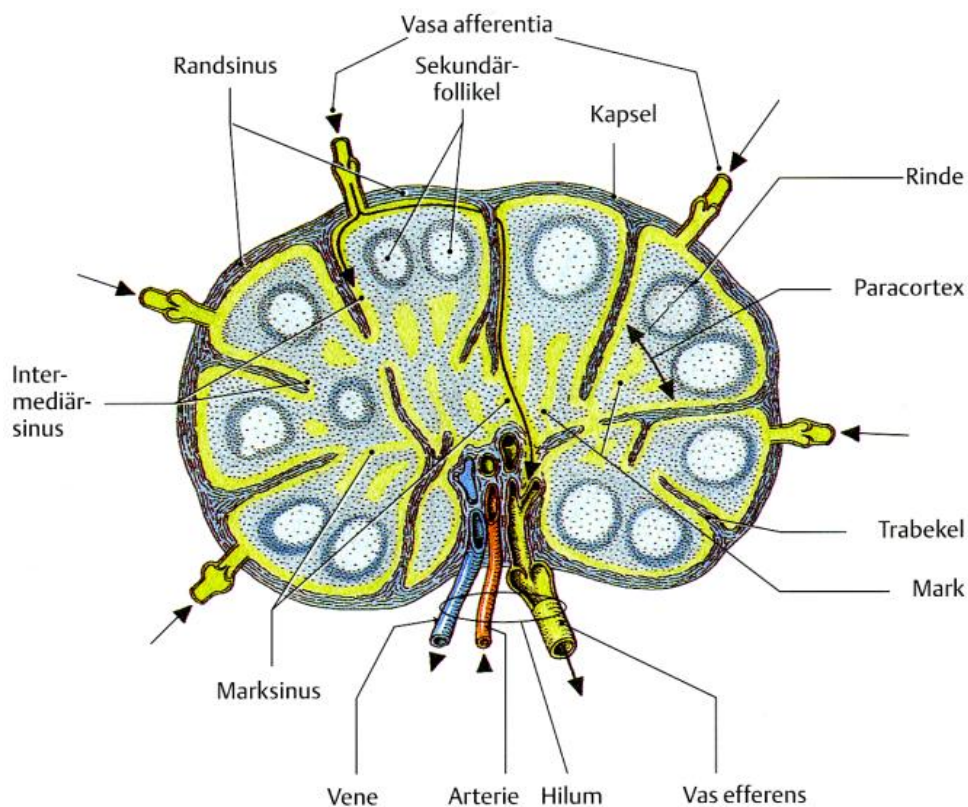


Abbildung 2: Aufbau eines Lymphknotens und der Durchlauf von Lymphe [8]. Über zuführende Lymphgefäße (*Vasa afferentia*) fließt die Lymphe in den Lymphknoten. Dort gelangt sie in den Randsinus und weiter durch den radiär im Paracortex verlaufenden Intermediärsinus zum Marksinus. Am Hilum verlässt die Lymphe über das abführende Lymphgefäß (*Vas efferens*) den Lymphknoten. Des Weiteren tritt am Hilum eine Arterie ein und eine Vene aus den Lymphknoten.

Lymphknoten (Abb. 2) besitzen eine Bindegewebskapsel, von welcher sich Bindegewebssepten, sogenannte Trabekel, in das Innere ziehen und den Lymphknoten in kleine Kompartimente untergliedern. Das Hilum ist der Bereich eines Lymphknotens, an dem Blutgefäße ein- und austreten und meist ein abführendes Lymphgefäß (*Vas efferens*) den Lymphknoten verlässt. Auf der dem Hilum gegenüberliegenden Seite treten Lymphgefäße durch die Organkapsel in den Lymphknoten ein (*Vasa afferentia*). Die ankommende Lymphe gelangt so durch die Systeme von Lymphkanälen, welche jeweils als Sinus bezeichnet werden. Nach dem Durchfluss durch dieses Sinussystem verlässt die Lymphe den Lymphknoten am Hilum durch das efferente Gefäß. Der Lymphknoten gliedert sich in eine dunkel erscheinende Rinde und ein helleres, locker gebautes Mark. In der Rinde finden sich zahlreiche Lymphfollikel, im Mark sind die Lymphozyten in Strängen (Markstränge) angeordnet. Lymphfollikel und die Markstränge sind B-Zell-Regionen. Zwischen den Rindenfollikeln und den Marksträngen liegt die parafollikuläre Zone, welche die T-Zell-Region der Lymphknoten darstellt [8].

Den Anfang des Lymphsystems bilden blind beginnende Lymphkapillaren im Bindegewebe der Organe und in der Dermis der Haut. Die relativ weitleumigen Lymphkapillaren münden in Sammellymphgefäße, die dann zu größeren Lymphgefäßen zusammenfließen. Lymphgefäße unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von Blutgefäßen, dennoch teilen sie auch Gemeinsamkeiten. Beide vaskulären Systeme haben den gleichen embryonalen Ursprung. Man geht davon aus, dass Lymphgefäße aus embryonalen Venen hervorgehen. Sowohl Blut- als auch Lymphgefäße werden durch ein Endothelium abgegrenzt, welches von glatter Muskulatur umgeben ist. Anders als Blutgefäße haben Lymphgefäße eine diskontinuierliche oder fenestrierte Basalmembran und keine interendothelialen *tight junctions*, aus diesem Grund sind sie durchlässiger für die Interstitialflüssigkeit [9]. Lymphatische Endothelzellen sind über spezielle verankernde Filamente mit der extrazellulären Membran verbunden, welche das Öffnen von Gefäßen bei erhöhtem Gewebedruck ermöglicht [5,6]. Dadurch sind Lymphgefäße durchgängig für Gewebeflüssigkeit, neben welcher auch Tumorzellen, Zytokine und Wachstumsfaktoren in die Lymphgefäße gelangen können [5]. Diese wandern über Lymphgefäße zu Lymphknoten, von regionären zu entfernten Lymphknoten und letztendlich zum *Ductus thoracicus*, von wo aus sie in das Blutsystem gelangen (Abb. 3) [5,10].

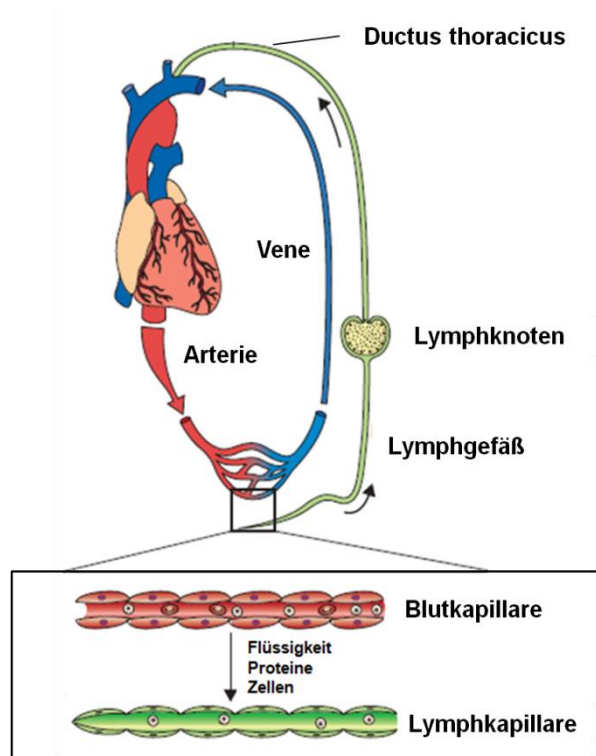


Abbildung 3: Funktion des Lymphsystem bei der Regulierung der Gewebeflüssigkeit. Die Lymphgefäße sammeln Interstitialflüssigkeit und transportieren diese zu Lymphknoten, von da aus gelangt die Interstitialflüssigkeit in größere Sammellymphgefäße und anschließend in den *Ductus thoracicus* (Thoracic duct) über welchen die Rückführung in das Blutsystem stattfindet. Abbildung modifiziert nach [11].

1.2.2 Lymphknotenmetastasierung

Im 18. Jahrhundert wurde erstmals die Rolle des Lymphsystems in der Ausbreitung von Tumoren innerhalb des menschlichen Körpers erkannt [12,13]. In der Folge konnte gezeigt werden, dass die meisten Karzinome über das Lymphsystem metastasieren [14], so auch das Prostatakarzinom [15]. Die Detektion von Lymphknotenmetastasen indiziert fast immer eine schlechte Prognose für Patienten, die an einem Prostatakarzinom leiden, da die meisten Todesfälle durch Metastasen verursacht werden. Regionäre Lymphknoten, in dessen Einzugsbereich der Tumor liegt, sind oftmals der erste Ort der Metastasierung [16]. Bei 5-12 % aller Prostatakarzinompatienten liegt eine Metastasierung dieser regionären Lymphknoten vor [15]. Die Detektion von Lymphknotenmetastasen ist von besonderer Wichtigkeit, denn obwohl diese an sich selten lebensbedrohlich sind, stellen sie einen Indikator für das Stadium dar, in dem sich der Tumor befindet und sind entscheidend für die folgende Behandlung [17]. Des Weiteren ist zu beachten, dass Tumorzellen über das Lymphsystem in das Blutsystem gelangen und von dort aus in entfernt gelegenen Organen Metastasen bilden können [18]. Die metastatische Verbreitung von Tumorzellen über den Blutkreislauf bezeichnet man als hämatogene Metastasierung.

Der Eintritt der Tumorzellen in das Lymphsystem und die darauffolgende Ansiedlung in Lymphknoten wird durch mehrere Faktoren begünstigt. Zum einen herrschen innerhalb des Tumors hohe Druckverhältnisse, wodurch die Lymphflüssigkeit vom Tumor weg, hinein in die lymphatischen Gefäße fließt [19]. Tumorzellen, welche von der Tumormasse dissoziieren, können so mit der Lymphflüssigkeit in die lymphatischen Gefäße eintreten und über diese passiv zu regionären Lymphknoten transportiert werden. Zum anderen wurden chemoattraktive Stimuli nachgewiesen, welche von Lymphgefäßen ausgehen. Tumorzellen sind in der Lage auf die Stimuli zu reagieren. So wird beispielsweise das Chemokin CCL21 von Endothelzellen der Tumor-assoziierten-Lymphgefäße produziert. Rezeptoren für dieses Chemokin sind CCR7 und CXCR4. Diese werden auf Tumorzellen vieler Karzinome exprimiert. Weiterhin gibt es eine positive Korrelation zwischen der Expression der CCR7 und CXCR4 auf Tumorzellen und der Lymphknotenmetastasierung [20,21], was so zu erklären ist, dass diese Rezeptoren Tumorzellen dazu befähigen, auf CCL21 zu reagieren und in dessen Richtung zu migrieren. CCL21 übt also eine chemoattraktive Wirkung auf CCR7-positive Tumorzellen aus. Es handelt sich hierbei um einen parakrinen Effekt. Kürzlich erschienene Studien haben gezeigt, dass viele CCR7-positive Tumorzellen auch selber CCR7-Liganden produzieren können. Durch diese Eigenschaft lösen sie eine autologe Chemotaxis aus und unterstützen die Migration von weiteren CCR7-positiven Tumorzellen in die Lymphgefäße. [22]. Sowohl die direkte als auch die autologe Chemotaxis fördern den Eintritt von Tumorzellen in die Lymphgefäße.

Des Weiteren wird oft das „Seed and Soil“-Modell, welches 1889 von Paget beschrieben wurde, in Betracht gezogen. Es besagt, dass Lymphknoten bevorzugt von Tumorzellen befallen werden, da diese besonders vorteilhaft für das Wachstum von Metastasen und die Verteilung von Tumorzellen sind. Ausgehend von dem primären Tumor verteilen sich Krebszellen über den ganzen Körper, bilden aber nur in geeigneten Organen Metastasen, bevorzugt in Lymphknoten [23]. Dieses Modell trifft allerdings nicht auf alle Arten von Tumoren zu [24].

Sind die Tumorzellen in einen regionären Lymphknoten gelangt, vermehren sie sich zunächst im Bereich des Randsinus und durchsetzen schließlich den gesamten Lymphknoten. Von dieser Lymphknotenmetastase können sich erneut Tumorzellen lösen und über efferente Lymphgefäße wieder in die lymphatische Zirkulation gelangen. Dort können sie zusätzliche Lymphknoten besiedeln. Tumorzellen können über die lymphatische Zirkulation auch das Blutsystem erreichen. Dies kann über Anastomosen, Verbindungen zwischen Blut- und Lymphgefäßen, vor allem jedoch über den *Ductus thoracicus* erfolgen. Nachdem Tumorzellen einmal das Blutsystem erreicht haben, können diese unter anderem durch Bindung an organspezifischen Endothelzell-„Homing“-Rezeptoren und Adhäsions-

molekülen, in vielen Organen Metastasen bilden [25,26]. Tumor-assoziierte Lymphgefäße fungieren also als konstitutiver Kanal für disseminierende Tumorzellen. Das stellt die Grundlage zur Bildung von Lymphknotenmetastasen dar. Zusätzlich dienen die Lymphgefäße als Zwischenstation auf dem Weg der Tumorzellen, bevor diese in vielen Organen des Körpers Metastasen bilden können [16].

1.2.3 Der prämetastatische Zustand

Noch bevor es zum Eintritt von metastasierenden Tumorzellen in einen Lymphknoten kommt, können Veränderungen in diesem Lymphknoten auftreten. Schon im 19. Jahrhundert wurde ein prämetastatischer Zustand von Lymphknoten beobachtet. Dieser Zustand wird durch Proteine, wie z.B. lymphangiogenetische Faktoren und andere Moleküle, ausgelöst, welche vom Tumor abgegeben und über die ableitenden Lymphgefäße zu regionären Lymphknoten transportiert werden. Der prämetastatische Zustand zeichnet sich durch eine Vergrößerung des betroffenen Lymphknotens aus, welche unter anderem durch eine vermehrte Proliferation des Endotheliums des Lymphsinus verursacht wird [27]. Des Weiteren wurden viele Tumor-induzierte Veränderungen der Immunzellpopulation in regionären Lymphknoten vor und nach Invasion von Tumorzellen beobachtet. So konnte in Melanom- und Brustkrebs-Modellen eine partielle Immunsuppression in den ableitenden Lymphknoten gezeigt werden [28,29]. Unter anderen wird dieser Vorgang durch immunsuppressive Zytokine ausgelöst, welche in erhöhter Konzentration in regionären Lymphknoten nachgewiesen werden konnten [30]. Vom Tumor produzierte lymphangiogenetische Faktoren induzieren nicht nur im Tumor selbst, sondern auch in den ableitenden Lymphknoten eine Neubildung von Lymphgefäßen [31]. Diese Lymphangiogenese findet schon vor dem Eintritt metastatischer Tumorzellen statt und wird nach der Bildung einer Lymphknotenmetastase noch zusätzlich erhöht. Die Tumor-induzierte Lymphangiogenese in ableitenden Lymphknoten erhöht den Lymphflüssigkeitsfluss zu diesen [32], wodurch wiederum die Metastasierung verstärkt erfolgen kann. Durch die Vergrößerung, die partielle Immunsuppression und die erhöhte Lymphangiogenese, wird eine prämetastatische Nische in den regionären Lymphknoten geschaffen. Sie bietet ideale Voraussetzungen für die Besiedlung eines Lymphknotens durch Tumorzellen [34,35].

1.2.4 Zusammenhang von Lymphgefäßdichte, lymphatischen und hämatogenen Metastasen

Im Jahr 1996 beschrieben Alitalo *et al.* die Isolierung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptors-3 (VEGFR-3), welcher hauptsächlich vom lymphatischen

Endothelium produziert wird [35]. Kurz darauf wurden die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren-C und -D (VEGF-C und VEGF-D) identifiziert [36,37]. Sie sind Mitglieder der VEGF-Familie und Liganden des VEGFR-3. Durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Versuche wurde gezeigt, dass VEGF-C und -D das Wachstum von neuen Lymphgefäßen induzieren [38-40]. Die ersten lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren waren gefunden.

Um den Zusammenhang zwischen Lymphgefäßdichte und Lymphknotenmetastasierung untersuchen zu können, wurden Marker verwendet, die von Blut- und Lymphgefäßen verschieden exprimiert werden. Die Beobachtung, dass VEGFR-3 relativ spezifisch auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird, ermöglichte, durch die Verwendung von anti-VEGFR-3-Antikörpern, eine erstmalige Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßen [41]. Es wurden daraufhin weitere bevorzugt von lymphatischen Endothelzellen exprimierte Proteine nachgewiesen, unter anderen Podoplanin und LYVE-1 [42,43]. Im Gegensatz dazu ist ein gängiger Marker zur Identifizierung von Blutgefäßen CD31 [44], welcher von Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert wird. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung von Blut- und Lymphgefäßen und eine Ermittlung der Lymphgefäßdichte möglich, trotz vieler Gemeinsamkeiten und gleichen embryonalen Ursprungs [45].

Durch Synthese von VEGF-C oder VEGF-D in Tumorzellen wird die Tumor-induzierte Lymphangiogenese ausgelöst. Darauf folgend kommt es zu einer erhöhten Neubildung von Lymphgefäßen im Tumor und in der peritumoralen Umgebung [46]. Neben der erhöhten Lymphgefäßdichte, vergrößert sich auch der Lymphgefäßdurchmesser und eine vermehrte Proliferation von Tumor-assoziierten Lymphgefäßen kann beobachtet werden [47,48]. Eine erhöhte Anzahl von Lymphgefäßen wiederum steigert die Wahrscheinlichkeit, dass Tumorzellen in das lymphatische System einwandern und dort die Bildung von Metastasen ermöglichen [49]. In vielen weiteren Studien konnte eine vermehrte Lymphknotenmetastasierung bei erhöhter Lymphgefäßdichte nachgewiesen werden. Es ist dennoch zu beachten, dass die positive Korrelation zwischen Lymphgefäßdichte von Tumor und Umgebung und der Lymphknotenmetastasierung ein kontrovers diskutierter Sachverhalt ist [50-52].

Darüber hinaus wurde in vielen Studien gezeigt, dass es durch die Tumor-induzierte Lymphangiogenese auch zur vermehrten Metastasenbildung in entfernt gelegenen Organen kommt. So konnten neben den Metastasen in Lymphknoten auch in Lungen Metastasen nachgewiesen werden [46,53,31]. Durch Inhibition des VEGFR-3-Signalweges konnte in einigen Studien eine verminderte Bildung von neuen Lymphgefäßen beobachtet werden. Das hatte eine Reduktion von Lymphknotenmetastasen und auch von Metastasen in entfernt gelegenen Organen zur Folge [54].

Auch wurde in mehreren klinischen Studien eine positive Korrelation zwischen lymphatischen und hämatogenen Metastasen gefunden. Dieses Phänomen war dabei nicht auf eine Krebsart beschränkt. Durch Untersuchungen von Prostatakrebspatienten zeigten Bubendorf *et al.*, dass 84 % der Patienten, die positiv auf Lymphknotenmetastasen getestet wurden, auch eine hämatogene Verbreitung von Tumorzellen aufwiesen [55]. Ein erhöhtes Vorkommen von hämatogenen Metastasen bei schon vorhandener Lymphknotenmetastasierung konnte Des Weiteren für Brust- [56], Pankreas- [57], Eierstock- [58] sowie Kopf- und Nackenkrebs [25] nachgewiesen werden. Es wurde so ein Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasierung und der Bildung von lebensbedrohlichen Metastasen in entfernt gelegenen Organen verdeutlicht.

1.3 Die Rolle von Tumorstammzellen bei der Metastasierung

Es wird davon ausgegangen, dass sowohl Tumorstammzellen als auch die sogenannte Epithelio-Mesenchymale Transition (EMT) eine zentrale Bedeutung für den Vorgang der Metastasierung haben.

Das Modell der Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) besagt, dass in Tumoren eine Population von Zellen mit Stammzeleigenschaften existiert, welche den Ursprung des malignen Wachstums bildet [59]. CSCs zeichnen sich durch unbegrenzte Regeneration, Pluripotenz, Tumorigenität und Seltenheit aus. Durch wiederholte symmetrische Teilungen kann sich eine Tumorstammzelle unbegrenzt replizieren. Die Tochterzellen sind wieder vollwertige CSCs. Dadurch ist die Tumorzelllinie unsterblich. Erfolgt eine asymmetrische Teilung, so entstehen aus den CSCs Tochterzellen, die zumindest teilweise eine für das Ursprungsgewebe typische Differenzierung aufweisen. So erklärt sich einerseits die Ähnlichkeit des Tumors zum Ursprungsgewebe und andererseits auch eine oft beobachtete Heterogenität des Phänotyps innerhalb eines Tumors. Tochterzellen, die ihre Stammzeleigenschaften verloren haben (non-CSCs), teilen sich wesentlich häufiger als CSCs und machen somit die Hauptmasse eines Tumors aus. Eine einzelne CSC kann als Keimzelle für einen malignen Tumor fungieren. Des Weiteren geht man davon aus, dass der Anteil von CSCs in der Gesamtpopulation der Tumorzellen sehr gering ist. CSCs zeichnen sich weiterhin durch ihre enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber exogenen Noxen aus. Sie zeigen eine erhöhte Behandlungsresistenz gegenüber z.B. Zytostatika oder Bestrahlung [60].

Die Epithelio-Mesenchymale Transition ist ein Prozess in dem Zellen ihre epitheliale Differenzierung verlieren und den sogenannten mesenchymalen Phänotyp annehmen [61]. Morphologisch wandern fibroblastenartige Einzelzellen aus dem geordneten Zellverband aus. Die EMT wurde in der Embryonalentwicklung entdeckt. Mittlerweile unterscheidet man

drei verschiedene Typen der EMT, wobei die Typ-3-EMT in Karzinomen stattfindet [62]. Das EMT-Programm führt in Tumorzellen zur Ausbildung eines invasiven migratorischen Phänotyps und zur Erlangung von CSC-Eigenschaften, wie Tumorigenität und Therapieresistenz [63-65].

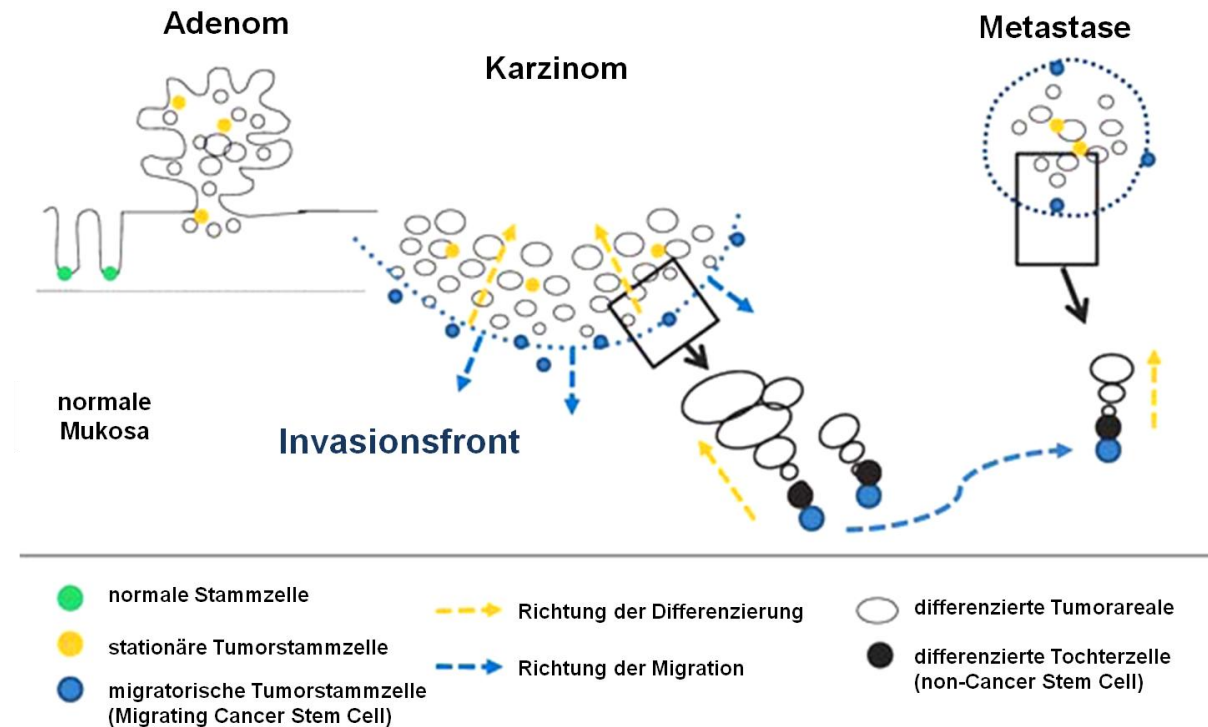


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hypothese zur Beteiligung der EMT und von MCSCs an dem Prozess der Metastasierung. Durch EMT entstehen an der Tumordinvasionsfront MCSCs, welche nach Migration in andere Organe wieder differenzierte, dem Primärtumor phänotypisch ähnliche, Metastasen bilden [60].

Brabletz *et al.* formulierten 2005 für die Metastasierung von Karzinomen die Hypothese, nach welcher lokale Signale an der Invasionsfront die Aktivierung eines EMT-Programms auslösen (Abb. 4) [66]. Dadurch werden ein invasiver Phänotyp und CSC-Eigenschaften induziert. Es entstehen sogenannte migratorische Tumorstammzellen (Migrating Cancer Stem Cells, MCSCs). Diese können den Primärtumor verlassen und über Lymphgefäße und/oder über das Blutssystem in andere Organe gelangen. Aufgrund ihrer CSC-Eigenschaften sind sie in der Lage, dort neue Kolonien zu bilden. Das MCSC-Modell erklärt weitere Tumoreigenschaften, z.B. dass der CSC-Anteil unter den Tumorzellen in Abhängigkeit der Stärke der EMT-Induktion erheblich variieren kann. An der Invasionsfront befinden sich die meisten CSCs. Beim Wachstum einer Metastase entsteht wieder ein Tumor, welcher in der Regel die Morphologie des Primärtumors imitiert. Dies ist im MCSC-Modell nur dann möglich, wenn sich die MCSCs am Ort der Metastase asymmetrisch teilen oder wenn der EMT-Prozess umgekehrt verläuft (Mesenchymal-Epitheliale Transition, MET) [67]. In beiden Fällen entstehen wieder differenzierte non-CSC, welche wegen ihrer hohen

Proliferationsrate die Hauptmasse einer Metastase ausmachen und somit ihre Morphologie bestimmen.

1.4 Therapeutische Ansätze zur Bekämpfung metastasierender Karzinome

In Europa sterben jährlich 1,7 Millionen Menschen an einer Krebserkrankung [68]. Es wird angenommen, dass 90 % dieser Todesfälle direkt oder indirekt durch Metastasenbildung verursacht werden [69]. Das Überleben eines Patienten ist somit streng mit dem metastatischen Status des Karzinoms verbunden. Die Behandlung von Metastasen erfolgt zurzeit ähnlich der des primären Tumors. Neben klassischen Behandlungsmethoden, wie die operative Entfernung des Tumors und des umliegenden Gewebes, Chemo- und Bestrahlungstherapie, liegt der Fokus derzeit auf der Entwicklung effektiver Methoden zur Bekämpfung von Metastasen. Allerdings verläuft die Entwicklung sehr langsam [70]. Da Tumorstammzellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Metastasen spielen, ist ein wichtiges Ziel, nicht nur die non-CSC, sondern speziell auch die CSC möglichst selektiv zu vernichten [60].

Nachdem die Bedeutung von Lymphknotenmetastasen erfasst wurde, ist davon ausgegangen worden, dass durch eine chirurgische Entfernung der Lymphknotenmetastasen eine Vorbeugung hämatogener Metastasierung stattfinden würde. Die Analyse von vielen klinischen Studien ab 1960 zeigte überraschende Ergebnisse, denn die Entfernung der Lymphknotenmetastasen schien nicht von therapeutischer Relevanz zu sein, da die Überlebensdauer der Patienten nicht verlängert wurde [71,72].

Ein weiterer Therapieansatz ist die Inhibierung der Lymphangiogenese z.B. durch Antikörper, lösliche Rezeptoren oder shRNAs, welche verschiedene Komponenten der pro-lymphangiogenetischen Signalkaskade inhibieren [25]. Da es viele Ähnlichkeiten in der molekularen Regulation von Lymphangiogenese und Angiogenese gibt, gestaltet sich eine spezifische Inhibierung der Lymphangiogenese allerdings als sehr schwierig. Des Weiteren wurden auch in ersten Studien Substanzen ermittelt, welche spezifisch auf den CSC-Anteil der Tumorzellen wirken [73]. Der klinische Einsatz steht allerdings noch aus. Auch könnten Therapieansätze, die gegen den Prozess der EMT wirken, ein Mittel gegen Metastasierung darstellen.

Ziel ist es, eine Therapiemöglichkeit zu finden, die den soliden Tumor und sowohl lymphatische als auch hämatogene Metastasen erfolgreich behandeln kann. Im Rahmen dessen erlangt die onkolytische Virustherapie immer mehr an Bedeutung.

1.5 Onkolytische Virustherapie

Die Idee, dass Viren in der Krebstherapie Anwendung finden könnten, ist im frühen 20. Jahrhundert durch einen Zufall entstanden, als bei Krebspatienten, welche an einer Viruserkrankung litten oder gegen Tollwut geimpft wurden, eine transiente Remission des Tumorwachstums auftrat [74,75]. Dock *et al.* waren die ersten, die dieses Phänomen beschrieben. Er berichtete auch von Patienten, bei denen es, nach einer Injektion mit Influenza-Viren, zu einer signifikanten Remission von Leukämie kam [76]. Levaditi *et al.* zeigten 1922 erstmals, dass das Vaccinia-Virus in der Lage war, sich in verschiedenen Tumoren zu vermehren und das Tumorwachstum in Mäusen und Ratten zu inhibieren [77]. Diese frühe Entdeckung führte dazu, dass zwischen 1950 und 1960 verschiedene Viren in präklinischen und klinischen Studien getestet wurden [78]. Moore arbeitete mit dem fernöstlichen russischen Enzephalitis-Virus und testete seine onkolytische Wirkung im Tiermodell [79]. Hierbei war es erstmals möglich, eine vollständige Tumorregression durch virale Onkolyse zu erreichen. Hoster *et al.* publizierten 1949 die ersten klinischen Studien zur viralen Onkolyse von Krebs, in denen 21 Freiwillige, die an dem Hodgkin-Lymphom litten, mit Gewebeproben von Hepatitispatienten geimpft wurden [80]. Obwohl viele Nebenwirkungen beobachtet wurden, zeigten die Patienten eine deutliche klinische Verbesserung und eine Abnahme der Tumorgroße, nachdem sich Symptome einer viralen Hepatitis manifestierten. Das National Cancer Institut (NCI) führte 1956 eine erste großangelegte klinische Studie durch, in welcher 30 Zervixkarzinompatienten Adenoviren verabreicht wurden [81]. Es wurden verschiedene Grade von lokaler Tumornekrose, aber keine signifikante Tumorregression beobachtet. Obwohl diese ersten Studien bahnbrechend waren, hatte das Interesse an onkolytischen Viren als potentielle anti-neoplastische Therapeutika nachgelassen, zum einen wegen des nur kurzlebigen Erfolges, zum anderen wegen inakzeptabler Nebenwirkungen, die letztlich zum Abbruch der Studien führten. Die Viren waren nicht in der Lage, selektiv nur die malignen Tumorzellen zu infizieren, ohne dabei die gesunden Zellen zu beschädigen. Des Weiteren waren sie nicht in der Lage, die Detektion und Bekämpfung durch das Immunsystem zu umgehen. Das alles ist auf das damals begrenzte Wissen im Bereich der Virologie, Immunologie und Genetik und auf die begrenzt verfügbare Techniken zurückzuführen [78].

Auf Grund großer Fortschritte in Wissenschaft und Technik gelang es Forschern die Virustherapie zielgerichteter und effektiver zu gestalten [82]. Das erste zur Replikation befähigte, modifizierte Virus, von welchem ein anti-Krebs-Effekt im Menschen nachgewiesen werden konnte, ist das Adenovirus ONYX-015 [83]. Durch Deletion des Gens für E1B-55K wurde das Adenovirus gentechnisch verändert. Das führte zur bevorzugten Infektion von p53 defizienten Tumorzellen. Seither wurden in China, als erstem Land der Welt, der

Adenovirusstamm H101 zur adenoviralen Therapie von Hals- und Nackentumoren zugelassen [84].

Ein ideales Virus für die Krebstherapie wurde bis jetzt jedoch noch nicht gefunden, aber Vaccinia-Viren zählen, neben Adeno- und Herpesviren zu den vielversprechendsten Kandidaten innerhalb der Gruppe der onkolytischen Viren [85].

1.6 Das Vaccinia-Virus

Vaccinia-Viren waren für die Bekämpfung und erfolgreiche Ausrottung der Pocken von enormer Bedeutung. Aufgrund des millionenfachen Einsatzes als Impfstoff und der damit verbundenen intensiven Grundlagenforschung, verfügen wir über ein detailliertes Verständnis zur Pathogenese und Biologie von Vaccinia-Viren [86]. Neue Fortschritte in der Molekularbiologie, Virologie, Immunologie und in der Genetik von Krebs, haben so zu der Entwicklung neuer Krebstherapeutika basierend auf Vaccinia-Viren geführt. Durch eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften ist das Vaccinia-Virus besonders für die Krebstherapie geeignet. So sind Vaccinia-Viren in der Lage, ein großes Spektrum von Wirtszellen effektiv zu infizieren, da sie keine spezifischen Zelloberflächenrezeptoren benötigen, sondern die Infektion auch durch relativ unspezifische Membranfusionen erfolgen kann [87]. Sie besitzen ein Genom, in welches in umfangreichem Ausmaß transgene DNA integriert werden kann. Durch die ausschließliche Replikation von Vaccinia-Viren im Zytoplasma kann eine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom nahezu ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte in zahlreichen präklinischen Studien nach intravenöser Injektion der Vaccinia-Viren in Tumor-tragende Mäuse eine spezifische Amplifikation im Tumorgewebe, jedoch nicht in anderen Geweben und Organen, nachgewiesen werden [86-88]. Die Tumorselektivität ist das wichtigste Kriterium für die klinische Wirksamkeit aller Krebstherapeutika. Eine hohe Selektivität ermöglicht einen hohen therapeutischen Index und vermindert Nebenwirkungen. Konventionelle Krebstherapien, wie Chemo- oder Bestrahlungstherapie, bringen, oft durch ungenügende Tumorselektivität, nachteilige Nebenwirkungen mit sich.

1.6.1 Vaccinia-Virus-Taxonomie

Das Vaccinia-Virus gehört zur Familie der Poxviridae. Viren dieser Familie gliedern sich in zwei Unterfamilien, die Chordopoxvirinae, welche Vertebraten infizieren und die Entomopoxvirinae, welche ausschließlich Insekten befallen. Die Unterfamilie der Chordopoxvirinae ist wiederum in acht verschiedene Gattungen untergliedert, welche sich in

Morphologie und Wirtstropismus ähneln. Das Vaccinia-Virus gehört zur Gattung der Orthopoxviridae, deren Mitglieder Krankheitserreger der Pocken sind. Durch massive weltweite Anstrengungen in Form eines konsequenten Impf- und Bekämpfungsprogramms konnte die World Health Organisation (WHO) 1980 die Pocken für ausgelöscht erklären [91]. Die Impfung wurde durch Applikation von Vaccinia-Viren mit genügender Kreuzreaktivität durchgeführt, um einen Schutz vor anderen Orthopox-Viren zu bieten. Die Ursprünge der modernen Vaccinia-Viren sind unklar und obwohl jetzt bekannt ist, dass sie sich von dem Kuhpocken-Virus unterscheiden, welches Edward Jenner 1798 erstmals als Impfung gegen Pocken verwendete [92], gibt es eine enge Verwandtschaft der Virenarten.

1.6.2 Morphologie von Vaccinia-Viren

Vaccinia-Viren zählen zu den DNA-Viren und gehören zu den größten bekannten Viren. Vaccinia-Virus Partikel sind ca. 300 x 240 x 120 nm groß, besitzen eine ziegelsteinartige, ovale Form und eine Lipoproteinmembran, welche die komplexen Kernstrukturen umfasst [93]. Die Kernstruktur beinhaltet eine ca. 192 kb große, lineare, doppelsträngige DNA, welche für 200 Gene kodiert. Die DNA ist mit vielen Proteinen assoziiert, die notwendig für die Transkription der RNA-Polymerase und für die RNA-Prozessierung sind. Die minimale Interaktion mit Wirtsproteinen erlaubt dem Vaccinia-Virus, sich in vielen verschiedenen Zelltypen zu replizieren und die Wirtsabwehrmechanismen zu umgehen. Vaccinia-Virus Partikel kommen in vier verschiedenen Formen vor. Zwei intrazelluläre Formen: *intracellular mature virus* (IMV) und *intracellular enveloped virus* (IEV) und zwei extrazelluläre Formen: *cell-associated enveloped virus* (CEV) und *extracellular enveloped virus* (EEV) [93,94]. IMV und EEV sind die infektiösen Partikelformen des Vaccinia Virus. IMV-Partikel sind von einer Membran umgeben, EEV-Partikel bestehen aus einem IMV-Partikel, welcher von einer zweiten Membran umgeben ist, die wiederum mehrere virale Antigene enthält [95].

1.6.3 Replikation von Vaccinia-Viren

Die Replikation von Vaccinia-Viren erfolgt während des gesamten Infektionszyklus ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle [96]. Die Eintrittsmechanismen in die Wirtszelle unterscheiden sich abhängig von den Partikel-Formen. Es konnte gezeigt werden, dass IMV-Partikel durch Interaktionen der Hüllproteine H3, A27 oder D8 Glykosaminoglykane (GAGs) an die Zelloberfläche binden können [97-99]. Nach Bindung kann der Eintritt über zwei Mechanismen erfolgen. Der einfachere Weg ist, dass die IMV-Membran direkt mit der Plasmamembran fusioniert und es dem viralen Kern so ermöglicht wird, das Zytoplasma zu betreten. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass IMV-Partikel durch Endozytose

aufgenommen werden und dann die Virusmembran mit der vesikulären Membran fusioniert [100]. Eine Untersuchung des Eintrittsmechanismus von EEV-Partikeln wird dadurch erschwert, dass bei den meisten Vaccinia-Virus-Stämmen nur eine geringe Menge von EEV-Partikeln vorliegt und dass die äußere Membran sehr empfindlich ist. Elektronenmikroskopische Studien zeigen einen in der Virologie beispiellosen Liganden-vermittelten Auflösungsprozess der äußeren Membran nach der Bindung an der Plasmamembran der Wirtszelle [101].

Nach dem Eintritt in die Zellen treten Veränderungen der Zellfunktionen, des -metabolismus sowie der -morphologie auf, welche als „cytopathic effects“ (CPE) bezeichnet werden [102]. Mit Aufnahme der Viruspartikel kommt es zu einer Zunahme der Plasmamembran-Permeabilität sowie zur Entlassung des DNA-haltigen Virion-Kerns ins Zytoplasma. Die Transkription von ca. 100 frühen mRNAs, welche den Wirtszell-RNAs ähneln, erfolgt innerhalb des Virion-Kerns, durch eine viruseigene DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die mRNAs werden in das Zytoplasma exportiert, wo die Translation mit Hilfe des zelleigenen Translationsapparats stattfindet. Die frühen mRNAs kodieren für Proteine, die an der viralen DNA-Synthese beteiligt sind. Andere frühe Proteine bewirken eine Veränderung der Wirtszellen zum Vorteil für das Virus und ermöglichen es dem Vaccinia-Virus die angeborene Immunantwort des Wirtes zu umgehen [95]. Die anschließende DNA-Replikation findet in sogenannten Mini-Nuklei (den Virus-Fabriken), welche von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) umgeben sind, statt. Daraufhin kommt es zur Transkription von intermediären und späten Genen [103]. Intermediäre Gene kodieren vor allem für Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine. Die Transkriptionsfaktoren dienen der Transkription von späten Genen, welche an der Verpackung von neuen Virus-Partikeln beteiligt sind. Die regulatorischen Proteine initiieren unter anderem die Transkription von frühen Genen in neu-infizierten Zellen.

Nach der Synthese aller notwendigen Proteine beginnt der Zusammenbau von Vorgänger-Viruspartikeln [104]. Der Zusammenbau beginnt mit der Bildung von sichelförmigen Membranen, welche sich schließlich zu *immature virions* (IVs) entwickeln. Die IVs nehmen DNA auf und reifen zu IMVs, welche größtenteils bis zur Zellyse intrazellulär verbleiben. Durch die Zellyse kommt es dann zur Freisetzung des größten Teils der IMVs. Ein kleiner Anteil durchläuft das intrazelluläre Membrannetzwerk und kann durch *trans*-Golgi-Zisternen [105,106] oder Endosomen [107] freigesetzt werden. Dabei entstehen die IEVs. Sie werden entlang von Mikrotubuli (MT) zur Zelloberfläche transportiert, fusionieren dort mit der Plasmamembran und werden dadurch zu CEVs. CEVs können Aktin vom Zytoplasma rekrutieren und über Filopodien zu benachbarten Zellen transportiert werden [108]. Sie können aber auch von der Plasmamembran dissoziieren und EEVs bilden. Nur ein geringer

Teil der EEVs, ca. 5 %, liegt ungebunden vor [109]. Da die Membran der EEVs größtenteils aus Wirtszellproteinen besteht, ist eine unbeeinträchtigte systemische Verteilung dieser Partikel über den Blutkreislauf und eine Umgehung der immunvermittelten Bekämpfung möglich [110].

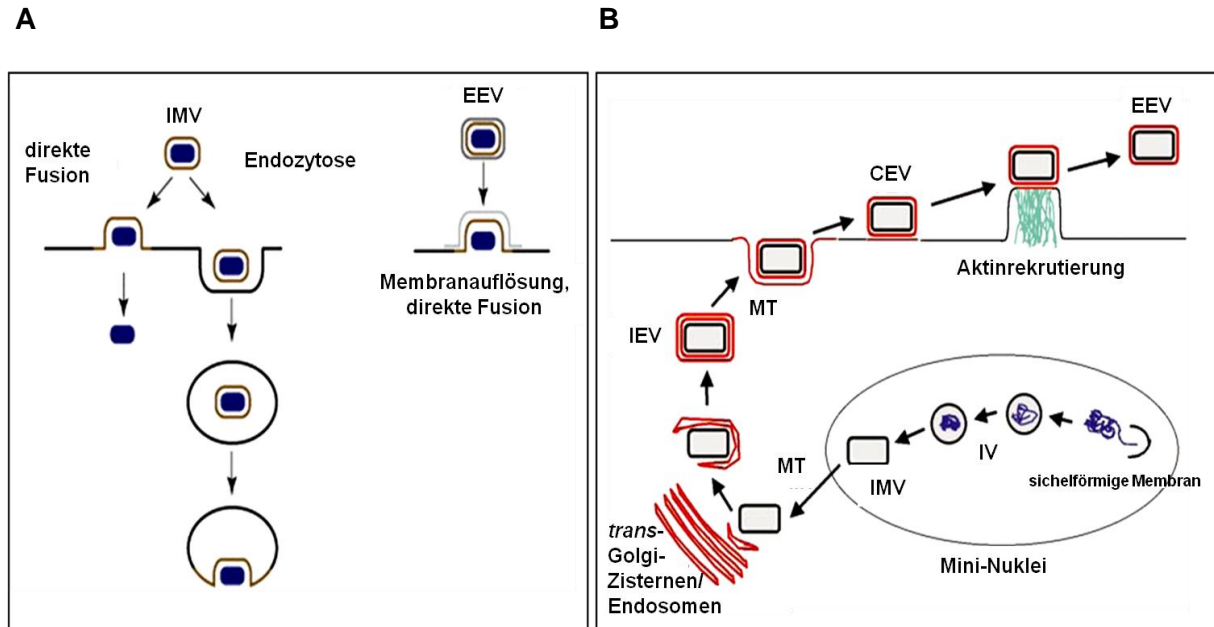


Abbildung 5: Eintritt von Vaccinia-Virus in die Wirtszelle und dessen Morphogenese. (A) IMV und EEV gelangen auf verschiedene Arten in die Wirtszelle [95]. IMV-Partikel können zum einen direkt mit der Plasmamembran fusionieren, woraufhin der nackte Virion-Kern in das Zytoplasma gelangen kann. Zum anderen können sie durch Endozytose in Vesikeln aufgenommen werden, deren Membran daraufhin mit der IMV-Membran verschmilzt. EEV-Partikel binden an die Plasmamembran, woraufhin es zur Auflösung der äußeren Virion-Membran kommt. (B) zeigt einen Überblick über die Morphogenese des Vaccinia-Virus [94]. Die in den Virus-Fabriken produzierten IMVs, werden über Mikrotubuli (MT) zu den Membranen des Golgi-Apparates oder zu Endosomen transportiert. Hier werden die IMVs von einer Doppelmembran umhüllt und bilden so die IEVs. Diese wiederum gelangen über MTs zur Zelloberfläche, an welcher sie mit der Plasmamembran fusionieren und CEVs bilden. CEVs können an der Zelloberfläche verbleiben und benachbarte Zellen erreichen oder sie werden freigesetzt und breiten sich systemisch aus. Grafik modifiziert nach [94,95].

1.6.4 Rekombinantes Vaccinia-Virus GLV-1h68

Der kürzlich beschriebene, attenuierte Vaccinia-Virusstamm GLV-1h68 [89] zeichnet sich durch eine erhöhte Tumorselektivität und durch eine verminderte Toxizität im Vergleich zum Wildtyp Vaccinia-Virusstamm L1VP aus [89]. Die erhöhte Tumorselektivität konnte unter anderem in folgenden Modellen nachgewiesen werden: humanem Brustkarzinom [89], anaplastischem Schilddrüsenkarzinom [111,112], malignem Pleuramesotheliom [113], Pankreaskarzinom [114] und caninem Brustkarzinom [115]. GLV-1h68 wurde durch Insertion von Expressionskassetten des Renilla-Luciferase-GFP-Fusionsproteins, der β -Galaktosidase und der β -Glukuronidase in die Genloci *F14.5L*, *J2R* und *A56R* konstruiert (Abb. 6).



Abbildung 6: Vaccinia-Virus-Konstrukt GLV-1h68. Der Wildtypstamm LIVP wurde genutzt um eine neue Generation von rekombinanten Vaccinia-Viren zu konstruieren, unter anderem den Stamm GLV-1h68. Durch Einbringen neuer Genkassetten in die drei Genorte *F14.5L*, *J2R* und *A56R* wurden diese inaktiviert und dadurch die Toxizität erniedrigt, sowie die Tumorselektivität erhöht.

Das Gen *J2R* der Vaccinia-Viren kodiert für eine Thymidinkinase (TK) und ist essentiell für die Synthese von Desoxythymidin-Monophosphaten und Desoxyuridin-Monophosphaten und somit für die DNA- und RNA-Synthese von entscheidender Bedeutung. Eine Deletion von *J2R* führt zu einer viralen Abhängigkeit von zellulär exprimierter Thymidinkinase. Es wird davon ausgegangen, dass die Thymidinkinase in transformierten Zellen stärker exprimiert wird, als in gesunden Zellen [116]. So konnte bei Vaccinia-Viren mit inaktivierter Thymidinkinase eine verminderte Pathogenität und eine erhöhte Tumorselektivität in verschiedenen Tumormodellen gezeigt werden [88,117]. GLV-1h68 wurde vom Vaccinia-Virusstamm LIVP abgeleitet, welcher von Natur aus eine inaktivierte Thymidinkinase besitzt und somit grundsätzlich selektiver als andere Vaccinia-Virus-Stämme ist [89,118]. Neben dem inaktiven Genlocus *J2R*, wurden bei der Konstruktion die Genloci *F14.5L* und *A56R* inaktiviert. *F14.5L* kodiert für ein kleines Transmembranprotein, welches in IMV und in Zelloberflächen infizierter Zellen eingebaut ist und so die Zelladhäsion von GLV-1h68 vermittelt. Eine Deletion von *F14.5L* resultiert in einer verminderten Virulenz in der Maus [118,119]. *A56R* kodiert für Hämagglutinin (HA), einen virulenten Faktor, welcher an der interzellulären Verteilung von Vaccinia-Viren beteiligt ist [120]. Die kombinierte Inaktivierung der *F14.5L*-, *J2R*- und *A56R*-Gene und die kombinierte Überexpression von neuen Genkassetten, welche transkriptionelle und translationelle Last für das Virus darstellen, führt zu einer erhöhten Tumorselektivität.

1.7 Ziele der Arbeit

In vielen Studien konnte erfolgreich eine Tumor-regredierende Wirkung von GLV-1h68 nachgewiesen werden [89,112-115,121-123], wohingegen über eine mögliche Wirkung auf Metastasen wenig bekannt ist.

Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit, ein metastasierendes Tumormodell zu finden und dieses näher zu charakterisieren. Dies sollte unter anderem durch Etablierung einer direkten Fluoreszenz-basierten Visualisierung von Tumorzellen geschehen. Mit Hilfe von modifizierten Tumorzellen sollte der Modus der Verbreitung von Metastasen in der Maus untersucht werden. Dabei sollte besonders die Differenzierung zwischen hämatogenen und lymphatischen Metastasen ermöglicht werden.

Des Weiteren galt es, den Effekt von GLV-1h68 auf die Bildung und das Wachstum von Metastasen zu untersuchen. Hierfür sollte geprüft werden, ob GLV-1h68 in der Lage ist, Metastasen erfolgreich zu kolonisieren und ob die Kolonisierung eine Inhibierung der Metastasen zur Folge hat. Ebenso sollte herausgefunden werden, ob es Unterschiede in der Kolonisierung von Tumoren und Metastasen mit GLV-1h68 gibt. Sollte dies der Fall sein, waren die Gründe hierfür zu ermitteln.

2 Material

2.1 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	BioRad, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose Low Melt	AppliChem, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
1x BSS	PAA, A-Pasching
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Click` s RPMI	Pan Biotech, Aidenbach
Coelenterazin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAA, A-Pasching
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA, A-Pasching
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Chemikalienausgabe der Universität Würzburg
Ethanol p.a.	Riedel deHaen, Seelze
Ethanol absolut (RNase-frei)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, A-Pasching
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe

Material

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	PAA, A-Pasching
Hoechst-Farbstoff	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (RNase-frei)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	PAA, A-Pasching
Luminol	Amersham, Freiburg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel
Nonidet P-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem, Darmstadt
1x PBS	PAA, A-Pasching
Penicillin/Streptomycin (100x Konzentrat)	PAA, A-Pasching
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Phusion™ DNA-Polymerase	New England BioLabs, US- Ipswich
5 x Phusion™ Hf Puffer	New England BioLabs, US- Ipswich
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteaseinhibitoren-Mix Complete Mini	Roche, US-Indianapolis
RNase-ExitusPlus	AppliChem, Darmstadt
RNA-Later	Qiagen, Hilden

Material

RPMI-Medium 1640	PAA, A-Pasching
Schwefelsäure 95%ig	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, CH-Buchs
Tris-Base, pH 10-11,5	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl, pH 3,5-5	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol-Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	PAA, A-Pasching
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Wasser (RNase-frei)	AppliChem, Darmstadt

2.2 Puffer und Lösungen

1x Bradfordlösung:	50 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
	25 ml	Ethanol (96 %)
	50 ml	Phosphorsäure (85 %)
	ad 550 ml	H ₂ O
CMC-Medium:	7,5 g	Carboxymethylcellulose
	500 ml	DMEM (+1 % Pen/Strep, 5 % FKS)
Einfriermedium:	90 %	Kulturmedium
	10 %	DMSO
Kristallviolett-Lösung:	1,3 g	Kristallviolett
	50 ml	Ethanol
	300 ml	Formaldehyd 37 %
	650 ml	H ₂ O _{bd}
DEPC-H ₂ O:	1 l	H ₂ O
	1 ml	DEPC-Reagenz
ECL-Reagenz:	Lösung 1: 90 mM	p-Cumarsäure
	Lösung 2: 250 mM	Luminol

Material

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 H ₂ O auf 200 ml auffüllen	
	→ 3 µl H ₂ O ₂ (30 %) zu 10 ml Lösung geben	
Proteinlysepuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 3,5-5
	2 mM	EDTA, pH 7,4
	2 mM	PMSF
	→eine Proteaseninhibitoren-Tablette auf 10 ml Lysepuffer	
Paraformaldehyd (PFA):	4 g PFA in warmem H ₂ O _{bd} lösen	
	NaOH zugeben bis die Lösung klar ist	
	10 ml 10x PBS	
	mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen	
	→pH-Wert auf 7,4 einstellen	
1x PBS:	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
Ponceau S-Färbelösung:	0,5 g	Ponceau S
	1 ml	Essigsäure
	ad 100 ml	H ₂ O
2x Probenpuffer für RNA:	5 ml	Glycerin
	20 µl	0,5 M EDTA
	4 ml	Bromphenolblau (0,4 %)
	1 ml	DEPC-H ₂ O
5x Probenpuffer für DNA:	2 ml	500 mM EDTA
	5 ml	Glycerin
	1 ml	Bromphenolblau (1 %)
	ad 10 ml	H ₂ O

Material

10x SDS-Laufpuffer:	440 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 M	Glycin
	1,5 (w/v)	SDS
	→pH-Wert auf 8,2 einstellen	
1x SDS-Probenpuffer:	200 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	5 % (v/v)	SDS
	1 mM	Na ₂ EDTA
	8 M	Harnstoff
	0,1 %	β-Mercaptoethanol
	0,2 %	Bromphenolblau
Strip-Lösung für Western Blots:	4 ml	SDS (10 %)
	1,25 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	140 µl	β-Mercaptoethanol
	ad 20 ml	H ₂ O
50x TAE-Puffer:	242 g	Tris-Base
	100 ml	0,5 M EDTA
	57,1 ml	Essigsäure
	ad 1 l	H ₂ O _{bd}
10x TBE-Puffer:	890 mM	Tris-Base
	890 mM	Borsäure
	25 mM	Na ₂ EDTA
	→pH-Wert auf 8,2 einstellen	
10x TBT:	1,5 M	NaCl
	60 mM	Tris-Base
	190 mM	Tris-HCl, pH 3,5-5
	20 %	Tween 20
1x Towbin-Puffer:	25 mM	Tris-Base
	192 mM	Glycin
	20 %	MeOH
	→pH-Wert auf 8,2 einstellen	

2.3 Verwendete Kits

DNA-free™ Kit	Ambion, Austin, TX, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Protect Animal Blood Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Zelllinien und Zellkulturmedien

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
4T1-Zellen	adhärent wachsende murine Brustkarzinomzellen
293FT-Zellen	adhärent wachsende humane epitheliale Nierenzellen
PC-3-Zellen	adhärent wachsende humane Prostatakarzinomzellen
PC-3-RFP-Zellen	PC-3-Zellen welche rot fluoreszierendes Protein (RFP) exprimieren

2.4.2 Zellkulturmedien

CV-1:	500 ml	DMEM High Glucose (4,5 g/l)
	50 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
GI-101A:	500 ml	RPMI 1640
	100 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	6 ml	Natriumpyruvat
	6 ml	HEPES (1 M)
	300 µl	BE2 (Östradiol/Progesteron)

Material

293FT-Zellen	500 ml	RPMI
	100 ml	FKS
	2 mmol	L-Glutamin
PC-3 / 4T1:	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
PC-3-RFP:	500 ml	RPMI 1640
	50 ml	FKS
	5 ml	Antibiotika (Pen/Strep)
	1 µg/ml	Balsticidin (frisch hinzufügen, alle 2 bis 3 Tage Medium erneuern)

2.5 Synthetische Oligonukleotide

Humanes β -Aktin:

Forward-Primer: 5'-CCT CTC CCA AGT CCA CAC AG-3'

Reverse-Primer: 5'-CTG CCT CCA CCC ACT C-3'

Murines β -Aktin:

Forward-Primer: 5'-CGT CCA TGC CCT GAG TC-3'

Reverse-Primer: 5'-GCT GCC TCA ACA CCTCAA C-3'

Vaccinia-Virus:

Forward-Primer: 5'-CGT AAA CTA CAA ACG TCT AAACAA GAA-3'

Reverse-Primer: 5'-CCT GGT ATA TCG TCT CTA TCT TTA TCA C-3'

Alle Primer wurden von Metabion, Martinsried, synthetisiert.

2.6 Antikörper

Primärantikörper	Isotyp	Spezies	Hersteller
Polyklonaler anti-LYVE-1 (ab14917)	Kaninchen IgG	Maus	Abcam, Cambridge
Polyklonaler anti-CD31 (sc-1506)	Ziege IgG2a	Maus	Santa Cruz, US-Santa Cruz
Monoklonaler anti-CD31 (MAB1398Z)	Hamster IgG	Maus	Millipore

Phalloidin-TRITC, fungal toxin isolated from the poisonous mushroom *Amanita phalloides*, Sigma-Aldrich, Steinheim

Sekundärantikörper	Isotyp	Spezies	Hersteller
Anti-Hamster, Cy5 konjugiert (127-175-099)	Goat IgG	Hamster	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Kaninchen, Cy2 konjugiert (711-225-152)	Esel IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Kaninchen, Cy3 konjugiert (711-165-152)	Esel IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Kaninchen, DyLight 649 konjugiert (711-495-152)	Esel IgG	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Ratte, Cy2 konjugiert (712-225-153)	Esel IgG	Ratte	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Ratte, Cy3 konjugiert (712-165-153)	Esel IgG	Ratte	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Ratte, DyLight 649 konjugiert (712-495-153)	Esel IgG	Ratte	Jackson ImmunoResearch, US-Pennsylvania
Anti-Ziege, HRP-konjugiert (A8919)	Kaninchen IgG	Ziege	Sigma, Steinheim

2.7 Rekombinantes Viruskonstrukt GLV-1h68

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem rekombinanten Viruskonstrukt GLV-1h68 [89] gearbeitet. GLV-1h68 wurde durch zielgerichtete Mutagenese des ursprünglichen Vaccinia Virus LVP konstruiert. Im Genort *F14.5L* trägt es ein Fusionsgen aus Renilla-Luziferase (*RUC*) und dem grün fluoreszierendem Protein (*GFP*), welches unter der Kontrolle eines early/late-Promotors steht. Des Weiteren wurde der Thymidinkinase-Locus (*TK*) durch die Insertion des revers zum early/late-Promotor (P_{SEL}) eingebauten humanen Transferrin-Rezeptor-Gens (*hTfR*) und durch die Insertion des Markergens β -Galaktosidase (*lacZ*), welches von dem Promotor p7.5 kontrolliert wird, ersetzt. Ein weiteres Markergen, welches für die β -Glucuronidase (*GusA*) kodiert, befindet sich im Hämagglutinin-Lokus (*HA*). Dieses Gen steht unter Kontrolle des viralen Promotors p11.



Abbildung 7: Viruskonstrukt GLV-1h68

GLV-1h68 wurde von der Genelux Corp., San Diego, USA, konstruiert und zu Analysezwecken der AG Szalay, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

2.8 Versuchstiere

Alle *in vivo*-Experimente wurden mit athymischen Nacktmäusen der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) durchgeführt. Charakteristisch für diese Mäuse ist eine autosomal, rezessive Mutation im *nu*-Lokus auf dem Chromosom 11. Diese Mutation bedingt den haarlosen Phänotyp und eine stark verminderte Anzahl von T-Lymphozyten. Alle Versuchstiere wurden als Gruppen in separaten, sterilen Käfigen mit steriler Einstreu und bestrahltem Nagetierfutter nach den Richtlinien der Regierung von Unterfranken und der Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) von Explora Biolabs (San Diego, USA) Spezies- und Stamm-gerecht gehalten.

2.9 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Hersteller
Anästhesie-Anlage	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
DNA-Gelelektrophorese Kammer	BIO-RAD, München
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektroblot-Apparatur	BioRad, München
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Filmkassette	Dr.Goos suprema, Heidelberg
Filterspitzen	Hartenstein, Würzburg
Flow-Hood LaminAir	Kendro, Langenselbold
Gelapparatur für Polyacrylamidelektrophorese	BioRad, München
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
Maestro EX Imaging System	CRi, Woburn, MA, USA
Mikroskope:	
• Axiovert 200M	Zeiss, Wetzlar
• DMIRB Inverses Mikroskop	Leica, Wetzlar
• MZ 16 FA Stereo-Fluoreszenzmikroskop	Leica, Wetzlar
• TCS SP2 Konfokales Mikroskop	Leica, Wetzlar
MRT, BioSpec	Bruker, Rheinstetten (Zur Verfügung gestellt vom Institut für Experimentelle Physik, Universität Würzburg)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
NightOWL LB 981 Imaging System	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
Röntgenfilme	Konica, München
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Schredder Fastprep	Thermo Scientific, Karlsruhe
Semi-Dry Blotapparatur	Peqlab, Erlangen
Sonifier Branson 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
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

2.10 Verwendete Software

Adobe Photoshop 7.0	Bildbearbeitung
Axiovision 4.5	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Zeiss)
Image J Software	Bildbearbeitung (http://rsbweb.nih.gov/ij)
Metamorph Imaging	Bildaufnahme (Inverses Mikroskop, Leica)
Microsoft Word 2007	Textverarbeitung
Microsoft Excel 2007	Diagramme und Statistik
Leica IM1000 4.0	Bildaufnahme (Stereomikroskop, Leica)
Leica Confocal 2.16	Bildaufnahme (Konfokales Mikroskop, Leica)
WinLight	Biolumineszenz-Imaging

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Eukaryontenzelllinien

Alle nachfolgend beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Flow-Hood durchgeführt. Die Kultivierung aller eukaryontischen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen und -platten verschiedener Größe, in einem sensorgesteuerten Inkubator, welcher optimale Wachstumsbedingungen (100 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C, 5 % CO₂) garantierte. Sämtliche Zellkulturmedien, Puffer und Arbeitsutensilien wurden vor Gebrauch sterilisiert. Alle Gegenstände, wurden dafür vor der Verwendung unter der Sterilbank mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zudem wurde zur Vorbeugung bakterieller Kontaminationen den Medien ein Antibiotikum zugefügt (Penicillin/Streptomycin). Fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Zugabe zum Medium 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Nur für die Kultivierung von 293FT-Zellen wurde nicht hitzeinaktiviertes FKS verwendet. Da Teilung und Wachstum nicht unbegrenzt erfolgen, sondern bei Konfluenz der Zellen stagnieren, wurden diese vor Erreichen von 100 % Konfluenz passagiert. Dafür wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und die auf dem Zellkulturflaschenboden adhärent wachsenden Zellen mit Hank's BSS gewaschen. Durch diesen Waschschrift, konnten abgestorbene Zellen und Mediumreste entfernt werden. Daraufhin wurden die Zellen für ca. 5 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. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von frischem Medium gestoppt, da dieses Trypsin-Inhibitoren Calcium und Magnesium enthält. Zellkontakte wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst und die so entstehende Zellsuspension konnte nun weiter kultiviert werden. Dafür wurde je nach Bedarf in einem bestimmten Verhältnis die Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß ausgesät. Eine regelmäßige Erneuerung des Kulturmediums nach zwei bis drei Tagen stellte sicher, dass noch ausreichend Inhaltsstoffe für das Wachstum der Zellen vorhanden waren sowie Abfallprodukte abgestorbener Zellen entfernt wurden. Der im Medium enthaltene pH-Indikator zeigt durch einen Farbumschlag von rot nach gelb den fortschreitenden Verbrauch der Nährstoffe im Medium an. Jede Zelllinie wurde in einem für sie optimierten Medium kultiviert. Bei der Kultivierung von PC-3-RFP-Zellen war zu beachten, dass es sich bei der PC-3-RFP-Zelllinie um eine stabil transfizierte Zelllinie handelt, welche das rot fluoreszierende Protein (RFP) exprimiert. Das für RFP kodierende Gen wurde zusammen mit einem Blastocidin-Selektionsmarker in die Zellen eingeführt. Um den Selektionsdruck

aufrecht zu erhalten, wurde dem Medium das Antibiotikum Blastidicin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt und die Zugabe alle 2-3 Tage wiederholt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Für viele Versuche sowie das Passagieren der Zellen, war eine genaue Bestimmung der Zellzahl notwendig. Zu diesem Zweck wurde 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 wurde aus jedem großen Quadrat jeweils eine Reihe aus 4 kleinen Quadraten unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung der vorhandenen Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

Zellzahl/ml = gezählte Zellzahl x 10^4 x Verdünnungsfaktor der Zellsuspension

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100 %, wurden die Zellen mit Hank's BSS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellsuspension bei 1300 rpm, für 5 min zentrifugiert. Durch Aufnehmen des Zellpellets in einem entsprechendem Volumen Einfriermedium, wurden Aliquots mit 5×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden zunächst für 4 h bei -20 °C und weiter über Nacht bei -80 °C abgekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen für ca. 30 s in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach Zugabe von erwärmtem Kulturmedium wurden die Zellen zentrifugiert (900 rpm, 5 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert, um tote Zellen zu entfernen.

3.1.4 Generierung von PC-3-RFP-Zellen durch lentivirale Transduktion

Zur Visualisierung wurde das rot fluoreszierende Protein (RFP) in die PC-3-Zellen eingefügt. Dies geschah durch lentivirale Transduktion mit Hilfe des Vira Power™ Lentiviral Expression Systems von Invitrogen. Durch dieses System kann man Lentiviren erzeugen, die ein

gewünschtes Gen in das Säugerzellgenom einführen und dort zu dessen Expression führen. Es handelt sich hierbei um eine stabile Langzeitexpression des gewünschten Gens [124].

Zuerst wurde in den pLENTI6/V5-Expressionsvektor RFP kloniert (S. Weibel). Durch eine anschließende Kotransfektion des Vira Power™ Packaging Mix und dem pLENTI6/V5-RFP-Vektor in 293FT Zellen wurde das nicht zur Replikation fähige, RFP kodierende, Lentivirus hergestellt. Dieses konnte zur Transduktion der PC-3 Zielzelllinie benutzt werden. Als Selektionsmarker wurde Blasticidin verwendet, da die pLENTI6/V5-Expressions-Konstrukte ein Blasticidinresistenzgen enthalten, welches somit in Kombination mit dem RFP in die PC-3-Zelllinie integriert wurde und mit dessen Hilfe anschließend stabil transfizierte Zellen selektiert werden konnten. Nach erneuter Vereinzelnung eines RFP-exprimierenden Zellklons wurde die stabil RFP-exprimierende Zelllinie PC3-RFP gewonnen. Durch durchflusszytometrische Analysen und Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass sämtliche Zellen dieser Zelllinie RFP exprimieren.

3.2 Mausexperimentelle Methoden

3.2.1 Implantation von PC-3- und PC-3-RFP-Zellen

Für alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden 5-6 Wochen alte, athymischen *Nude*-Mäuse verwendet. Die zu implantierenden PC-3-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Ein Tag vor Implantation erfolgte ein Mediumwechsel. Für die anschließende Implantation der Zellen wurden diese zunächst gewaschen, trypsiniert und durch Zentrifugation (800 rpm, 5 min) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf das gewünschte Volumen so eingestellt, dass sich jeweils 2×10^6 PC-3-Zellen in 100 μ l PBS befanden. Die Implantation dieser Zellsuspension erfolgte, falls nicht anders angegeben, an der rechten, hinteren Flanke der Maus. Die Injektionsstelle wurde mit Hilfe von Alco-Preps desinfiziert und die Zellen mit einer 29G^{1/2} Insulinspritze injiziert. Je Maus wurden 100 μ l Zellsuspension verabreicht. Mit Hilfe einer digitalen Schieblehre wurde das Tumorstadium nun in regelmäßigen Abständen kontrolliert und dokumentiert. Dabei wurde die Tumorstadium wie folgt ermittelt:

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

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

3.2.2 Injektion von GLV-1h68

Durch Injektion von GLV-1h68 sollte zum einen herausgefunden werden, ob dieses eine Metastasen-inhibierende Wirkung besitzt und zum anderen, wie das Virus sich in Tumoren und Metastasen repliziert.

Um herauszufinden, ob GLV-1h68 einen Einfluss auf die Bildung oder das Wachstum von PC-3-Metastasen besitzt, wurde GLV-1h68 intravenös, durch eine einmalige Injektion von 5×10^6 *plaque forming units* (PFU) in 100 µl PBS in eine laterale Schwanzvene appliziert. Die Injektion erfolgte ca. 3-4 Wochen nach Implantation der PC-3- und PC-3-RFP-Tumorzellen. GLV-1h68 wurde vor Injektion aufgetaut und zum Lösen eventuell auftretender Virusaggregate 3mal für 30 s sonifiziert. Der Injektionsvorgang wurde erleichtert, indem die Tiere zur Gefäßerweiterung für 10 min mit einer Infrarot-Wärmelampe bestrahlt und die Injektionsstelle mit Alco-Preps desinfiziert wurde.

Zur Untersuchung der Kolonisierung von Metastasen und Tumoren durch GLV-1h68 wurden je 1×10^7 *plaque forming units* (PFU) GLV-1h68 intravenös, intratumoral und intraperitoneal in PC-3-RFP-Tumor-tragende Mäuse injiziert. Die Injektion erfolgte hierbei erst 8-9 Wochen nach der Implantation, um sicher zu gehen, dass die Metastasenbildung in den Mäusen schon erfolgte, bevor die Viren injiziert wurden. Auch hierfür wurde GLV-1h68 vor der Injektion sonifiziert.

3.2.3 Narkose

Zur Betäubung wurde ausschließlich die Inhalationsnarkose mit 1,5-3 % Isofluran eingesetzt. Isofluran ist ein leichtflüchtiges Anästhetikum mit hypnotischer und muskelrelaxierender Wirkung. Die zu untersuchenden Mäuse wurden dafür in eine Inhalationskammer gesetzt, in welcher das Narkosemittel in Gasform appliziert wurde. Da Isofluran einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten hat, findet eine rasche Reaktion auf steigende oder sinkende Isofluran-Konzentration statt.

3.2.4 Visualisierung von PC-3-Tumoren und Metastasen

3.2.4.1 Visualisierung mit Hilfe des Fluoreszenz-Imaging

Durch das von den PC-3-Zellen exprimierte RFP war es möglich, PC-3-RFP-Tumore und Metastasen zu visualisieren. Zum einem konnte dies mit Hilfe des Stereo-Fluoreszenzmikroskops mit digitaler CCD-Kamera, zum anderem durch das Maestro EX Imaging System geschehen. In beiden Fällen konnten PC-3-RFP-Tumore an lebenden

Mäusen detektiert und dokumentiert werden. Für das Visualisieren im Maestro EX Imaging System wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. PC-3-RFP-Metastasen konnten größtenteils nur *post mortem* detektiert werden. Dafür wurde der Bauchraum geöffnet und durch Entnahme von Darm, Milz und Nieren die Metastasen freigelegt. Die Auswertung der Bilder des Stereo-Fluoreszenzmikroskop erfolgte mit Photoshop, die des Maestro EX Imaging Systems mit der dazugehörigen Maestro Software v2.4.

3.2.4.2 Visualisierung mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Untersuchungsverfahren, mit welchem das Körperinnere dargestellt werden kann, ohne dabei z.B. Röntgenstrahlung zu verwenden. Mit dieser Methode lassen sich verschiedene Gewebetypen im Körper sichtbar machen, wobei unter anderem der Wassergehalt von diesen ausschlaggebend für den jeweiligen Kontrast ist und zur Darstellung beiträgt. Der zu untersuchende Körperabschnitt lässt sich dabei in beliebig angelegten Längs- oder Querschichten wiedergeben. Es wird mit einem starken Magnetfeld, sowie mit elektromagnetischen Wechselfeldern im Radiofrequenzbereich gearbeitet. Die positiv geladenen Kerne der Wasserstoffatome, die Protonen, orientieren sich in Richtung des Magneten. Werden Radiowellen auf die Protonen gerichtet, nehmen diese die Energie auf und werden so von ihrer Ausrichtungsachse abgelenkt. Nach Abschalten der Radiowellen kehren die Protonen in ihre Ausgangsform zurück und geben dabei die aufgenommene Energie in Form schwacher Radiowellen wieder ab, die für diesen Vorgang benötigte Zeit bestimmt die Relaxationzeit. Die abgeschwächten Signale werden aufgefangen und durch ein computergestütztes Rechnerverfahren in ein Bild umgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine *in vivo* Detektion von PC-3-Metastasen mit der MRT Technologie möglich ist, wobei mit einer von der Relaxationszeit T2 abhängige Bildgebung zur Erzeugung von Querschnittsbildern gearbeitet wurde. Die Mäuse wurden vor und während der MRT-Messung mit Isofluran narkotisiert. Da eine Messung länger als 30 min dauern kann, wurde die Atmung während der Messung fortwährend kontrolliert.

3.2.5 Entnahme von Tumoren, Metastasen und Organen

Für viele Untersuchungen mussten Tumore, Metastasen und Organe entnommen werden. Dafür wurden zu definierten Zeitpunkten nach Implantation bzw. Injektion mit GLV-1h68 die Tiere zunächst mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Bei der Präparation von Tumoren und Metastasen wurde darauf geachtet, das umgebende Binde-, Muskel- oder Knochengewebe möglichst vollständig zu entfernen. Je nach

Verwendungszeit wurden die entnommenen Tumore und Metastasen anschließend homogenisiert oder in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80 °C gelagert. Lungen, aus denen später die RNA isoliert werden sollte, wurden in 1 ml RNA-Later überführt und nach einer Inkubation ÜN bei 4 °C bei -80 °C gelagert. Die Entnahme von Blutproben erfolgte durch Herzpunktion. Damit nachfolgend RNA aus dem Blut isoliert werden konnte, wurde dieses direkt nach der Entnahme in eine spezielle Blut-RNA-stabilisierende-Lösung (im RNeasy® Protect Animal Blood Kit enthalten) gegeben und bei -20 °C gelagert.

3.3 Isolierung und Analyse von RNA aus Tumoren, Metastasen und Lungen

Mit Hilfe von Isolierung und Analyse der RNA sollte ein Nachweis humaner Zellen in Tumoren und Lymphknoten erbracht werden. Der Nachweis humaner PC-3-Zellen erfolgte durch Anwendung der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion). Diese 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. In diesem Fall wird so z.B. ermöglicht, humanes und murines Gewebe voneinander zu unterscheiden, was in dieser Arbeit durch die Verwendung von Primern für humanes beziehungsweise murines β -Actin geschah.

3.3.1 RNA-Isolierung aus humanen und murinen Zellen

Die Spezifität der murinen und humanen Primer wurde sichergestellt, indem diese zuerst in RT-PCRs mit RNA-Isolaten aus einer humanen Zelllinie (GI-101A) bzw. einer murinen Zelllinie (4T1) getestet wurden. Dafür wurden GI-101A- und 4T1-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und die RNA mit Hilfe des RNeasy® Mini-Kits von Qiagen nach dem dazugehörigen Protokoll isoliert. Hierbei wurden die Zellen zunächst homogenisiert, die RNA an eine Matrix gebunden, gereinigt und schließlich in RNase-freiem Wasser eluiert.

3.3.2 RNA-Isolierung aus Tumor- und Lymphknotengewebe

Die Isolierung von RNA aus Geweben erfolgte durch Verwendung von Trizol. Tumore, vergrößerte Lymphknoten und Lungen wurden aus den Versuchstieren präpariert, mit Hilfe eines Skalpells erst grob zerkleinert und anschließend in mit Hilfe des FastPrep-Disrupter unter Verwendung spezieller, mit Keramik-Beads gefüllter Reaktionsgefäße, mechanisch homogenisiert. Dafür wurden in die Reaktionsgefäße ein entsprechendes Volumen von Trizol gegeben. In 1 ml Trizol wurden 200 mg Gewebe 3-5 mal bei maximaler Geschwindigkeit für 20 s geschreddert. Um die RNA-Ausbeute bei der Isolierung aus Lymphknoten zu optimieren, wurde ein Lymphknoten in nur 0,8 ml Trizol mit zusätzlich 10 µl β-Mercaptoethanol (zusätzliche Inaktivierung von RNasen) und 10 µl Glykogen (zur Erleichterung des Übergangs der RNA in die wässrige Phase) geschreddert. Dem homogenisierten Gewebe wurde anschließend je ml 200 µl Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde mehrmals invertiert und für 3 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 4 °C und 9000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl Isopropanol versetzt, um die RNA auszufällen (500 µl Isopropanol je 1 ml Trizol-Gewebegemisch). Nach einer darauffolgenden Inkubation von 10 min bei RT folgte abermals ein Zentrifugationsschritt, diesmal für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm. Die entstandenen Pellets wurden in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 13000 rpm, 4 °C für 8 min zentrifugiert. Abschließend wurden die Pellets vollständig an der Luft getrocknet und in einem angemessenen Volumen DEPC-Wasser gelöst. Tumor-RNA wurde in 100 µl, Lymphknoten-RNA in 20 µl gelöst.

3.3.3 Analyse der RNA im Agarosegel

Zur Sicherstellung, dass bei der isolierten RNA keine Degradation durch eine eventuelle RNasen-Kontamination vorlag, wurden je 2 µl RNA auf ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel wurde in 1x TAE-Puffer hergestellt, welcher auch als Laufpuffer verwendet wurde. Auf 50 ml Agaroselösung wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gegeben. Vor dem Auftragen der RNA-Proben, wurde diesen noch je 4 µl Formamid und 6 µl RNA-Probenpuffer hinzugefügt. Die RNA-Proben wurden daraufhin für 5 min bei 60 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach dem Beladen des Gels erfolgte die Auftrennung bei 60 V. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Erst nachdem sichergestellt wurde, dass zwei distinkte RNA-Banden (18S und 28S) vorlagen und kein Abbau durch RNasen stattgefunden hatte, wurde mit den Proben weitergearbeitet.

3.3.4 DNA-Verdau und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Verhinderung unerwünschter Amplifikation genomischer DNA in der späteren PCR wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des DNA-free™ Kit von Ambion durchgeführt. Für die anschließende cDNA-Synthese wurde die RNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen DEPC-Wasser als Referenz bestimmt. Hierzu wurden die Tumorproben 1:100 und die Lymphknotenproben 1:50 in DEPC-Wasser verdünnt und in eine Einmalküvette überführt.

3.3.5 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus der zuvor isolierten mRNA als Matrize erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase unter Verwendung des Kits Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis. 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. 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 RNA und 1 µl Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Nach einem Inkubationsschritt von 5 min bei 70 °C wurde Reaktionspuffer, dNTP-Mix und 1 µl Ribonuklease 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 wurde die enzymatische Reaktion durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C abgestoppt. Im Anschluss daran kann die DNA-Amplifikation mittels PCR durchgeführt werden.

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode nach Mullis [125] eignet sich hervorragend zum Nachweis kleinster Mengen von DNA durch deren Amplifikation. Hierbei wird ein doppelsträngiges DNA-Molekül, welches die zu untersuchende Sequenz beinhaltet, als Matrize für neue Amplifikationsprodukte eingesetzt. Dieses wird durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, so dass zwei DNA-Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt binden durch das Herabsetzen der Temperatur die zugegebenen 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 eingestellt und die Nukleotide an die entstehenden Doppelstränge angefügt. 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 deshalb zu meiden. Zur Verhinderung der Bildung von Primer-Hybriden ist zusätzlich darauf zu achten, dass keine Komplementarität zwischen den Primer-Paaren besteht.

Die zuvor in cDNA umgeschriebenen RNA-Proben wurde auf diese Weise, unter dem Einfluss der DNA-Polymerase Phusion™, amplifiziert. Für die Identifikation von PC-3-Zellen in Tumoren und Lymphknoten wurden Primer für das humane β -Aktin verwendet. Als Positivkontrolle für Proben aus der Maus wurden Primer für das murine β -Aktin verwendet. Des Weiteren wurde auch das Vorhandensein von GLV-1h68 analysiert. Dies geschah durch Verwendung von Primern für das Vaccinia-Virus spezifische Gen A21L.

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

PCR-Programm:	Heißstart:	95 °C	5 min
	1. Denaturierung:	95 °C	30 s
	2. Annealing:	58 °C	30 s
	3. Elongation:	72 °C	5 s
	→ 29 Wiederholungen von Schritt 1 bis 3		
	4. Elongation	72 °C	7 min
	5. 4 °C	Pause	

3.3.7 Analyse des PCR-Produkts im Agarosegel

Zur Untersuchung der durch die PCR gewonnenen DNA wurden 1,6%ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Auf 50 ml Agaroselösung werden 5 μ l Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) gegeben. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt. In die erste Tasche wurde ein DNA-Marker als Größenstandard geladen. Zu den DNA-Proben wurde 5x Probenpuffer gegeben und nach Beladen des Gels erfolgte

die Auftrennung bei 90 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Banden der PCR-Produkte analysiert.

3.4 Isolierung und Analyse von Proteinen aus Tumoren und Metastasen

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Untersuchung von PC-3-Tumoren und -Metastasen auf Proteinebene, war es erforderlich das Gewebe zunächst in Proteinlysepuffer zu homogenisieren. Die Tumore und Metastasen wurden entnommen und nach einer anfänglichen, groben Zerkleinerung des Gewebes wurden die Proben in dem FastPrep-Disrupter unter Verwendung spezieller, mit Keramik-Beads gefüllter Reaktionsgefäße, mechanisch homogenisiert. Die Reaktionsgefäße wurden mit Proteinlysepuffer gefüllt. Zur Vermeidung einer Protein-Degradierung war es sehr wichtig, sämtliche Schritte auf Eis durchzuführen und eine Erhitzung der Proben zu vermeiden. Die homogenisierte Gewebe-Suspension wurde zur Separierung von restlichen Zell- und Gewebestandteilen für 20 min zentrifugiert (4 °C, 13000 rpm), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein von Bradford (1976) etabliertes Verfahren eingesetzt. Diese Methode macht sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm zu 595 nm nach Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste von Polypeptiden zunutze. Hiefür wurde zunächst eine Eichgerade mit Hilfe definierter Proteinmengen von 0,1; 0,5; 1; 2; 6 und 12 µg/ml BSA erstellt. Anhand dieser Eichgerade war die spätere Berechnung der Proteinkonzentration der Tumor- und Lymphknotenlysate möglich. Für die Proteinmessung wurde je 1 µl der Lysate in 99 µl H₂O_{bd} gegeben und dieser Ansatz mit 900 µl Bradford-Reagenz vermischt. Das Ansetzen dieses Gemisches erfolgte in Einmalküvetten. Nach einer 5minütigen Inkubationszeit bei RT konnte nun die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Durch Einsetzen der Messwerte in die zuvor erstellte Eichgerade konnte die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

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

Abschließend sollten die Proteine an Hand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dies wurde durch das Anwenden der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht. Hierzu wurde ein Gel aus Acrylamid und Bisacrylamid, dessen Porengröße anhand der Acrylamidkonzentration variiert werden kann, verwendet. Zunächst wurde durch Hinzufügen von Natriumdodecylsulfat (SDS) die Raumstruktur der Proteine zerstört und mittels des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken reduziert. Zudem führte die Zugabe von SDS zu einer, proportional dem Molekulargewicht der Proteine, negativen Ladung. Beide Reagenzien waren Bestandteile des SDS-Probenpuffers, der vor dem Gellauf zu den Proben pipettiert wurde. Die eigentliche Auftrennung erfolgte im Trenngel über ein gleichmäßiges elektrisches Feld zwischen Anode und Kathode, wobei die Proteine durch ihre SDS-induzierte negative Ladung anionisch wanderten. Da die Ladungen praktisch gleich sind, war das einzige Kriterium, welches die Wandergeschwindigkeit beeinflusst, das Molekulargewicht.

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels wurde zunächst in den Zwischenraum von zwei Glasplatten, welche durch einen Abstandshalter getrennt waren, das Trenngel gegossen. Die Katalysatoren APS und TEMED sorgten für die Polymerisation der Acrylamid- und Bisacrylamidmonomere, wodurch ein stark vernetztes Gel entstand. Zur Schaffung einer glatten Oberfläche, wurde die Trenngel-Lösung mit ca. 1 ml Isopropanol beschichtet, bis die Polymerisation abgeschlossen war. Danach wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und der Kamm eingesetzt. Je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine konnte man den Anteil an Acrylamid im Trenngel verändern. Die Gele wurden nach folgendem Schema angefertigt:

Reagenzien	Trenngel 8 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O _{bidest.}	4,6 ml	3,05 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid	2,7 ml	0,65 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	/
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	/	1,25 ml
10 % SDS	100 μ l	50 μ l
10 % APS	100 μ l	25 μ l
TEMED	6 μ l	5 μ l

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt, deren Kammern mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt wurden. Die Proben mit dem SDS-Probenpuffer wurden vor Beladung des Gels für 5 min auf 95 °C erhitzt und dadurch vollständig denaturiert. In die erste Tasche des Gels wurde der Proteinmarker zur späteren Identifizierung der Proteine gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 110 V.

3.4.4 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran durch Western-Blot

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 [126]. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotapparatur, in der die denaturierten Proteine durch Wanderung in einem Ionengradienten auf die Membran überführt wurden, auf welcher sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben. 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 wurden zunächst sechs Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und kurz in Towbin-Puffer getränkt. Die für den anschließenden 2-stündigen Proteintransfer angelegte Stromstärke ist von der Größe des Gels abhängig und wird nach folgender Formel berechnet:

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

Um die Effizienz des Proteintansfers zu überprüfen, wurde die Membran für einige Minuten mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt. Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Nach vorsichtigem Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$, sind rote Proteinbanden auf weißem Hintergrund zu erkennen.

3.4.5 Immundetektion mittels ECL

Durch die Immundetektion mittels ECL-Methode können die Proteine, welche auf die Membran übertragen wurden, visualisiert werden. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primär-Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper wiederum bindet ein sekundärer, HRP (*horseradish* Peroxidase)-gekoppelter Antikörper, über welchen die Detektion erfolgt. Diese Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol zu 5-Aminophtalsäure mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel.

Die Oxidation des Luminols bewirkt eine Lichtemission, die durch die Exposition mit einem Röntgenfilm erfasst werden kann.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert, um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern und so eine spezifische Detektion zu ermöglichen. Dieser Vorgang erfolgte mit Hilfe einer 5%igen Milchpulverlösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran mit dem proteinspezifischem Primärantikörper in 1x TBT für 1,5 h behandelt. Daraufhin wurde der entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in 1x TBT verdünnt wurde, für wiederum 1,5 h auf die Membran gegeben. Vor und zwischen den einzelnen Behandlungen mit Antikörperlösungen wurde die Blotmembran je dreimal für 10 min in 1x TBT gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen auf der Membran zu gewährleisten, wurden alle Inkubationsschritte auf dem Schüttler durchgeführt. Zur Detektion wurde die ECL-Lösung auf die Membran gegeben und für 1 min inkubiert. In der Dunkelkammer wurde anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach verwendeten Antikörpern die optimale Expositionszeit ermittelt. Eine Quantifizierung der Lichtemission der einzelnen Banden auf den Membranen geschah zusätzlich mit Hilfe des Night-Owl-Imagers.

3.5 Analyse des Virustiters in Tumoren und Metastasen

Das Replikationsverhalten von GLV-1h68 in PC-3-Tumoren und -Metastasen wurde untersucht, indem die Anzahl von Viruspartikeln mit Hilfe des Plaque-Assays bestimmt wurde. Der Assay wurde mit Hilfe von konfluenten CV-1-Zellen in 24-Well-Platten durchgeführt. Bevor der Plaque-Assay durchgeführt werden konnte, wurden Homogenisate von PC-3-Tumoren und Metastasen hergestellt. Dieser Schritt erfolgte hierbei analog zur Homogenisierung für die Proteinisolierung. Daraufhin wurden die zu analysierenden Proben 3x für 30 s sonifiziert und Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-6} mit Infektionsmedium (CV-1-Medium mit nur 2 % FKS) angesetzt. Die CV-1-Zellen wurden gewaschen und mit 250 μ l der jeweiligen Verdünnung infiziert. Pro Verdünnung wurden zwei Wells infiziert und in der Endauswertung ein Mittelwert der beiden gebildet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit der Verdünnungen wurde pro Well 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 wurde nach zweitägiger Inkubation durch Zugabe von 250 μ l Kristallviolett-Färbelösung durchgeführt. Nach 24 h Inkubation konnte der Farbstoff im Wasserbad abgewaschen werden. Die Platten wurden getrocknet und die

einzelnen Plaques gezählt. Anhand der ausgezählten Plaques wurde der Virustiter in Tumoren und Metastasen wie folgt berechnet:

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

3.6 Analyse von Tumoren und Metastasen auf histologischer Ebene

Die immunhistochemische Analyse von Lymphknoten, PC-3-Tumoren und -Metastasen, wurde mit Hilfe von Agaroseschnitten durchgeführt. Hierfür wurden entsprechende Proben aus dem Versuchstier herauspräpariert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Fixierung wurden die Präparate im gefrorenen Zustand in eine 4%ige PFA-Lösung gegeben und ÜN bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Proben in 5 % LMP-Agarose eingebettet. Nach Aushärtung der Agarose bei 4 °C wurden am Vibratom Gewebeschnitte von 100 µm Dicke angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden für 1 h bei RT in 1x PBS mit 0,2 % Triton X-100 und 5 % FKS gegeben. Durch Triton X-100 wurde das Gewebe permeabilisiert und durch FKS unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechendem Primärantikörper (anti-CD31 oder anti-LYVE-1, 1:100 in 1x PBS mit 0,2 % Triton X-100 und 5 % FKS) ÜN bei RT auf dem Schüttler. Nachdem durch drei zehnmütige Waschschrirte mit 1x PBS alle Reste des Primärantikörpers entfernt wurden, vervollständigte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörpern (anti-Hamster oder anti-Kaninchen konjugiert mit Farbstoffen, 1:200 in 1x PBS mit 0,2 % Triton X-100 und 5 % FKS) für 4 h die Immunfluoreszenz. Zusätzlich wurde Hoechst (Stammlösung 50 mg/ml, 1:400) zu den Schnitten gegeben, um später die Detektion von Zellkernen zu ermöglichen. Anschließend wurden nach drei letzten Waschschrirten die Schnitte in Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Die Analyse erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop ausgestattet mit einer CCD-Kamera, mit welcher die Bilder festgehalten werden konnten.

3.6.1 Auswertung der Fluoreszenzintensität

Zur Auswertung der Fluoreszenzintensität, wurden Bilder von je vier Arealen pro Schnitt fluoreszenzmikroskopisch unter identischen Bedingungen aufgenommen. Daraufhin wurden mit Hilfe von Photoshop 7.0 die RGB-Bilder zu Bildern in Graustufen (Intensitätsbereich 0-255) umgewandelt und die Fluoreszenzintensität der CD31 und LYVE1-Färbung mit Hilfe der

Image J Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) ermittelt. Die Fluoreszenzintensität repräsentiert die durchschnittliche Helligkeit aller für die jeweilige Färbung positiver Pixel.

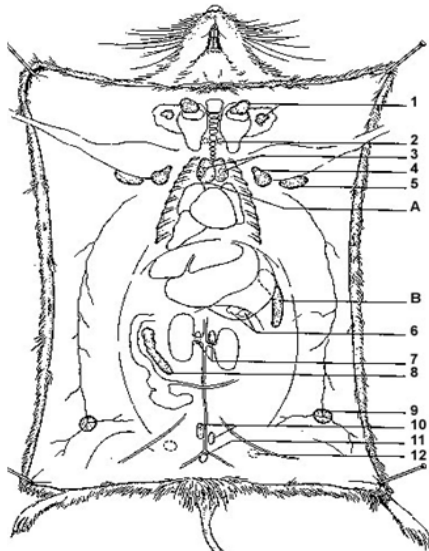
3.6.2 Auswertung der Anzahl von Gefäßstrukturen

Zur Ermittlung der Anzahl von Blut- und Lymphgefäßen, wurden Bilder von je vier Arealen pro Schnitt fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde für jedes Bild individuell eingestellt, damit alle Blut- und Lymphgefäße eines Areals unabhängig von deren Signalstärke erfasst werden konnten und deutlich zu sehen waren. Für die Auswertung der Aufnahmen wurden mit Hilfe von Photoshop 7.0 über die Bilder der CD31- bzw. LYVE1-Färbung je 8 identische horizontale Linien gelegt. Alle von den Linien geschnittenen Gefäße, wurden gezählt. So wurde die Anzahl der Gefäße pro Fläche ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Vergrößerte Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen

Grundlage dieser Arbeit bildete die Beobachtung vergrößerter Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen. Diese wurden erstmals 60 Tage nach der Implantation von PC-3-Tumoren nachgewiesen.



1. Lnn. cervicales superficiales (Buglymphknoten)
2. Lnn. cervicales profundi
3. Lnn. mediastinales
4. Lnn. axillares (Achsellymphknoten)
5. Lnn. brachiales (Oberarmlymphknoten)
- A. Thymus
- B. Milz
6. Lnn. portales (Lymphknoten des Pankreas)
- 7. Lnn. renales (Lymphknoten der Niere)**
8. Lnn. mesenterici (Darmlymphknoten)
9. Lnn. inguinales (Leistenlymphknoten)
- 10. Lnn. lumbales (Lendenlymphknoten)**
11. Lnn. sacrales (Kreuzbeinlymphknoten)
12. Lnn. ischiadici (Sitzbeinlymphknoten)

Abbildung 8: Das Lymphsystems der Maus. Lokalisation von Thymus, Milz und Lymphknoten [127].

Unter der Vielzahl von Lymphknoten einer Maus (Abb. 8) waren in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen die lumbalen und renalen im Vergleich zu jenen in Kontrollmäusen ohne implantierten Tumor deutlich vergrößert (Abb. 9).

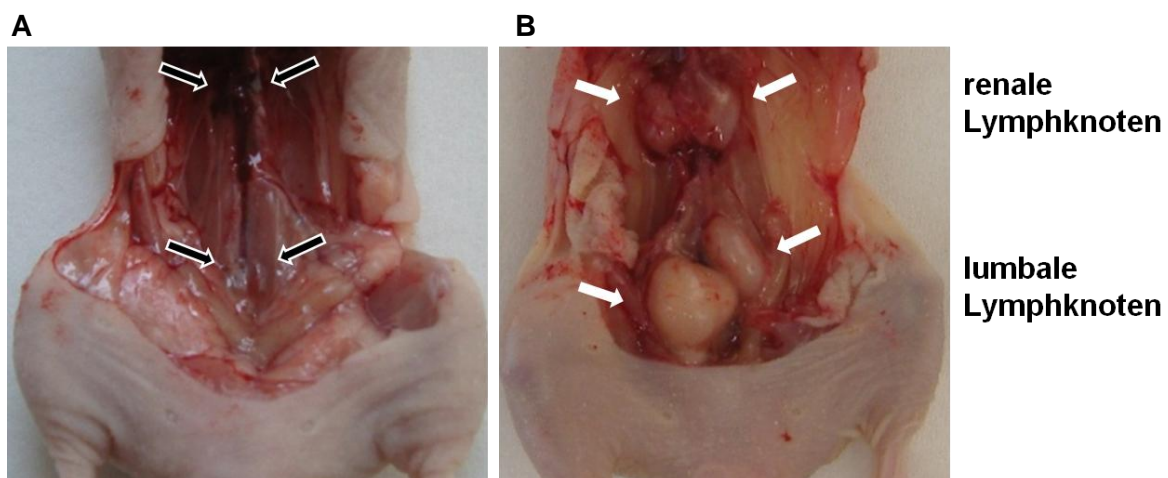


Abbildung 9: Vergrößerung der lumbalen und renalen Lymphknoten nach Implantation von PC-3-Tumoren. (A) Lymphknoten einer nicht-Tumor-tragenden Maus (schwarze Pfeile) und (B) Lymphknoten einer PC-3-Tumor-tragenden Maus (weiße Pfeile). 60 Tage nach Implantation der PC-3-Tumore.

4.2 Zeitlicher Verlauf der Vergrößerung von Lymphknoten

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, Gründe für die Vergrößerung der Lymphknotenpaare zu finden. Eine Vermutung war, dass durch die Implantation der PC-3-Tumore eine Immunantwort, mit der Folge einer enormen Rekrutierung von Immunzellen in die Lymphknoten, ausgelöst wurde, was wiederum die Vergrößerung verursachen könnte. Weiterhin wurde vermutet, dass die Vergrößerung durch eine massive Migration von PC-3-Zellen in die Lymphknoten ausgelöst wurde und dass es sich bei den vergrößerten Lymphknoten somit um Metastasen handelt. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurde zuerst der zeitliche Verlauf der Vergrößerung analysiert. Hierfür wurden 2×10^6 PC-3-Zellen subkutan in die rechte Flanke von insgesamt 24 Mäusen implantiert. Anschließend wurden 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage nach Implantation die Lymphknoten von je vier Mäusen auf ihre Größe hin analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Volumen der Lymphknoten von Woche zu Woche zunimmt (Abb. 10).

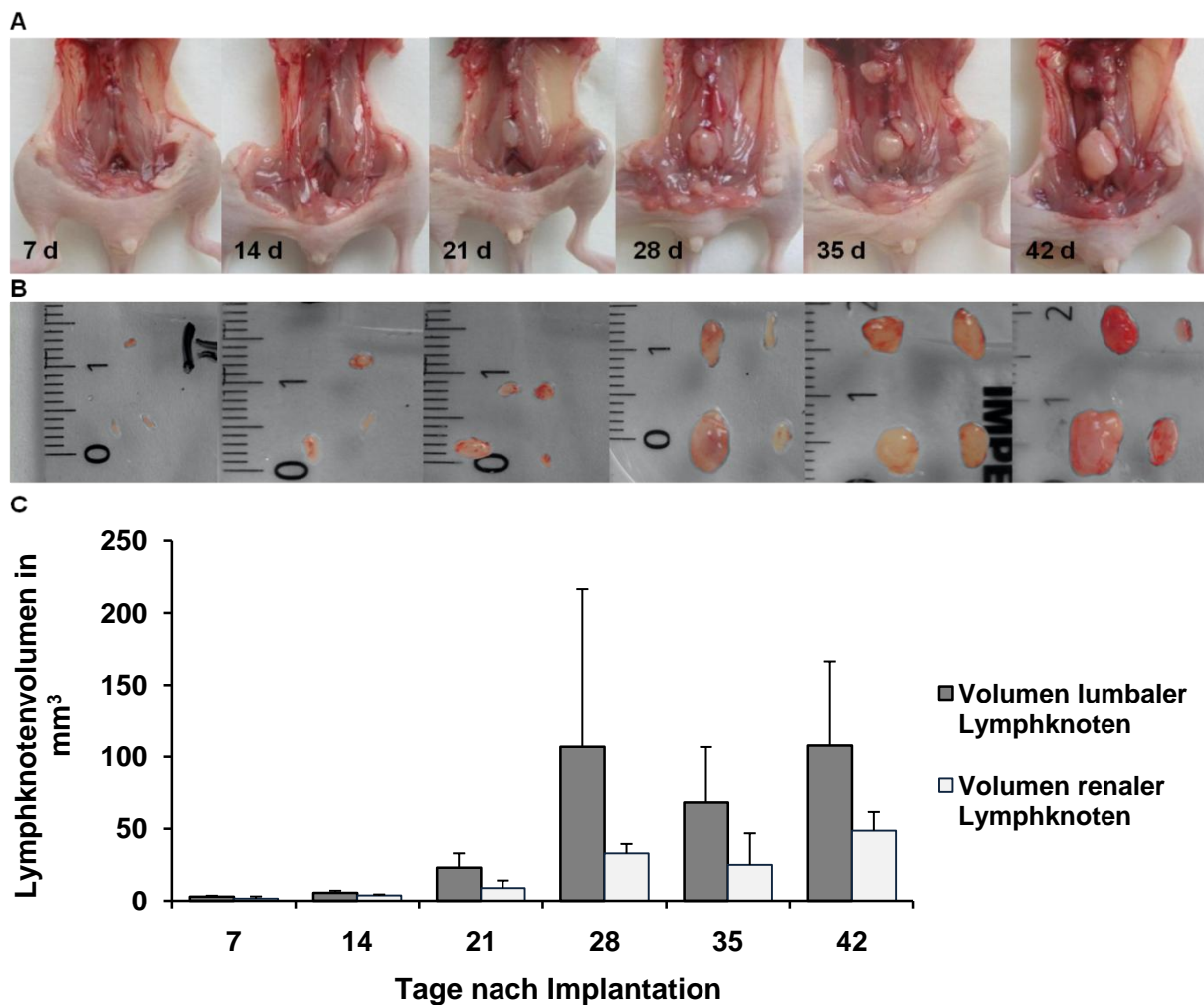


Abbildung 10: Lymphknoten von PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage nach Implantation. (A) PC-3-Tumor-tragende Mäuse mit geöffnetem Bauchraum, (B) Präparierte lumbale und renale Lymphknoten, (C) Volumen der lumbalen und renalen Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen in mm³.

Darüber hinaus konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass das Volumen der Lymphknoten, die sich in unmittelbarer Nähe des Tumors befanden, zuerst zunahm. Der lumbale Lymphknoten, der neben dem Tumor lokalisiert ist, wurde in dieser Arbeit als LN1 bezeichnet, der daneben befindliche als LN2. RN1 ist der renale Lymphknoten, welcher näher zum Tumor gelegen ist. RN2 schließt sich RN1 an (Abb. 11A). Das Volumen von LN1 nahm nach Implantation des PC-3-Tumors zuerst zu, gefolgt von LN2 und RN1 (Abb. 11B).

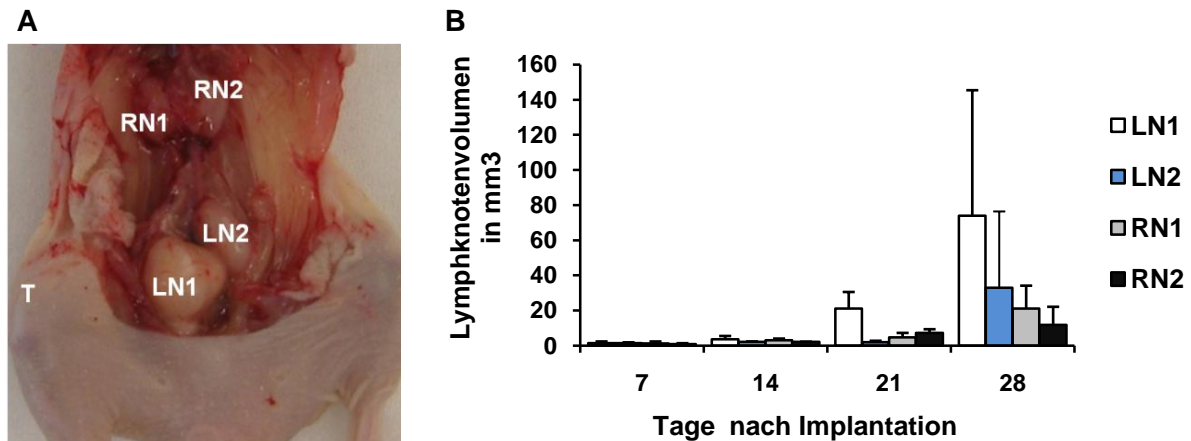


Abbildung 11: Vergrößerung der Lymphknoten in Abhängigkeit von deren Lokalisation. (A) Lokalisation von LN1, LN2, RN1 und RN2 in PC-3-Tumor-tragender Maus 60 Tage nach Implantation. (B) Volumen von LN1, LN2, RN1 und RN2 7, 14, 21 und 28 Tage nach Implantation in mm³. Gemessen wurde das Volumen der Lymphknoten von vier Mäusen pro Zeitpunkt.

4.3 Nachweis humaner PC-3-Zellen in vergrößerten Lymphknoten

Anschließend sollte jeder vergrößerte Lymphknoten auf das Vorhandensein von PC-3-Zellen hin getestet werden, um herauszufinden, ob sich in den Lymphknoten metastasierende Zellen befinden. Der Nachweis von PC-3-Zellen erfolgte mit Hilfe einer RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin. Als Positivkontrolle wurden Primer für murines β -Aktin eingesetzt. Um die Spezifität dieser Primerpaare zu testen, wurde die RT-PCR zuerst mit cDNA einer humanen Zelllinie, GI-101A, und einer murinen Zelllinie, 4T1, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Primer für GAPDH eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die zu erkennenden Banden analysiert (Abb. 12). Im Falle der GI101-A-Zelllinie konnte eine distinkte, klare Bande für humanes, nicht aber für murines β -Aktin detektiert werden. Für die 4T1-Zelllinie war nur für das murine, nicht aber für das humane β -Aktin eine deutliche Bande zu erkennen. So wurde sichergestellt, dass die Primer für humanes β -Aktin ausschließlich humane Zellen detektieren und es nicht zu einer unspezifischen Amplifikation von murinem β -Aktin kommt.

Ergebnisse

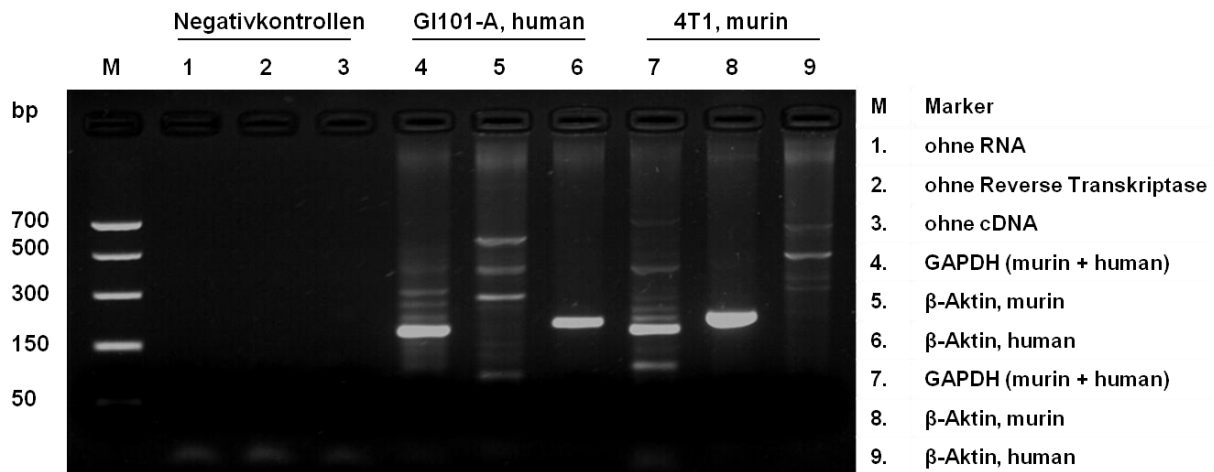


Abbildung 12: PCR-Produkte des Tests der Primer für humanes und murines β -Aktin. Spur 1-3: Negativkontrollen, Spur 4 und 7: Banden für GAPDH als Positivkontrolle, Spur 5: murines β -Aktin in GI101-A-Zellen, Spur 6: humanes β -Aktin in GI101-A-Zellen, Spur 8: murines β -Aktin in 4T1-Zellen und Spur 9: humanes β -Aktin bei 4T1-Zellen.

Nachdem die Spezifität der Primerpaare für murines und humanes β -Aktin sichergestellt worden war, konnten diese für den Nachweis humaner PC-3-Zellen in vergrößerten Lymphknoten eingesetzt werden. Als vergrößert wurde ein Lymphknoten dann angesehen, wenn sein Durchmesser größer als 2 mm war. Es wurde aus jedem vergrößerten Lymphknoten der jeweils vier pro Zeitpunkt analysierten Mäuse die RNA isoliert, aus dieser cDNA synthetisiert und eine RT-PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden wiederum auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert (Abb. 13).

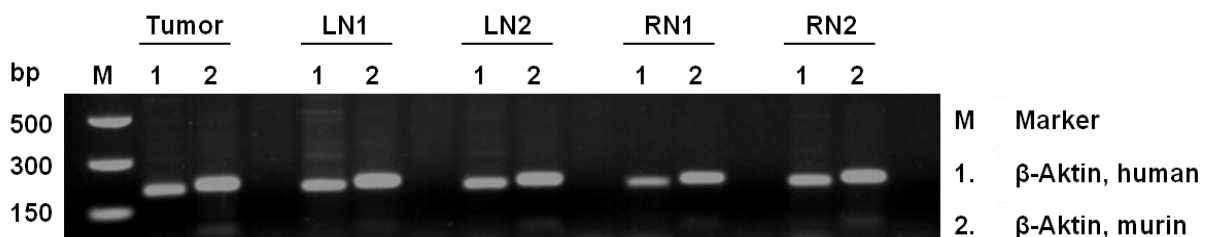


Abbildung 13: PCR-Produkte des Nachweises von humanem β -Aktin in einem PC-3-Tumor und den dazugehörigen lumbalen und renalen Lymphknoten, 42 Tage nach der Implantation. Spur 1: Bande für humanes β -Aktin, Spur 2: Bande für murines β -Aktin.

Die Banden für humanes β -Aktin aller Lymphknoten wurden analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Prozentsatz der Lymphknoten, die für humanes β -Aktin und somit für PC-3-Zellen positiv waren, von Woche zu Woche anstieg (Abb. 14). 21 Tage nach Implantation wurden in 3 von 14 (21 %) der vergrößerten Lymphknoten PC-3-Zellen nachgewiesen. Nach 28 Tagen wurden schon in 11 von 16 (69 %), nach 35 Tagen in 14 von 17 (83 %) und nach 42 Tagen Implantation in 18 von 20 (90 %) der vergrößerten Lymphknoten PC-3-Zellen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass 42 Tage nach Implantation der PC-3-Tumoren 90 % aller vergrößerten Lymphknoten metastasierte PC-3-Zellen enthielten. Es war

daher anzunehmen, dass die Vergrößerung der Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen durch Invasion von PC-3-Zellen verursacht wurde. Je länger der Zeitraum nach Implantation der PC-3-Tumore, desto höher war der Prozentsatz an Lymphknotenmetastasen.

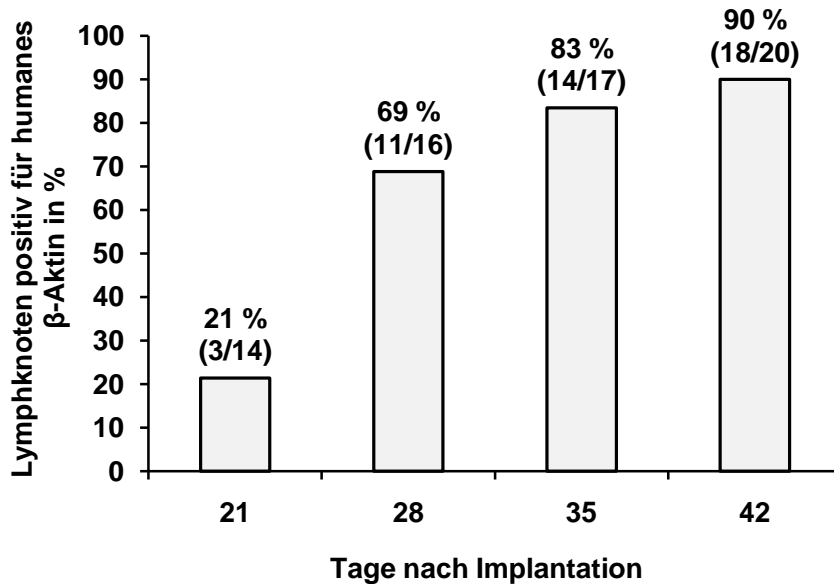


Abbildung 14: Anteil der vergrößerten Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen, die positiv für PC-3-Zellen waren. 21, 28, 35 und 42 Tage nach Implantation wurden alle vergrößerten Lymphknoten ($\varnothing > 2$ mm) von jeweils vier PC-3-Tumor-tragenden Mäusen analysiert. War als PCR-Produkt eine klare Bande für humanes β -Aktin zu beobachten, wurde dieser Lymphknoten als positiv für metastasierte PC-3-Zellen angesehen.

4.4 Visualisierung von PC-3-Zellen

4.4.1 Generierung von PC-3-RFP-Zellen

Nachdem gezeigt worden war, dass es sich bei einem Großteil der vergrößerten Lymphknoten offenbar um Metastasen handelte, sollte eine Visualisierung der PC-3-Zellen in der Maus durchgeführt werden. Dafür wurde das Gen für das rot fluoreszierende Protein RFP durch lentivirale Transduktion in PC-3-Zellen eingeführt (Abb. 15). Das RFP-Signal der PC-3-Zellen konnte daraufhin durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert und analysiert werden.

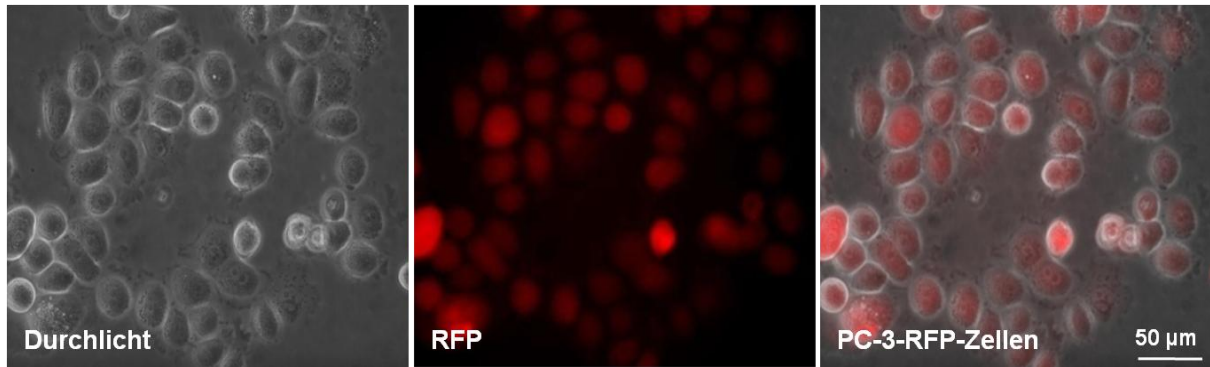


Abbildung 15: RFP-exprimierende PC-3-Zellen. Durch lentivirale Transduktion wurden PC-3-Zellen befähigt, das rot fluoreszierende Protein (RFP) zu exprimieren, welches durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurde.

4.4.2 Implantation von PC-3-RFP-Zellen

Zur Visualisierung von PC-3-RFP-Tumoren und -Metastasen wurden 2×10^6 PC-3-RFP-Zellen subkutan in die rechte Flanke von 10 Mäusen implantiert. Das Tumorstadium wurde verfolgt und das RFP-Signal der PC-3-Zellen detektiert. Durch das RFP-Signal war eine genaue Lokalisation des PC-3-Tumors in der Maus möglich. Mit wachsendem Tumor kam es zu einer Zunahme des RFP-Signals (Abb. 16).

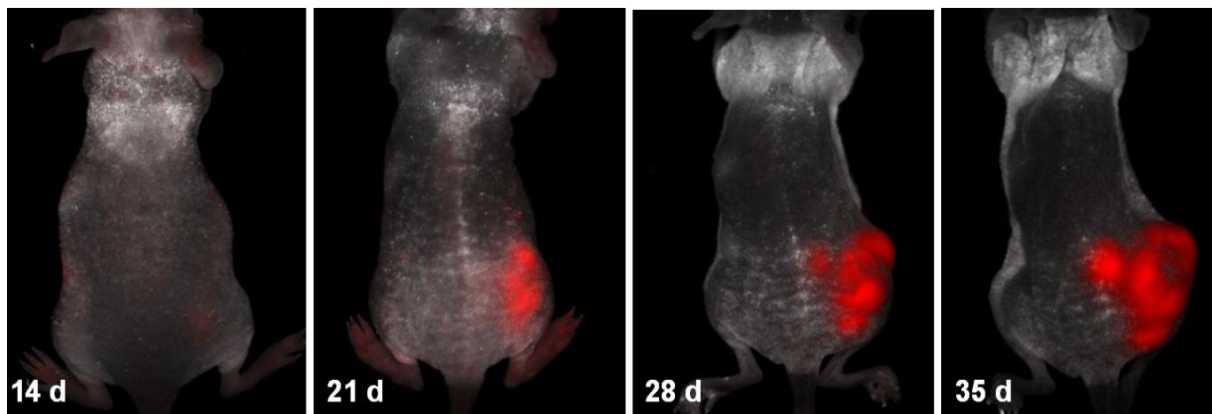


Abbildung 16: PC-3-RFP-Tumor-tragende Maus 14, 21, 28 und 35 Tage nach subkutaner Implantation von 2×10^6 PC-3-RFP-Zellen in die rechte Flanke.

Am Tag 56 nach Implantation wurden die Lymphknoten der PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäuse untersucht. Es konnte eine Vergrößerung der lumbalen und renalen Lymphknoten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass von den vergrößerten Lymphknoten ein starkes RFP-Signal ausging (Abb. 17). So konnte ein weiterer Beweis erbracht werden, dass es sich bei den vergrößerten Lymphknoten um Lymphknotenmetastasen handelte. Eine direkte Fluoreszenz-basierte Visualisierung von PC-3-Zellen im Mausmodell war somit möglich.

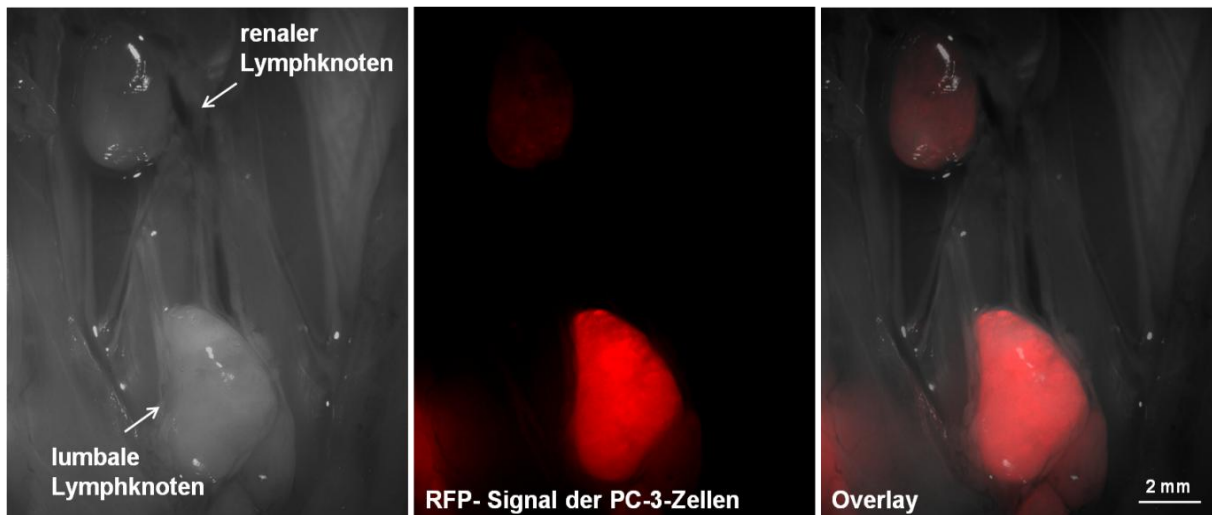


Abbildung 17: Fluoreszenz-Darstellung von vergrößerten lumbalen und renalen Lymphknoten einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 56 Tage nach Implantation. Schwarzweiß: Hellfeldaufnahme der vergrößerten Lymphknoten. Rot: PC-3-RFP-Zellen.

4.4.3 Visualisierung unterschiedlicher Metastasierungsstadien

Desweiteren konnten mit Hilfe von PC-3-RFP-Zellen die Stadien der Metastasierung verfolgt werden. Hierfür wurden die Lymphknoten von PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation untersucht. Je mehr Fläche des betroffenen Lymphknotens das RFP-Signal der PC-3-Zellen aufwies und je intensiver dieses war, desto fortgeschrittener war der Grad der Metastasierung. Die beginnende Lymphknotenmetastasierung zeichnete sich durch ein schwaches RFP-Signal am Rand des Lymphknotens aus. Sie konnte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation des Tumors beobachtet werden, z.B. 47 Tage nach Implantation (Abb. 18A). Mit dem Fortschreiten der Metastasierung breiteten sich die PC-3-RFP-Zellen auf den gesamten Lymphknoten aus, bis dieser vollständig metastasiert wurde. Sowohl die fortschreitende als auch die vollständige Metastasierung wurden vielfach zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. So konnte die fortschreitende Metastasierung z.B. 35 Tage nach Implantation (Abb. 18B) und die vollständige Metastasierung z.B. 65 Tage nach Implantation (Abb. 18C) detektiert werden. Generell zeichnete sich folgende Tendenz ab: Je größer die Zeitspanne nach Implantation, desto fortgeschrittener war der Grad der Metastasierung.

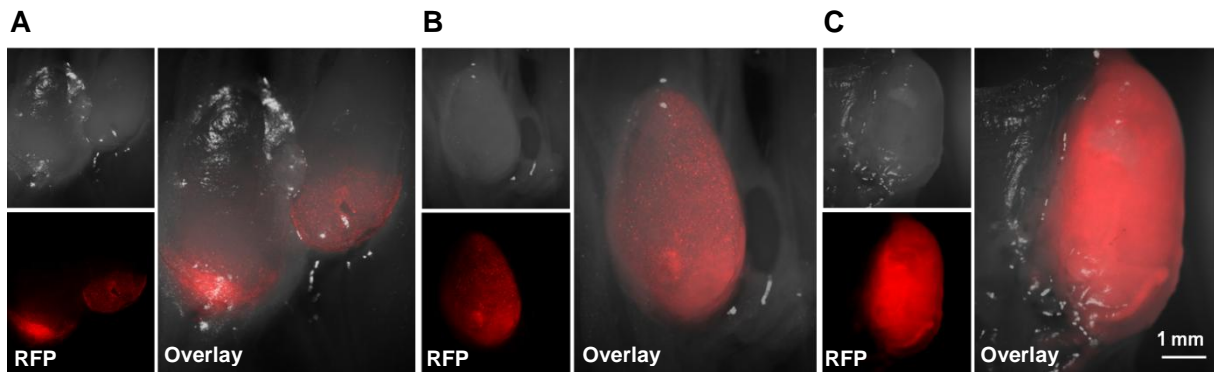


Abbildung 18: Verschiedene Stadien der PC-3-RFP-Zellinvasion in Lymphknoten PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse. Schwarzweiß: Hellfeldaufnahmen. Rot: RFP-Signal der PC-3-RFP-Zellen. (A) Beginnende Metastasierung eines lumbalen Lymphknotens 47 Tage nach Implantation. Der PC-3-RFP-Tumor wuchs in diesem Fall ca. drei Wochen später als der Durchschnitt an. (B) Fortschreitende Metastasierung von lumbalen Lymphknoten 35 Tage nach Implantation. (C) Vollständig metastasierter, renaler Lymphknoten, 65 Tage nach Implantation des PC-3-RFP-Tumors.

Auch eine Detektion von sehr kleinen Lymphknotenmetastasen, die ohne das RFP-Signal der invadierten PC-3-Zellen nicht sichtbar wären, war in PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen möglich. So konnte mehrfach eine Invasion von PC-3-RFP-Zellen in inguinale Lymphknoten beobachtet werden, z.B. 56 Tage nach Implantation (Abb. 19).

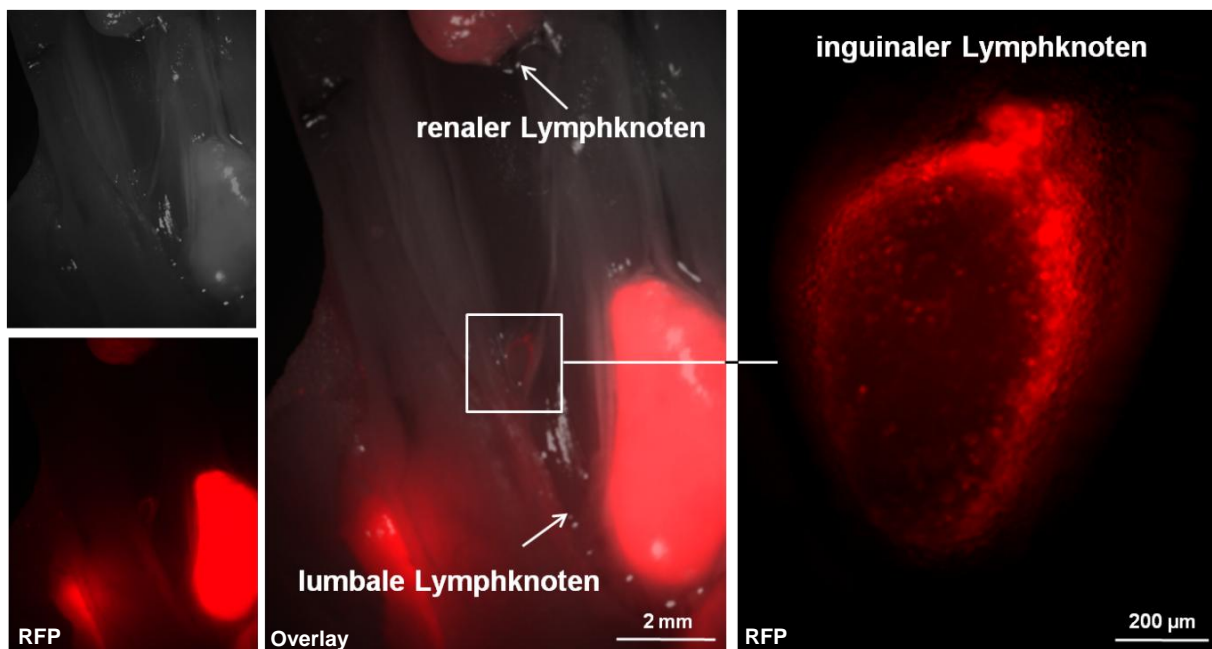


Abbildung 19: Beginnende Metastasierung des inguinalen Lymphknotens einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 56 Tage nach Implantation.

4.4.4 Detektion von PC-3-RFP-Metastasen *prä mortem* und *post mortem*

Mit Hilfe des Maestro EX Imaging Systems konnten PC-3-Tumore und –Lymphknotenmetastasen zum Teil auch in der lebenden Maus gezeigt werden. Dafür wurden 70 Tage nach Implantation PC-3-RFP-Tumor-tragende Mäuse durch Isofluran narkotisiert und in das Imaging-System überführt. Bei zwei von fünf zu diesem Zeitpunkt untersuchten Mäusen war es möglich, durch die Bauchdecke hindurch lumbale Lymphknotenmetastasen zu detektieren (Abb. 20A 1.). Befand sich die Maus in Bauchlage waren renale Lymphknotenmetastasen neben der Wirbelsäule zu beobachten (Abb. 20C 2.). Neben den lumbalen und renalen, konnten auf diese Weise auch weitere Lymphknotenmetastasen visualisiert werden, z.B. Metastasen der Sitzbeinlymphknoten (Abb. 20 5.) oder Metastasen von nicht näher definierten Lymphknoten, welche sich in unmittelbarer Nähe des Tumors befanden (Abb. 20 3.+4.).

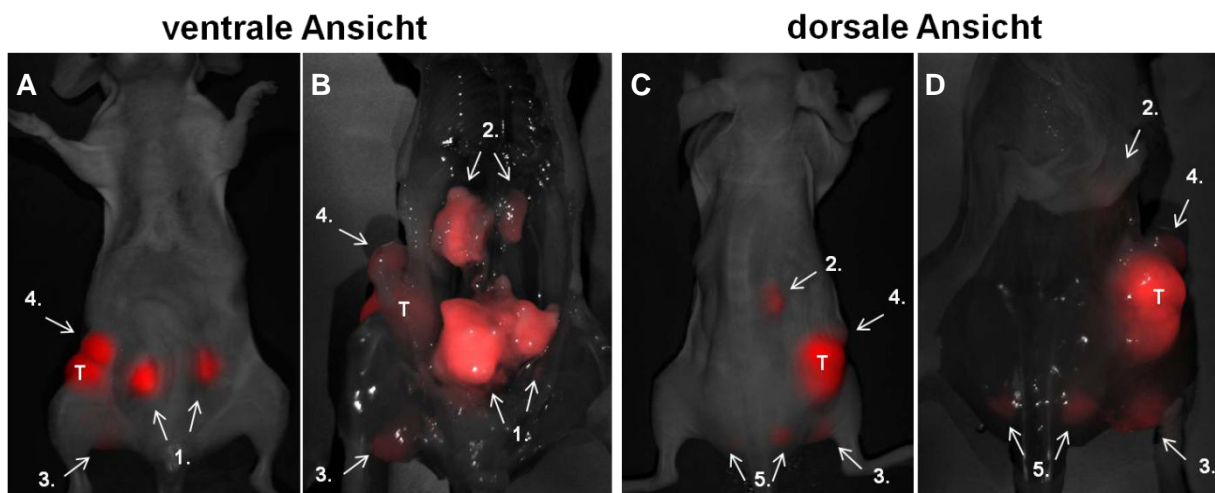
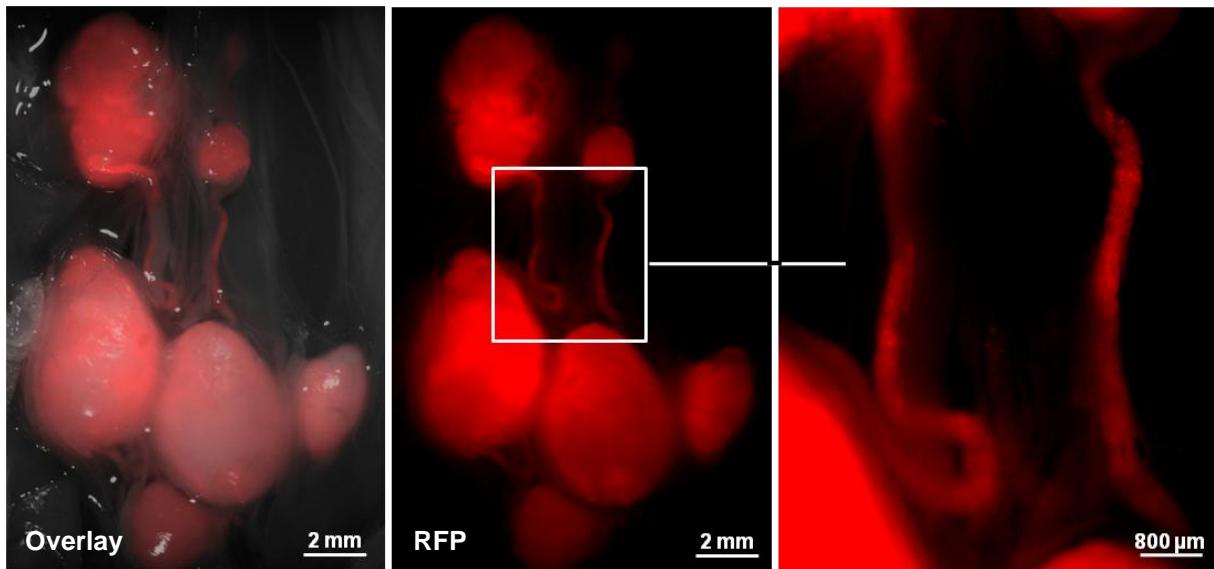


Abbildung 20: Optische Bildgebung von PC-3-RFP-Tumor und -Metastasen mit Hilfe des Maestro-Imagers, 70 Tage nach Implantation. (A+C) *prä mortem* (B+D) *post mortem*. 1. lumbale, 2. renale Lymphknotenmetastasen, 3. und 4. Metastasen von nicht näher definierten Lymphknoten, 5. Sitzbeinlymphknotenmetastasen. Mit „T“ wurde der Tumor markiert.

4.4.5 Migration von PC-3-RFP-Zellen zwischen Metastasen

Überdies hinaus wurde in vielen PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen zu späteren Zeitpunkten nach Implantation (d.h. mehr als 60 Tage nach Implantation) eine Migration der PC-3-RFP-Zellen zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen beobachtet. Diese Migration konnte sowohl zwischen LN1 und RN1 als auch zwischen LN2 und RN2 beobachtet werden und dürfte in gefäßartigen Strukturen erfolgen (Abb. 21).

A



B

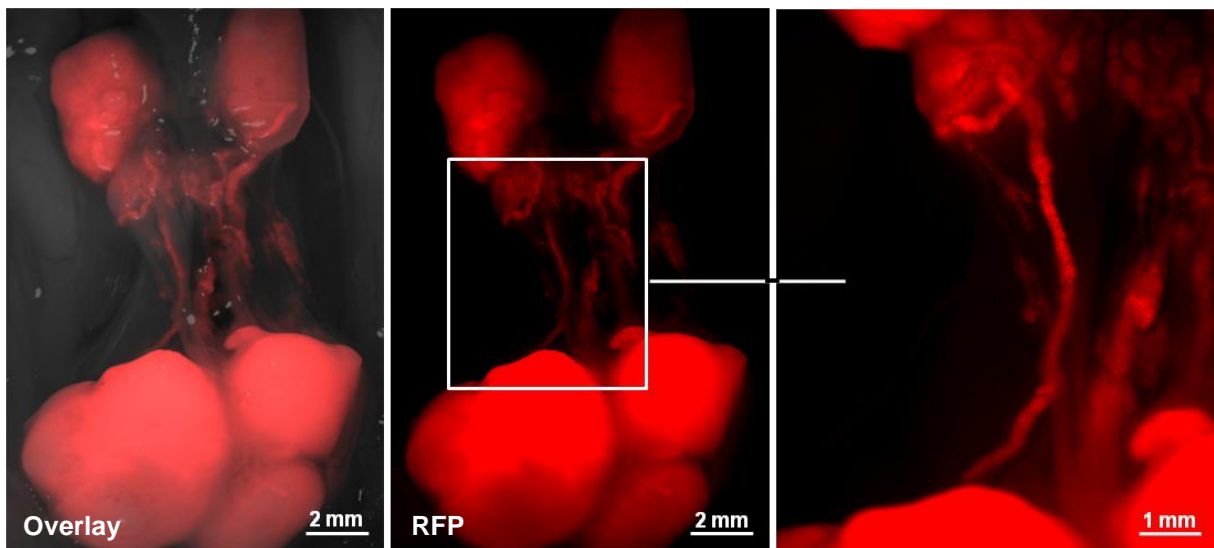


Abbildung 21: PC-3-RFP-Zellmigration zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen bei zwei PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen. (A) Migration der PC-3-RFP-Zellen in zwei gefäßartigen Strukturen, die jeweils LN1 und RN1 und LN2 und RN2 verbinden 60 Tage nach Implantation. (B) Migration in mehreren gefäßartigen Strukturen zwischen LNs und RNs, 65 Tage nach Implantation.

Ferner wurde gezeigt, dass eine Wanderung von PC-3-RFP-Zellen in PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen nicht nur zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen, sondern auch zwischen weiteren Lymphknotenmetastasenpaaren stattfinden kann (Abb. 22).

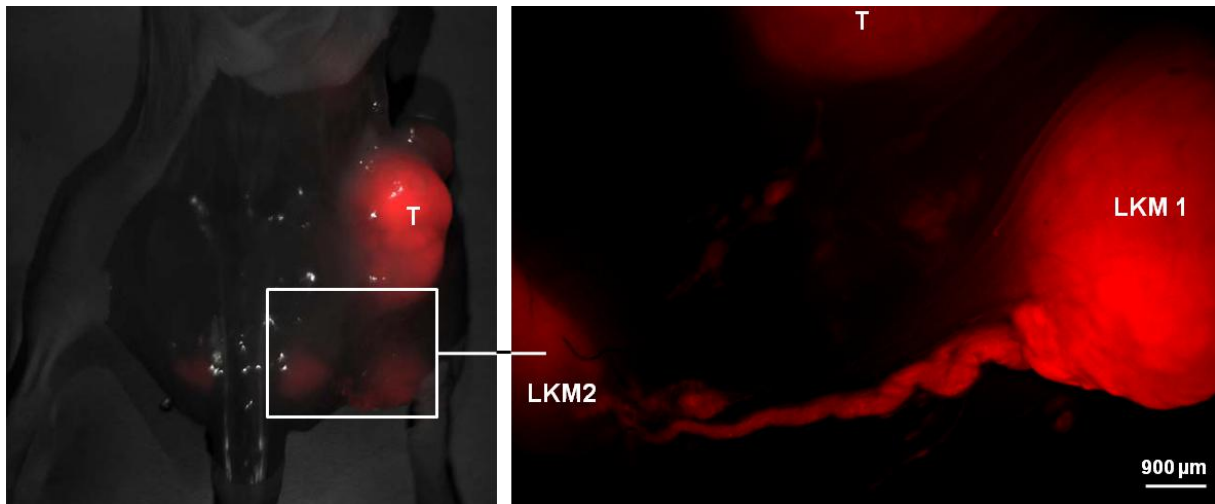


Abbildung 22: Visualisierung der PC-3-RFP-Zellmigration zwischen Lymphknotenmetastasen 70 Tage nach Implantation. LKM2 stellt in diesem Fall eine Sitzbeinlymphknotenmetastase dar, LKM1 die Metastase eines nicht näher definierten Lymphknotens, welcher im Oberschenkel der Maus unterhalb des Tumors (T) lokalisiert ist.

4.4.6 Migration von PC-3-RFP-Zellen innerhalb von Lymphknoten

Darüber hinaus konnte bei Analyse eines lumbalen Lymphknotens einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 35 Tage nach Implantation gezeigt werden, wie die PC-3-RFP-Zellen in den Lymphknoten gelangen. Dafür wurden Agaroseschnitte von dem Lymphknoten angefertigt und diese mit Hoechst gefärbt. Deutlich zu erkennen war eine Anreicherung der PC-3-RFP-Zellen im Sinusbereich, sowie die beginnende Invasion in weitere Abschnitte des Lymphknotens (Abb. 23). Die Metastasierung durch PC-3-RFP-Zellen befand sich in einem frühen Stadium.

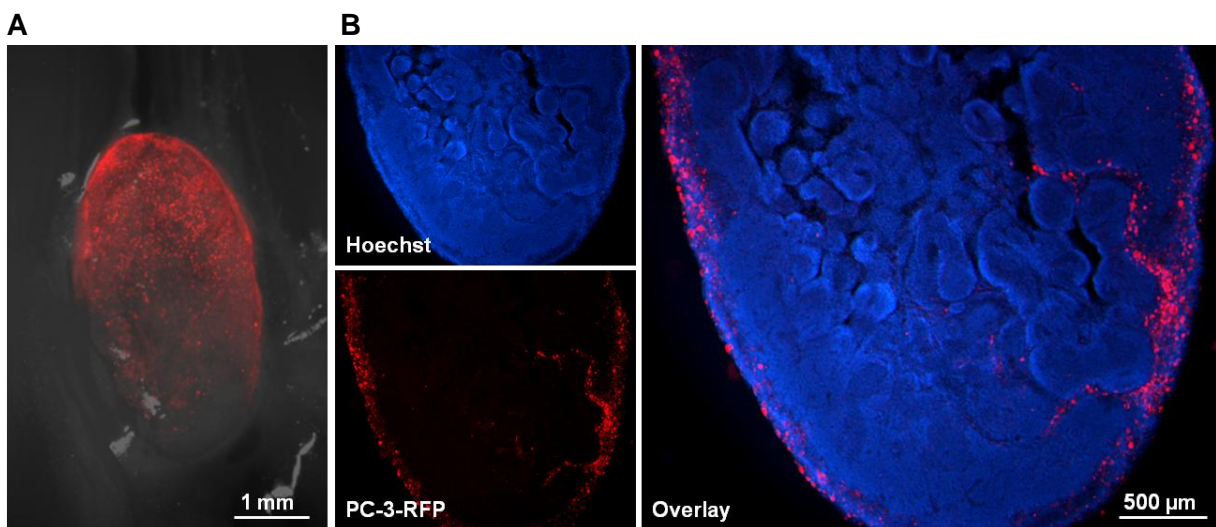


Abbildung 23: Visualisierung der PC-3-RFP-Zellinvasion in einen lumbalen Lymphknoten einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 35 Tage nach Implantation. (A) Durch PC-3-RFP-Zellen metastasierter lumbaler Lymphknoten in der Maus. (B) Mit Hoechst gefärbter Agaroseschnitt dieses Lymphknotens.

4.4.7 Metastasenbildung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Um weitere Informationen über die Bildung von Lymphknotenmetastasen zu erlangen, sollte untersucht werden, ob diese in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-RFP-Tumors verläuft. Dafür wurden 2×10^6 PC-3-RFP-Zellen an verschiedenen Positionen der Mäuse subkutan implantiert (Abb. 24). Zum einen erfolgte eine Implantation in die linke und rechte Flanke, zum anderen in die linke und rechte Schulter. Des Weiteren wurden ebenfalls 2×10^6 PC-3-RFP-Zellen intravenös injiziert, um eine Tumorbildung über den Blutstrom zu untersuchen.

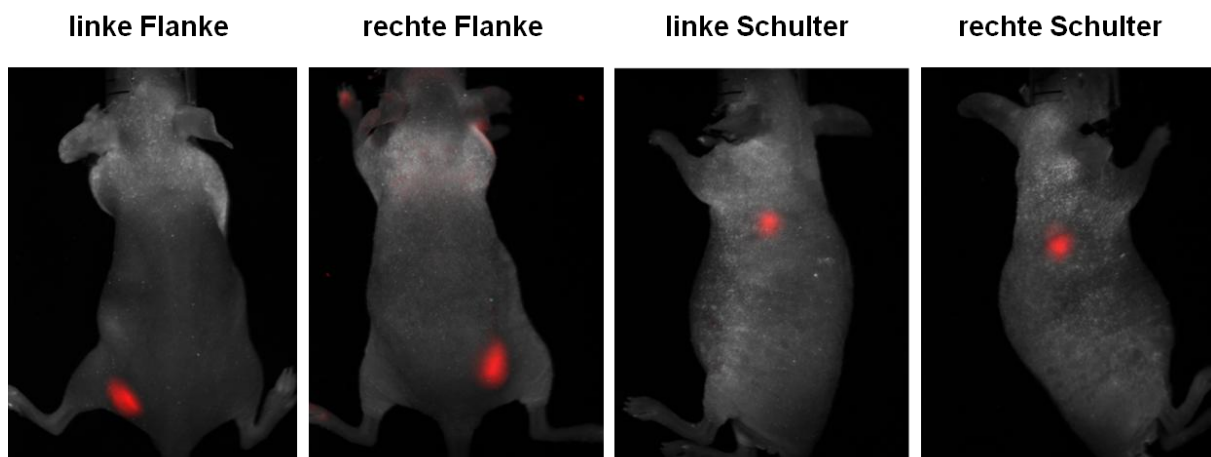


Abbildung 24: PC-3-RFP-Tumore 14 Tage nach subkutaner Implantation an verschiedenen Positionen der Maus.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-RFP-Tumors verläuft (Abb. 25). Die Metastasierung erfolgte immer in den Lymphknoten, welche am nächsten zum Tumor gelegen waren. Befand sich der Tumor an der linken Flanke, so wurden lumbale und renale Lymphknoten auf der linken Seite metastasiert vorgefunden. Analog dazu verlief die Lymphknotenmetastasierung, wenn sich der Tumor an der rechten Flanke befand. Wurde der Tumor an der Schulter implantiert, kam es zur Metastasierung der jeweiligen axillären und/oder brachialen Lymphknoten auf der Tumorseite. Auf diese Weise konnte die Metastasierung regionärer Lymphknoten verfolgt werden. Weiterhin waren 80 Tage nach der intravenösen Injektion von PC-3-RFP-Zellen keine Metastasen in Lymphknoten nachweisbar.

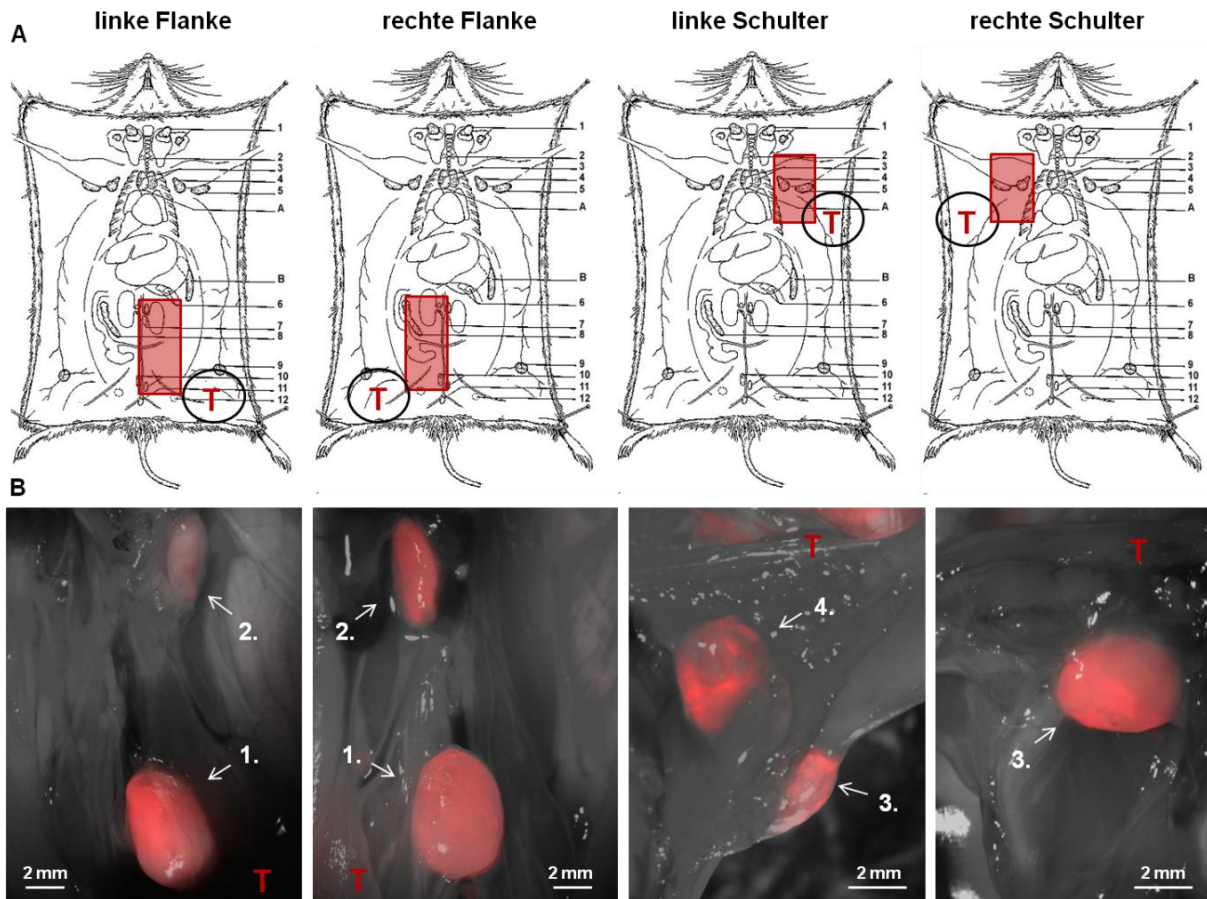


Abbildung 25: Metastasierung der regionären Lymphknoten von PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation, 65 Tage nach Implantation. (A) Schematische Darstellung der Lymphknoten in einer Maus. Die roten Kästchen rahmen jeweils die Lymphknoten ein, welche 65 Tage nach der Implantation des Tumors (T) metastasiert vorlagen. (B) Mikroskopische Aufnahmen der metastasierten lumbalen (1.), renalen (2.), axillären (3.) und brachialen (4.) Lymphknoten in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-RFP-Tumors (T).

4.4.8 Visualisierung hämatogener Metastasen

Neben der Lymphknotenmetastasierung wurde auch untersucht, ob PC-3-RFP-Zellen in anderen Organen von PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen detektierbar sind. Hierfür wurden jedes Mal, wenn PC-3-RFP-Tumor-tragende Mäuse aus einem Versuch genommen wurden, neben den Lymphknoten auch andere Organe auf ein RFP-Signal hin untersucht. Dazu gehörten Milz, Niere, Leber und Lunge. Es stellte sich heraus, dass nur in den Lungen PC-3-RFP-Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine Metastasierung in die Lungen spricht für eine hämatogene Ausbreitung der Zellen in der Maus. Sobald Lymphknotenmetastasen deutlich ausgeprägt waren, gelang es auch diese hämatogenen Lungenmetastasen zu visualisieren (Abb. 26). Im Vergleich dazu war kein RFP-Signal in Lungen von Kontrollmäusen ohne PC-3-RFP-Tumor zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

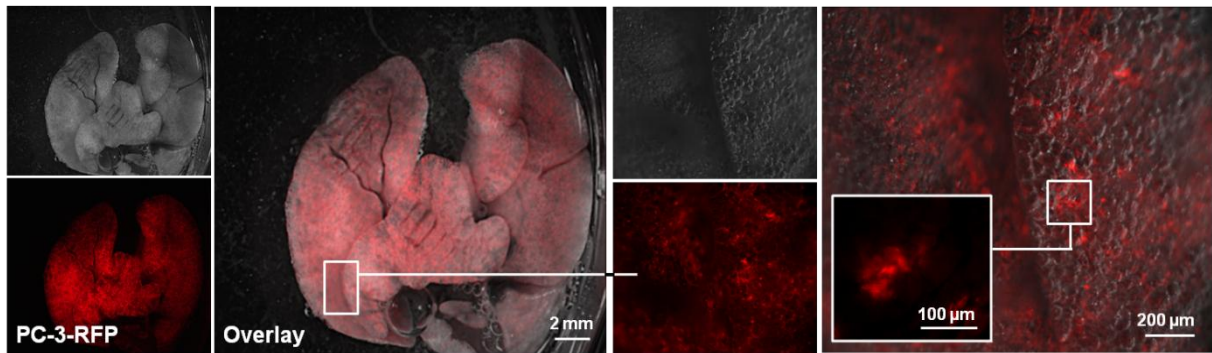
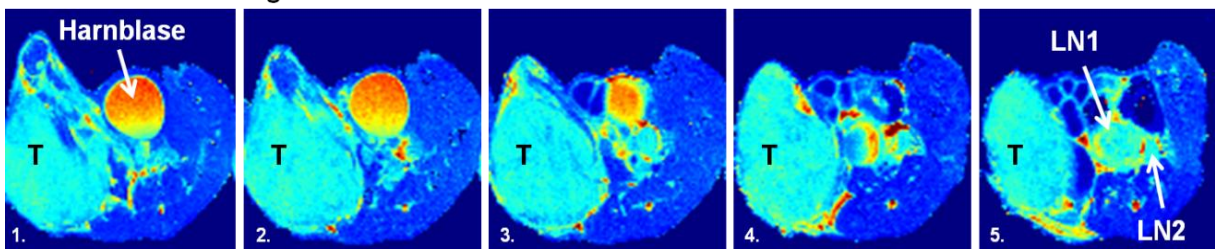


Abbildung 26: Hämatogene Metastasen in der Lunge einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 76 Tage nach Implantation. PC-3-RFP-Mikrometastasen konnten über die gesamte Fläche der Lunge detektiert werden.

4.4.9 Bildgebung von PC-3-Tumor und -Metastasen in der lebenden Maus durch MRT

Des Weiteren gelang es durch das MRT-Verfahren sowohl den PC-3-RFP-Tumor als auch PC-3-RFP-Lymphknotenmetastasen bildhaft darzustellen. Mit Hilfe der MRT wurden Querschnittsbilder einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 60 Tage nach Implantation und einer Kontrollmaus ohne Tumor aufgenommen. Diese wurden anschließend miteinander verglichen. Der PC-3-RFP-Tumor und die Lymphknotenmetastasen zeichneten sich deutlich vom Rest des Gewebes ab (Abb. 27).

PC-3-RFP-Tumor-tragende Maus



Kontrollmaus ohne soliden Tumor

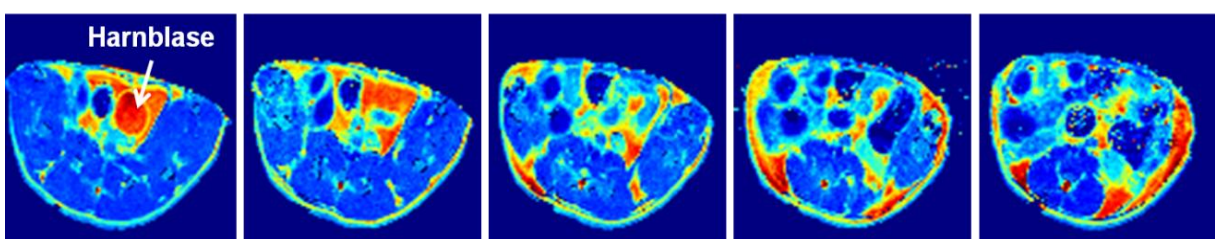


Abbildung 27: T2-abhängige-MRT-Messung einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus 60 Tage nach Implantation und einer Kontrollmaus. Tumor (T) und Lymphknotenmetastasen (LN1 und LN2) sind in der oberen Bildreihe im letzten Bild als hellblaue Strukturen deutlich zu erkennen.

Nach der MRT-Messung wurden die lumbalen Lymphknotenmetastasen der PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus zusätzlich unter einem Stereofluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 28), um die Daten zu verifizieren.

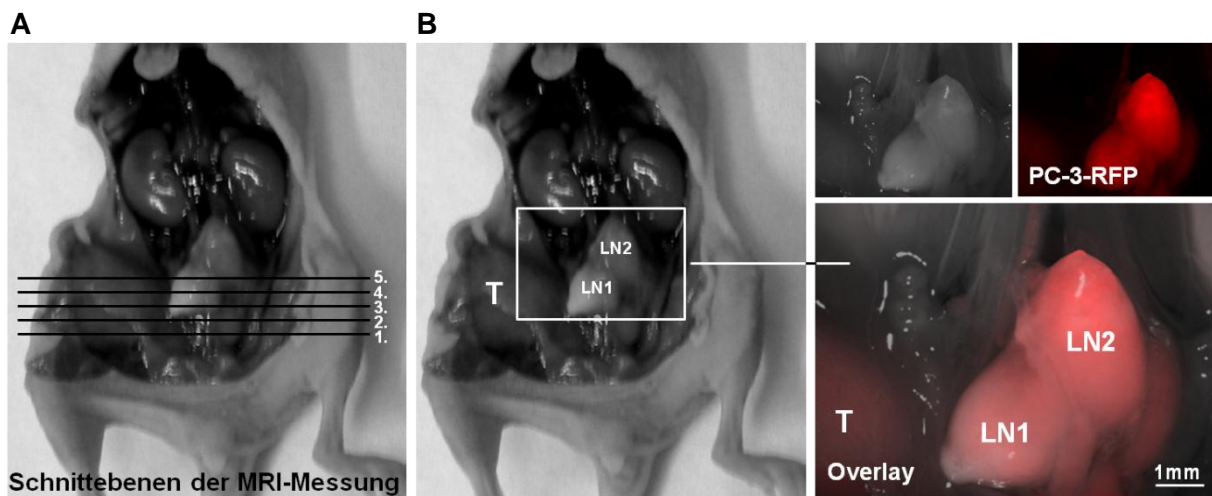


Abbildung 28: Analyse der lumbalen Lymphknotenmetastasen der PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus *post mortem*. (A) Schnittebenen der MRT-Messung. (B) lumbale Lymphknotenmetastasen (LN1, LN2) und PC-3-RFP-Tumor (T).

In der Tat konnte das Vorhandensein von lumbalen Lymphknotenmetastasen LN1 und LN2 auf diese Weise bestätigt werden.

4.5 Analyse der Migration von PC-3-RFP-Zellen

Die Migration der PC-3-RFP-Zellen erfolgte in gefäßartigen Strukturen, welche primäre und sekundäre Lymphknotenmetastasen miteinander verbinden (Abb. 29A oben). Um herauszufinden, worum es sich bei diesen gefäßartigen Strukturen handelt, wurden diese genauer untersucht. Hierfür wurden Agaroseschnitte angefertigt (Abb. 29A unten), welche anschließend mit CD31, einem Marker für Endothelzellen der Blutgefäße und LYVE-1, ein für Lymphgefäße spezifischer Marker, gefärbt wurden. Durch diese Färbung konnte gezeigt werden, dass die migrierenden PC-3-RFP-Zellen von lymphatischem Gewebe umgeben sind, nicht aber von Endothelzellen der Blutgefäße (Abb. 29B). Durch die CD31-Färbung konnte die abdominale Aorta dargestellt werden. Es konnten keine migrierenden PC-3-RFP-Zellen in der Aorta detektiert werden. Die Migration der PC-3-RFP-Zellen erfolgte demzufolge in Lymphgefäßen. Das sprach für eine lymphatische Metastasierung, im Gegensatz zur hämatogenen Metastasierung, wie sie in den Lungen beobachtet wurde.

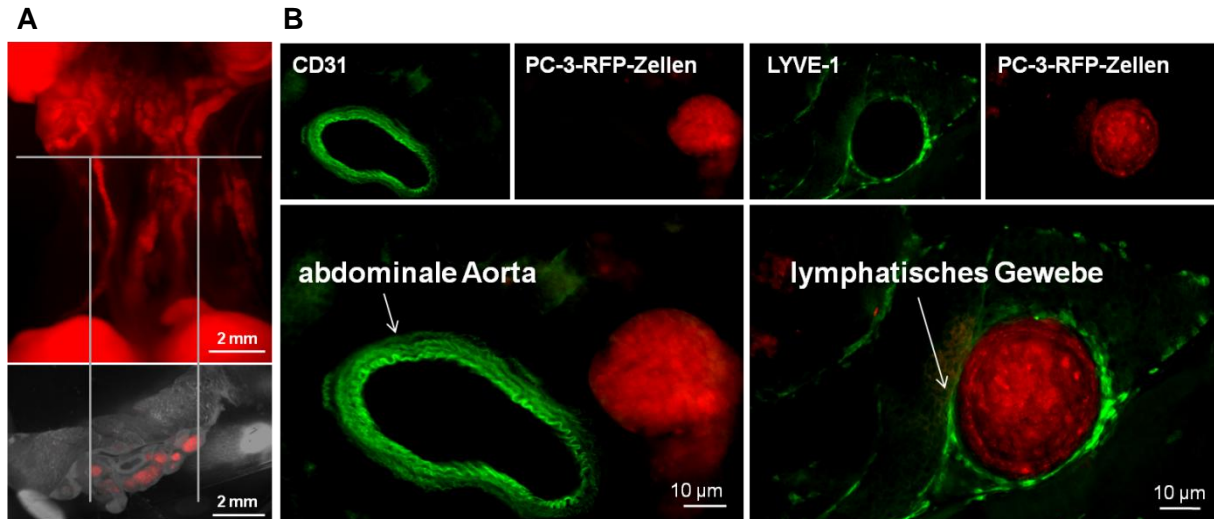


Abbildung 29: CD31- und LYVE-1-Färbungen von Agaroseschnitten der mit PC-3-RFP-Zellen gefüllten gefäßartigen Strukturen. (A) Oben: Gefäßartige Strukturen, in denen die PC-3-RFP-Zellen zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen migrierten 65 Tage nach Implantation des PC-3-RFP-Tumors. Unten: Querschnitt durch diese Strukturen. (B) Färbung der Querschnitte mit anti-CD31 bzw. anti-LYVE-1.

4.6 Vorhandensein von Lymphgefäßen in PC-3-Tumoren

Da PC-3-RFP-Zellen also höchstwahrscheinlich Lymphgefäße für die Metastasierung nutzen, sollte getestet werden, ob eine Korrelation zwischen Lymphgefäßdichte im PC-3-Tumor und der Lymphknotenmetastasierung vorliegt. Hierfür wurden Agaroseschnitte von soliden PC-3-Tumoren angefertigt und mit LYVE-1 gefärbt. Es wurden die entsprechenden Tumore aus dem Versuch 4.3. verwendet. Die jeweils vier Tumore wurden 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach Implantation untersucht. Von jedem Tumor wurden die Lymphgefäße in 2 Agaroseschnitten analysiert. Dabei wurden je Agaroseschnitt die Lymphgefäße in zwei Bereichen am Rand (peritumoral) und zwei Bereichen im Zentrum des Tumors (zentraltumoral) ausgezählt. So konnte gezeigt werden, dass es im soliden Tumor zu einem Anstieg der zentral- und peritumoralen Lymphgefäße kam (Abb. 30), wobei an Tag 7 und 14 nach Implantation die Anzahl der peritumoralen, im Vergleich zu den zentraltumoralen, Lymphgefäßen signifikant erhöht war. An den Tagen 21, 28 und 35 war kein Unterschied in der Anzahl von peri- und zentraltumoralen Lymphgefäßen zu erkennen. Es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der Lymphgefäße von Woche zu Woche nach Implantation. An Tag 35 wurde das Maximum von ca. 70 Lymphgefäßen pro Fläche dieses Versuchs ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt waren 83 % aller vergrößerten Lymphknoten positiv für PC-3-Zellen (Abb. 14). Mit ansteigender Lymphgefäßdichte im PC-3-Tumor stieg auch die Anzahl der Lymphknoten, die positiv auf PC-3-Zellen getestet wurden. Der Anstieg der Lymphgefäßdichte korrelierte demzufolge mit der Bildung von Lymphknotenmetastasen.

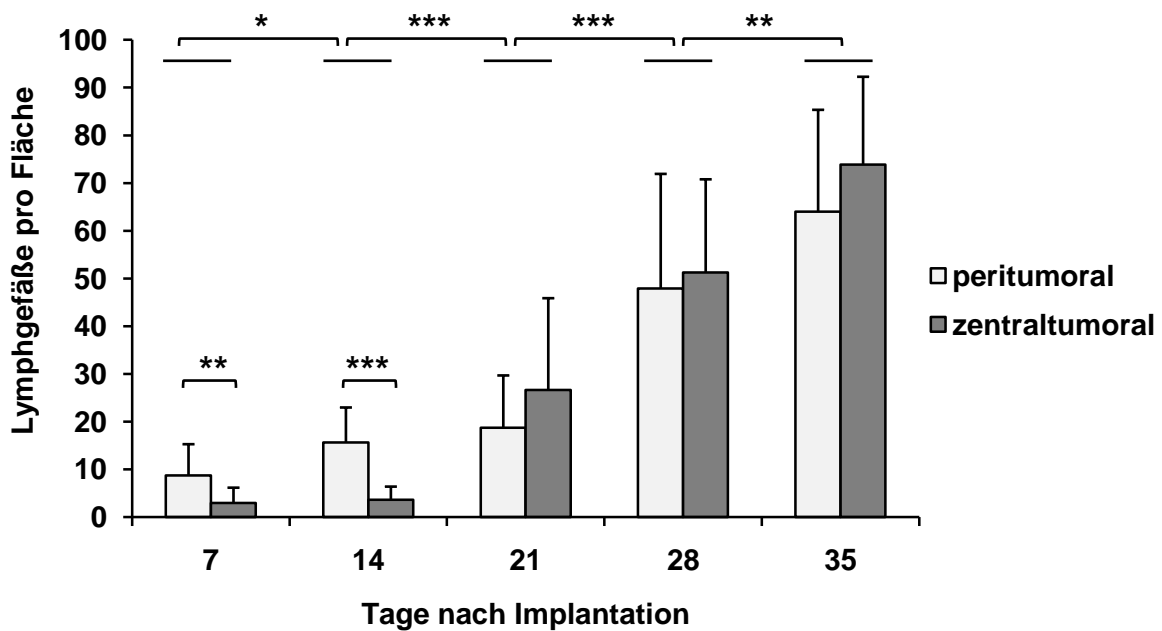


Abbildung 30: Anzahl der Lymphgefäße pro Fläche in PC-3-Tumorschnitten 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach Implantation. Pro Zeitpunkt wurde die Lymphgefäßdichte in peri- und zentraltumoralen Bereichen von je vier Tumoren bestimmt. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.)

4.7 Effekt von GLV-1h68 auf PC-3-Metastasen

4.7.1 Kolonisierung von PC-3-Metastasen und migrierenden PC-3-Zellen durch GLV-1h68

Zur Untersuchung des Effekts von GLV-1h68 auf den Prozess der PC-3-Zellmetastasierung sollte zunächst überprüft werden, ob GLV-1h68 in der Lage ist, Lymphknotenmetastasen und migrierende PC-3-RFP-Zellen zu infizieren. Um eine mögliche Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen zu analysieren, wurden fünf PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 57 Tage nach Implantation 5×10^6 PFU GLV-1h68 intravenös injiziert. Elf Tage nach der Virus-Injektion wurden die Lymphknotenmetastasen untersucht. In der Tat konnte das GFP-Signal, welches von mit GLV-1h68 infizierten Zellen exprimiert wird, nachgewiesen werden (Abb. 32A). GLV-1h68 konnte erfolgreich PC-3-Lymphknotenmetastasen von allen fünf untersuchten Mäusen kolonisieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es elf Tage nach der Injektion zu einer Zerstörung von Metastasengewebe durch GLV-1h68 kommen konnte, was mit Hilfe einer Aktinfärbung durch Fluoreszenz-markiertes Phalloidin gezeigt werden konnte (Abb 32B).

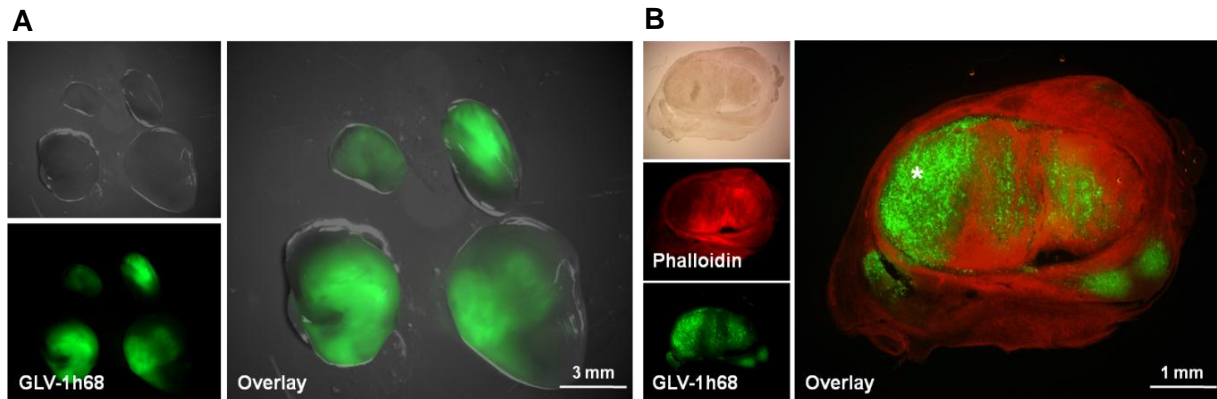


Abbildung 31: Kolonisierung von PC-3-Metastasen (ohne RFP) mit GLV-1h68 elf Tage nach Virus-Injektion und 68 Tage nach Implantation. (A) Entnommene lumbale und renale Lymphknotenmetastasen einer PC-3-Tumor-tragenden Maus. (B) Immunhistologische Analyse eines Agaroseschnittes einer lumbalen Lymphknotenmetastase. Mit Hilfe von Phalloidin-TRITC wurde das Zytoskelett angefärbt. Der Stern markiert das durch GLV-1h68 zerstörte Gewebe dieser Lymphknotenmetastase.

Zusätzlich wurde überprüft, ob GLV-1h68 auch Lymphknotenmetastasen der RFP-exprimierenden PC-3-Tumore kolonisieren kann. Dafür wurde fünf PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen 50 Tagen nach Implantation 5×10^6 PFU GLV-1h68 intravenös injiziert. Am 14. Tag nach der Virus-Injektion wurde sowohl das RFP-Signal der Lymphknotenmetastasen als auch das GFP-Signal der infizierten Zellen analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass GLV-1h68 alle lumbalen und renalen PC-3-RFP-Lymphknotenmetastasen der fünf untersuchten Mäuse effektiv kolonisieren konnte (Abb. 33).

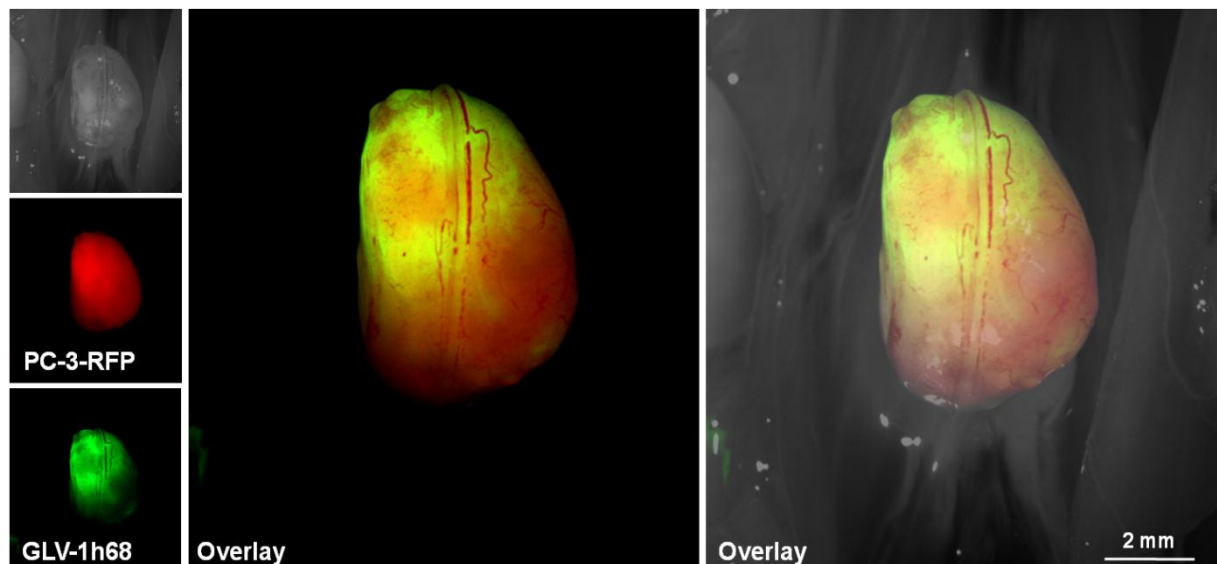


Abbildung 32: Kolonisierung einer lumbalen PC-3-RFP-Lymphknotenmetastase 14 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 und 64 Tage nach Implantation. Links: Hellfeld- und rote bzw. grüne Fluoreszenzaufnahme, Mitte: Overlay des RFP- und des GFP-Signals. Rechts: Overlay aus Hellfeld-, RFP- und GFP-Signal.

Um herauszufinden, ob GLV-1h68 in der Lage ist, auch migrierende PC-3-RFP-Zellen erfolgreich zu infizieren, wurde eine PC-3-RFP-Tumor-tragende Maus 83 Tage nach Implantation mit GLV-1h68 injiziert. Durch die lange Zeitspanne zwischen Implantation und Virus-Injektion sollte sichergestellt werden, dass sich die Metastasierung schon im fortgeschrittenen Stadium befand und eine PC-3-RFP-Zellmigration zwischen den Lymphknotenmetastasen wahrscheinlich war. Die Injektion mit 5×10^6 PFU GLV-1h68 erfolgte abermals intravenös. Sieben Tage nach Virus-Gabe konnte ein GFP-Signal in migrierenden PC-3-RFP-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34). GLV-1h68 ist dementsprechend dazu befähigt, migrierende PC-3-Zellen zu infizieren.

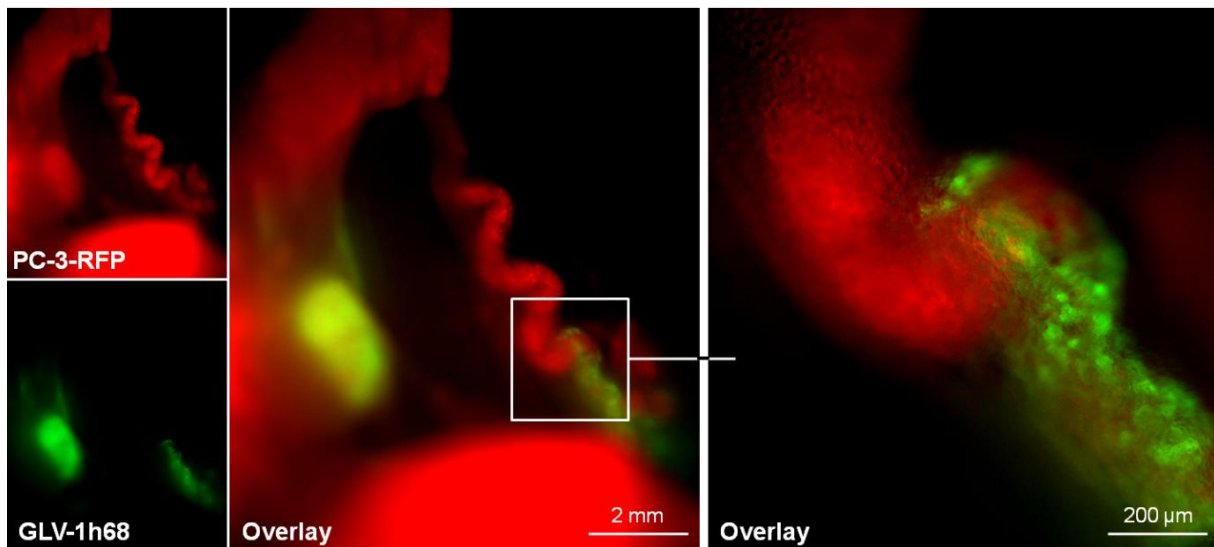


Abbildung 33: Kolonisierung von migrierenden PC-3-RFP-Zellen mit GLV-1h68 sieben Tage nach der Injektion. Nach 83 Tagen Implantation erfolgte die intravenöse Injektion von 5×10^6 PFU GLV-1h68.

Was in diesem ersten Versuch an nur einer Maus gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit mehrfach an anderen mit GLV-1h68 infizierten PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen gezeigt.

4.7.2 Einfluss von GLV-1h68 auf PC-3-Lymphknotenmetastasen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sowohl PC-3-Metastasen als auch migrierende PC-3-Zellen erfolgreich durch GLV-1h68 kolonisiert werden konnten, galt es herauszufinden, ob diese Kolonisierung in einer Inhibierung der Bildung und des Wachstums von Metastasen resultiert. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden zwölf weiblichen und zehn männlichen Mäusen 2×10^6 PC-3-Zellen subkutan in die rechte Flanke implantiert. Sobald die Tumore ein Durchschnittsvolumen von 250 mm^3 erreicht hatten (30 Tage nach Implantation), wurde jeweils in sechs weibliche und fünf männliche Mäuse intravenös 5×10^6 PFU GLV-1h68 bzw. als Kontrolle PBS injiziert. Am Tag 21 nach der Injektion wurden die Lymphknoten der

GLV-1h68-behandelten Mäuse und die der Kontrollmäuse untersucht. Es zeigte sich, dass durch eine Behandlung mit GLV-1h68 sowohl das Volumen als auch die Anzahl vergrößerter Lymphknoten in Männchen und in Weibchen reduziert wurden (Abb. 34).

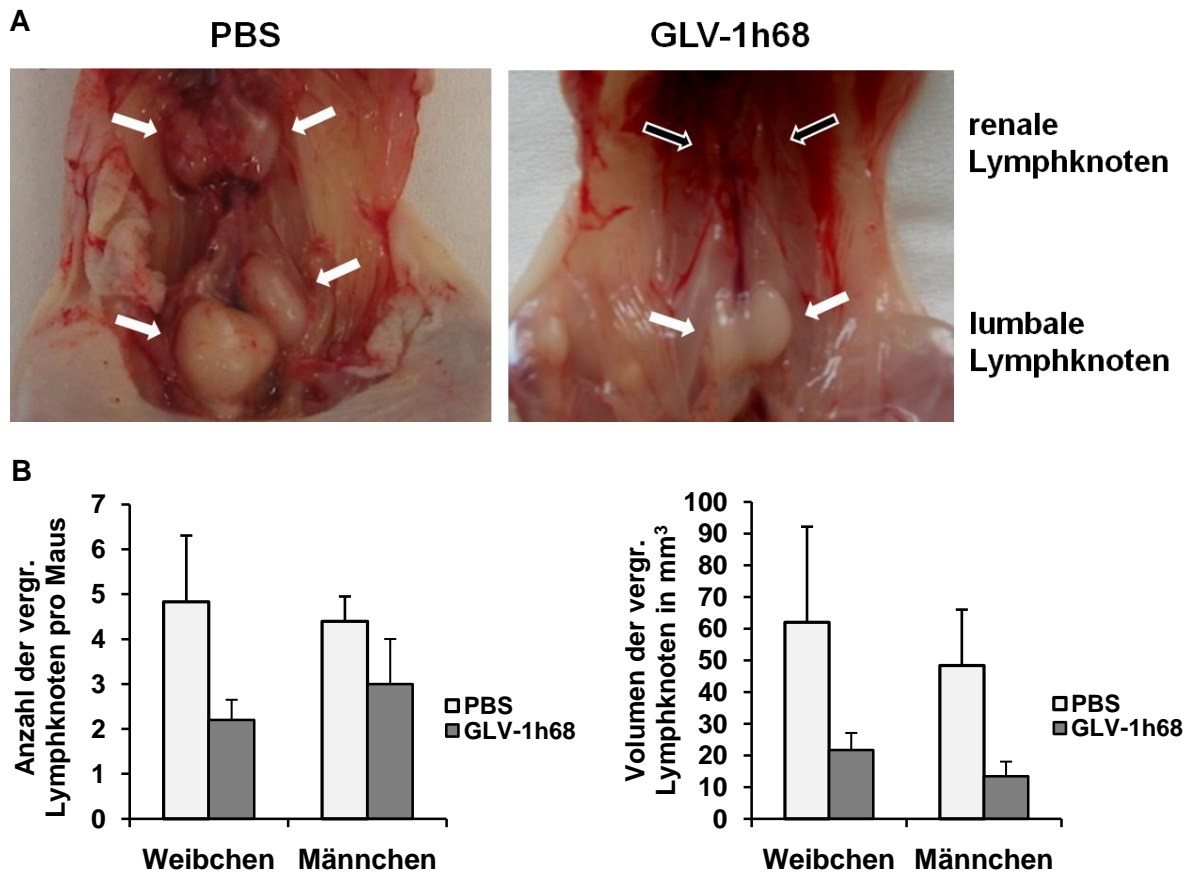


Abbildung 34: Anzahl und Volumen vergrößerter Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Weibchen und Männchen 21 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 und 51 Tage nach Implantation. (A) Lymphknoten einer mit PBS und einer mit GLV-1h68 behandelten Maus 21 Tage nach Virus-Injektion. Weiße Pfeile zeigen vergrößerte Lymphknoten, schwarze Pfeile markieren Lymphknoten von normaler Größe. (B) Anzahl und Volumen aller vergrößerten Lymphknoten 21 Tage nach Injektion von Weibchen (n=6 pro Gruppe) und Männchen (n=5 pro Gruppe).

Die Verringerung des Volumens der vergrößerten Lymphknoten durch GLV-1h68-Behandlung lässt vermuten, dass GLV-1h68 einen inhibierenden Effekt auf den Prozess der Metastasierung ausüben kann. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden alle vergrößerten Lymphknoten auf das Vorhandensein von PC-3-Zellen getestet. Wie in vorherigen Versuchen geschah dies mit Hilfe einer RT-PCR (Abb. 35A). Die RNA aller vergrößerten Lymphknoten wurde isoliert, die entsprechende cDNA synthetisiert und diese in einer RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin analysiert. Zusätzlich wurden diesmal auch Primer für den Nachweis von GLV-1h68 eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass GLV-1h68 nicht nur eine Verringerung des Volumens der Lymphknoten, sondern auch eine Reduktion der Anzahl an Lymphknoten bewirkt, welche positiv für PC-3-Zellen waren. Sowohl in der Gruppe der Weibchen als auch in der der Männchen kam es zu einer

Abnahme von Lymphknotenmetastasen durch die Wirkung von GLV-1h68. Da kein Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet werden konnte, wurden die Daten der Weibchen und Männchen zusammengefasst (Abb. 35B). In den elf untersuchten PBS-Mäusen wurden 49 vergrößerte Lymphknoten gefunden. 45 von diesen 49 Lymphknoten (91 %) waren positiv für PC-3-Zellen. In den mit GLV-1h68 infizierten Mäusen konnten dagegen nur 28 vergrößerte Lymphknoten gefunden werden, von welchen nur 6 (21 %) positiv auf PC-3-Zellen getestet werden konnten. Anhand dieses Versuchs konnte eine signifikante Reduktion von Lymphknotenmetastasen 21 Tage nach einmaliger intravenöser GLV-1h68-Injektion in PC-3-Tumor-tragende Mäusen nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass in Proben, in denen keine humanen Zellen nachgewiesen werden konnte, auch kein GLV-1h68 detektiert wurde.

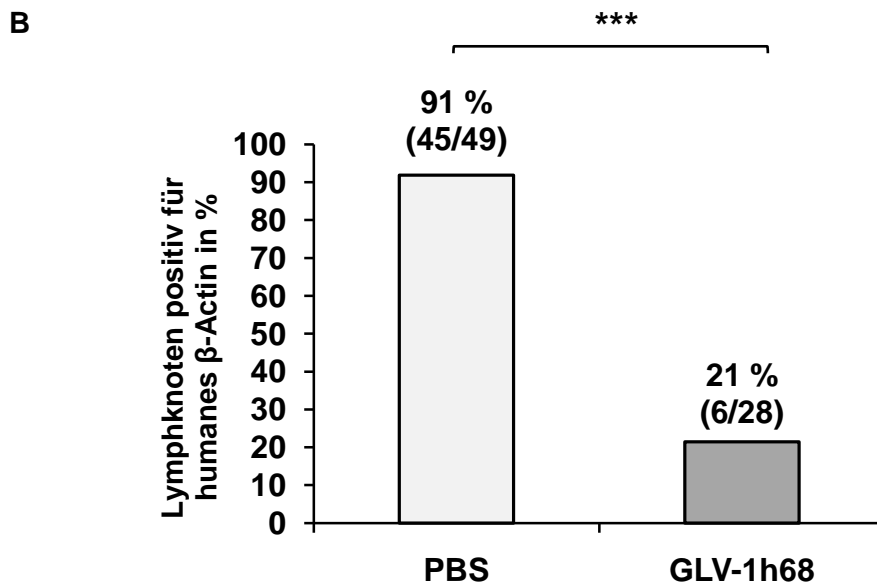
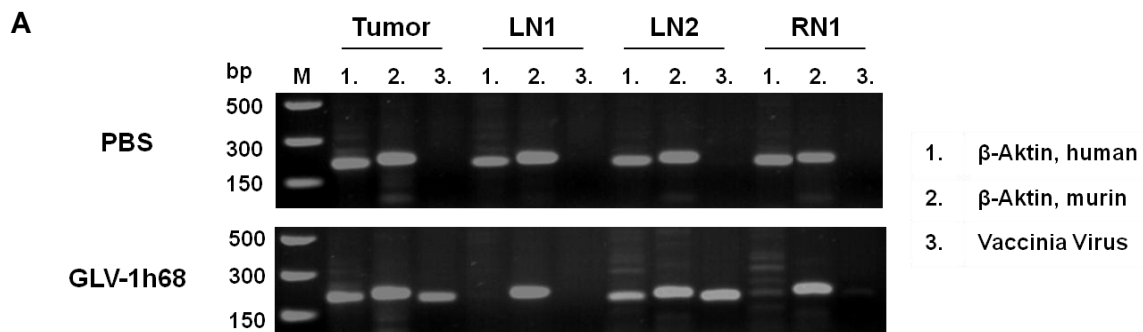


Abbildung 35: Untersuchung von Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 21 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 bzw. PBS auf das Vorhandensein von humanem β -Aktin. (A) PCR-Produkte der cDNA von einem PC-3-Tumor und der dazugehörigen Lymphknotenmetastasen einer PBS- und einer GLV-1h68-behandelten-Maus. (B) Nachweis von humanem β -Aktin in vergrößerten Lymphknoten von elf PBS- und 11 GLV-1h68-behandelten PC-3-Tumor-tragenden Mäusen. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, *** $p < 0.001$.)

4.7.3 Der Einfluss von GLV-1h68 auf hämatogene Metastasen

Da ein Zusammenhang zwischen Lymph- und Blutsystem vielfach beschrieben ist [4-6], sollte weiterhin herausgefunden werden, ob ein Nachweis von PC-3-Zellen im Blut PC-3-Tumor-tragender Mäuse möglich ist und ob GLV-1h68 einen Einfluss auf diese zirkulierenden Zellen hat. Zur Klärung dessen wurden zwölf PC-3-Tumor-tragenden Mäusen intravenös 5×10^6 PFU GLV-1h68 bzw. PBS als Kontrolle injiziert. An den Tagen 7 und 21 nach der Injektion wurden je sechs Mäusen 500 μ l Blut entnommen und in eine RNA-stabilisierende Lösung überführt. Schließlich wurde nach Anleitung des RNeasy® Protect Animal Blood Kit (Qiagen) die RNA isoliert. Abermals wurde die cDNA synthetisiert und eine RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin durchgeführt. Pro untersuchtem Zeitpunkt konnte in zwei der drei PBS-Blutproben eine Bande für humanes β -Aktin detektiert werden, wohingegen in keiner Blutprobe der GLV-1h68 behandelten Gruppe humanes β -Aktin gezeigt werden konnte (Abb. 36). Da die Anzahl der im Blut zirkulierenden Tumorzellen sehr gering ist [128], war nur eine Detektion sehr schwacher Banden für humanes β -Aktin möglich. GLV-1h68 scheint auch im Blut zirkulierende PC-3-Zellen zu infizieren und dadurch zu entfernen.

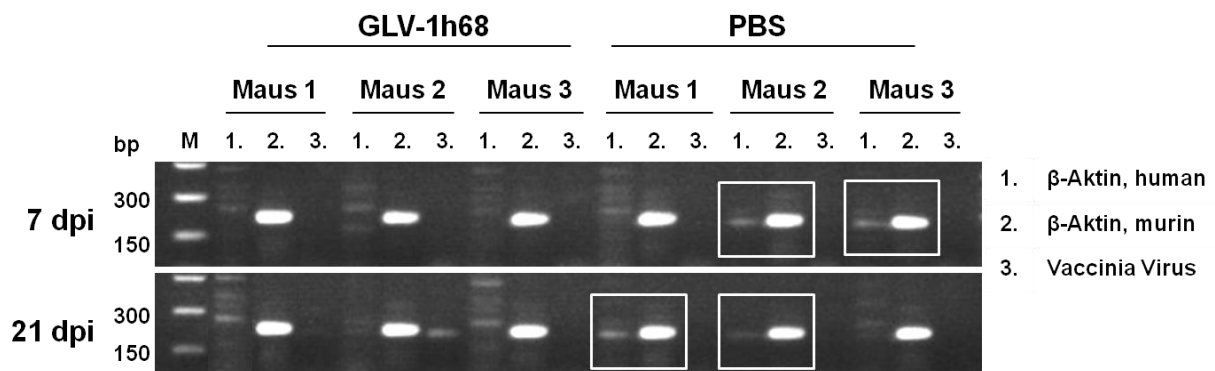


Abbildung 36: Nachweis humaner PC-3-Zellen in Mausblutproben 7 und 21 Tage nach Injektion von GLV-1h68 bzw. PBS mittels RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin. Es wurde je Zeitpunkt das Blut von sechs PC-3-Tumor-tragenden Mäusen untersucht, jeweils drei mit PBS- und drei mit GLV-1h68-Behandlung.

Des Weiteren war es von Interesse, den Einfluss von GLV-1h68 auf hämatogene PC-3-Metastasen der Lungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Lungen von zwölf PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 50 Tage nach der Implantation und 21 Tagen nach der intravenösen Injektion von 5×10^6 PFU GLV-1h68 untersucht. Die Lungen-RNA wurde isoliert und das Vorhandensein von PC-3-Zellen ein weiteres Mal mit Hilfe einer RT-PCR überprüft. Es stellte sich heraus, dass in der Kontrollgruppe fünf von sechs Lungen (83 %) positiv für humane PC-3-Zellen waren. Im Gegensatz dazu konnte in keiner Lunge (0 %) der mit GLV-1h68-behandelten Mäuse Metastasen nachgewiesen werden (Abb. 37). Dadurch konnte

neben der inhibierenden Wirkung von GLV-1h68 auf lymphatische Metastasen auch eine inhibierende Wirkung auf hämatogene Metastasen der Lungen nachgewiesen werden. GLV-1h68 konnte sowohl im Blut migrierende PC-3-Zellen als auch Metastasen in den Lungen erfolgreich inhibieren.

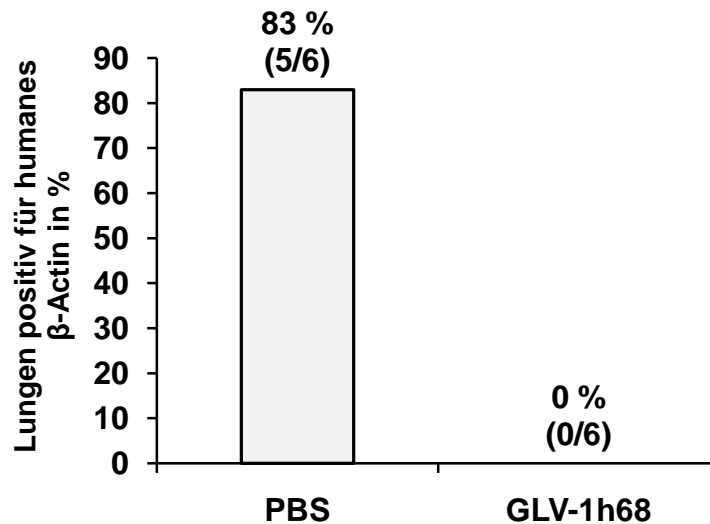


Abbildung 37: Nachweis von humanem β -Aktin in Lungen von PC-3-Tumor-tragenden Mäusen 21 Tage nach einer GLV-1h68- bzw. PBS-Injektion. Es wurden die Lungen von sechs PBS- und von sechs GLV-1h68-behandelten Mäusen analysiert.

4.7.4 Untersuchung des Effekts verschiedener Injektionsarten von GLV-1h68 auf die Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen und Tumoren

Ein weiterer Aspekt, den es zu untersuchen galt, war, ob es durch verschiedene Injektionsarten von GLV-1h68 zu unterschiedlichen Kolonisierungsmustern kommt. Intravenöse (i.v.), intratumorale (i.t.) und intraperitoneale (i.p.) Injektion von GLV-1h68 sollten miteinander verglichen werden. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob eine Hierarchie in der Infektion auftritt. Aus diesem Grund wurden neun Mäusen 2×10^6 PC-3-RFP-Zellen subkutan in die rechte Flanke implantiert. Um sicherzugehen, dass lumbale und renale Lymphknoten schon metastasiert vorliegen, erfolgte die Injektion von GLV-1h68 erst 65 Tage nach der Implantation. Da bislang weder eine intratumorale, noch eine intraperitoneale Injektion von GLV-1h68 im PC-3-Modell getestet wurde, wurde ein höherer Virustiter von 1×10^7 PFU verwendet. 14 Tage nach Injektion wurden sowohl die Lymphknotenmetastasen als auch der dazugehörige PC-3-Tumor untersucht. Für alle drei Injektionsarten konnte das GFP-Signal infizierter Zellen in lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen und im Tumor detektiert werden. Die Intensität des GFP-Signals war dabei jedoch offensichtlich in Lymphknotenmetastasen höher als im PC-3-Tumor. Das ließ eine stärkere Kolonisierung der Metastasen vermuten (Abb. 38). Es konnten keine

Unterschiede in der Injektionsroute von GLV-1h68 bei den drei Injektionsarten festgestellt werden.

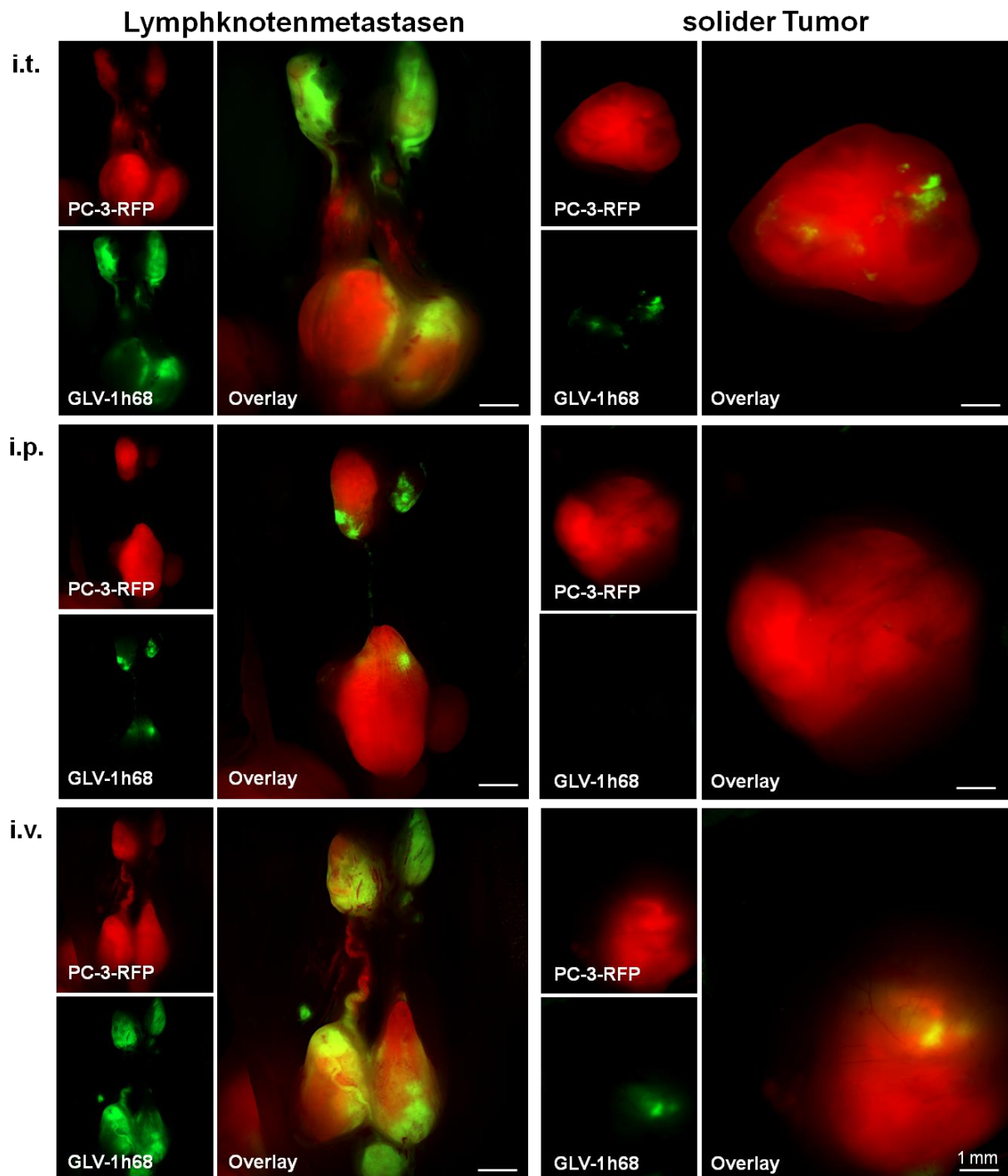


Abbildung 38: PC-3-RFP-Tumore und Lymphknotenmetastasen 79 Tage nach Implantation und 14 Tage nach intratumoraler, intraperitonealer und intravenöser Injektion von GLV-1h68. Links sind die lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen zu sehen, rechts der dazugehörige PC-3-RFP-Tumor.

Um eine erhöhte Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 zu überprüfen, wurden von allen Lymphknotenmetastasen und Tumoren Lysate angefertigt und Plaque-Assays durchgeführt. Dadurch konnte der Titer von GLV-1h68 ermittelt und

verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass bei allen drei Injektionsarten in den Lymphknotenmetastasen ein erhöhter GLV-1h68-Titer im Vergleich zu den dazugehörigen Tumoren vorlag. Tendenziell war der Virustiter in den renalen Lymphknotenmetastasen höher als in den lumbalen, deren Virustiter wiederum höher war, als der in den PC-3-RFP-Tumoren (Abb. 39).

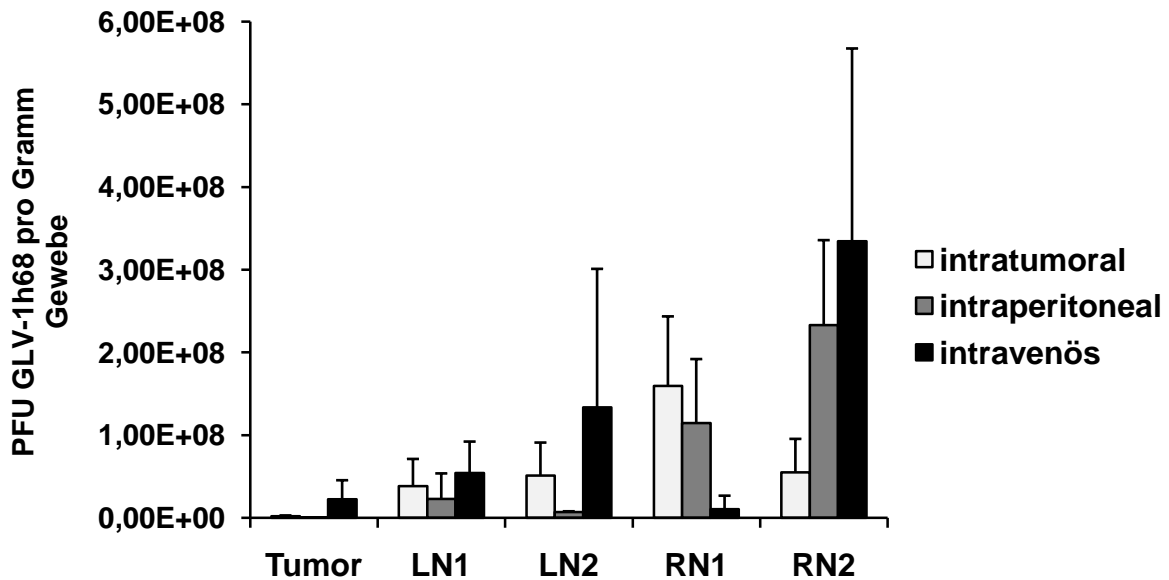


Abbildung 39: Konzentration (PFU) von GLV-1h68 in soliden PC-3-RFP-Tumoren und lumbalen bzw. renalen Lymphknotenmetastasen. Die Bestimmung der Viruskonzentration erfolgte 14 Tage nach intratumoraler, intraperitonealer bzw. intravenöser Injektion und 79 Tage nach Implantation der PC-3-RFP-Tumore.

Zur Veranschaulichung dieser Tendenz wurden Agaroseschnitte einer renalen Lymphknotenmetastase und des Tumors einer PC-3-RFP-Tumor-tragenden Maus sieben Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 angefertigt. Die höhere Intensität des GFP-Signals in der renalen Lymphknotenmetastase war deutlich zu erkennen (Abb. 40).

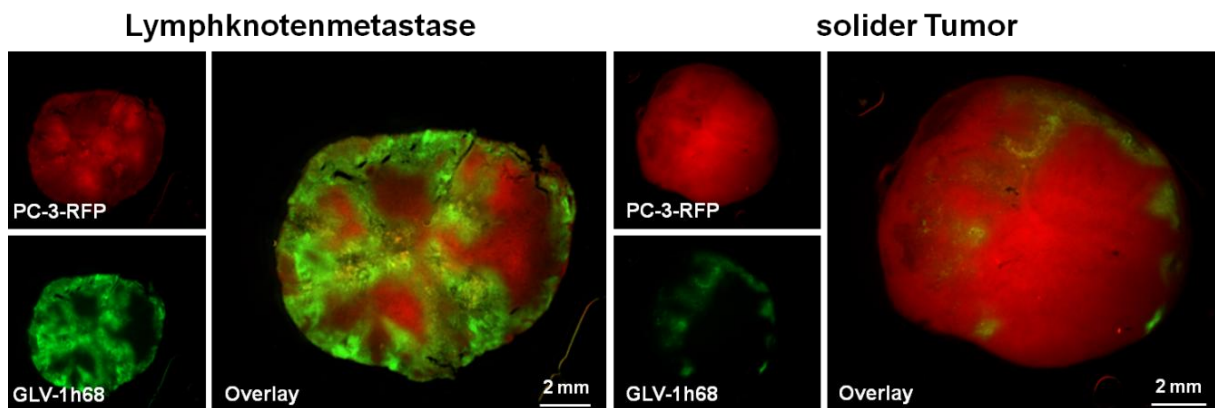


Abbildung 40: Agaroseschnitte einer renalen Lymphknotenmetastase und des soliden PC-3-RFP-Tumors sieben Tage nach der intravenösen Injektion von GLV-1h68 und 71 Tage nach Implantation.

4.7.5 Untersuchung der Kolonisierung von PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen nach i.v. Injektion von GLV-1h68

Den nächsten Schritt stellte die Untersuchung der Kolonisierung von Metastasen und Tumoren durch GLV-1h68 zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion dar. Hierfür wurden erneut PC-3-RFP-Tumore implantiert. Sobald Lymphknotenmetastasen sichtbar bzw. tastbar waren (in diesem Fall 55 Tage nach Implantation), wurden 1×10^7 PFU GLV-1h68 intravenös injiziert. 3, 7 und 14 Tage nach der Injektion wurden je sechs Mäuse entnommen und die PC-3-Tumore und Lymphknotenmetastasen auf das GFP-Signal hin untersucht. Bereits nach drei Tagen konnte ein starkes GFP-Signal in den Lymphknotenmetastasen und im Tumor detektiert werden (Abb. 41).

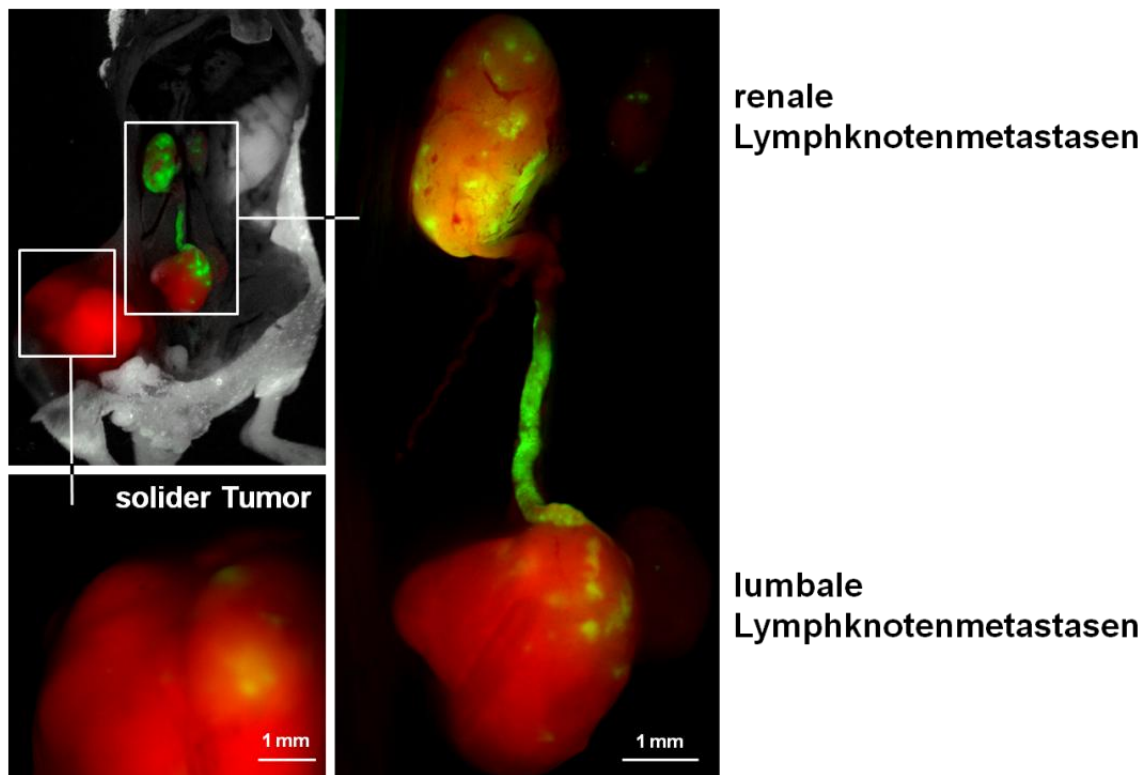


Abbildung 41: GFP-Signal in PC-3-RFP-Tumor und Lymphknotenmetastasen drei Tage nach GLV-1h68-Injektion. Es war eine massive Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen und migrierenden Zellen zu beobachten.

Anschließend wurden von allen Lymphknotenmetastasen und Tumoren Lysate angefertigt und Plaque-Assays durchgeführt, um den Titer von GLV-1h68 zu ermitteln (Abb. 42). Zu allen drei Zeitpunkten nach Virus-Injektion konnte eine signifikante Erhöhung von GLV-1h68 in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Tumor festgestellt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass an Tag drei und sieben nach der Injektion der Titer von GLV-1h68 in einer renalen Lymphknotenmetastase im Vergleich zu einer lumbalen Lymphknotenmetastase signifikant erhöht war. Dies ließ den Schluss zu, dass die

Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 zu Beginn der Injektion umso effektiver verlief, je größer der Abstand zum Tumor war. An Tag 14 nach der Injektion war der Virustiter der Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Tumor noch immer signifikant erhöht, allerdings gab es keine Unterschiede zwischen der Kolonisierung von lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen.

GLV-1h68-Kolonisierung von PC-3 Tumoren and Metastasen

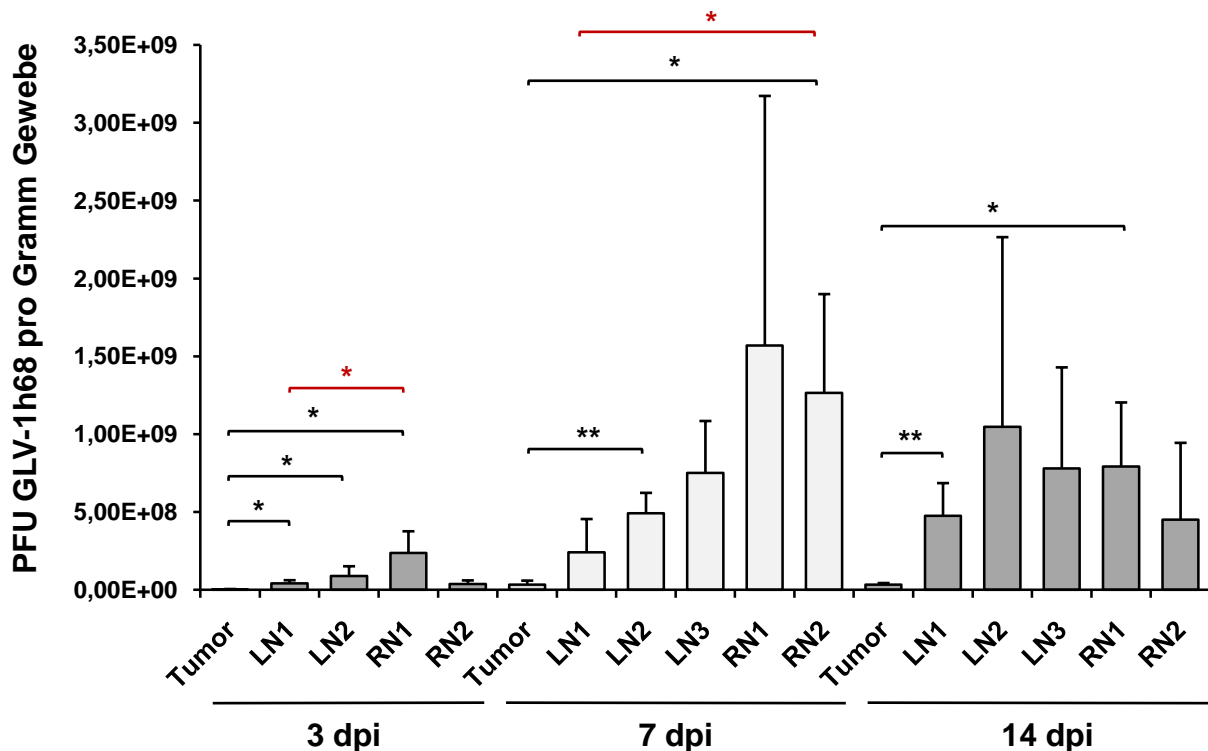


Abbildung 42: PFU von GLV-1h68 in PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen 3, 7 und 14 Tage nach intravenöser Injektion. Die Viruskonzentration wurde pro Gramm Gewebe angegeben. Es wurde die Viruskonzentration aller Lymphknotenmetastasen und Tumore von sechs Mäusen pro Zeitpunkt bestimmt. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.)

Früh nach der Injektion (3 bzw. 7 dpi) kam es zu einer erhöhten Kolonisierung von renalen Lymphknotenmetastasen. Je länger die Zeitspanne nach Injektion, desto ähnlicher der Kolonisierungsgrad von lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen. Das Verhältnis der Viruskonzentration in lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen spiegelte diese Beobachtung wider (Abb. 43). Zur Ermittlung des Verhältnisses wurden die Viruskonzentrationen von LN1 und LN2 zu LN zusammengefasst, die von RN1 und RN2 zu RN und anschließend der Quotient RN/LN bestimmt. An Tag 3 nach Injektion betrug der Quotient RN/LN 2,3 am Tag 7 nach Injektion 3,14, während er an Tag 14 auf 0,83 abfiel. An Tag 7 nach Injektion waren demzufolge die Unterschiede der Viruskonzentration in renalen und lumbalen Lymphknotenmetastase am größten. Die renalen Lymphknotenmetastasen waren zu diesem Zeitpunkt etwa 3x mehr kolonisiert als die lumbalen. Während 14 Tage

nach der Injektion die Kolonisation der lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen nahezu identische war.

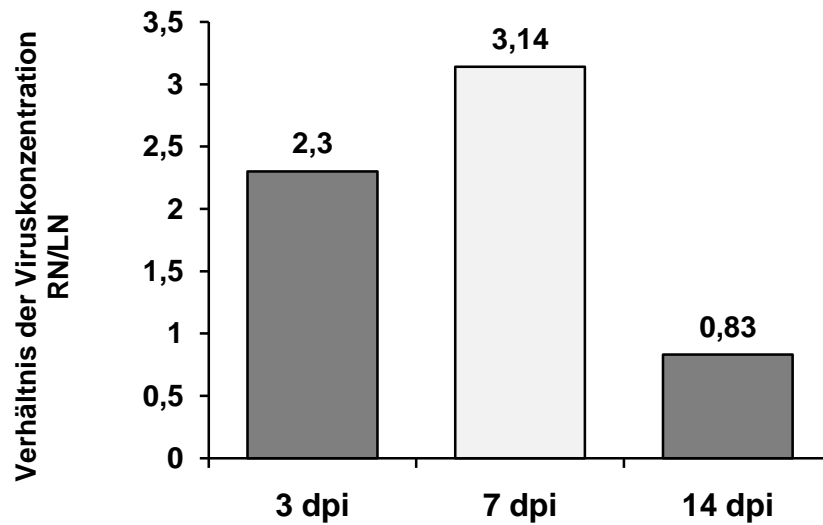
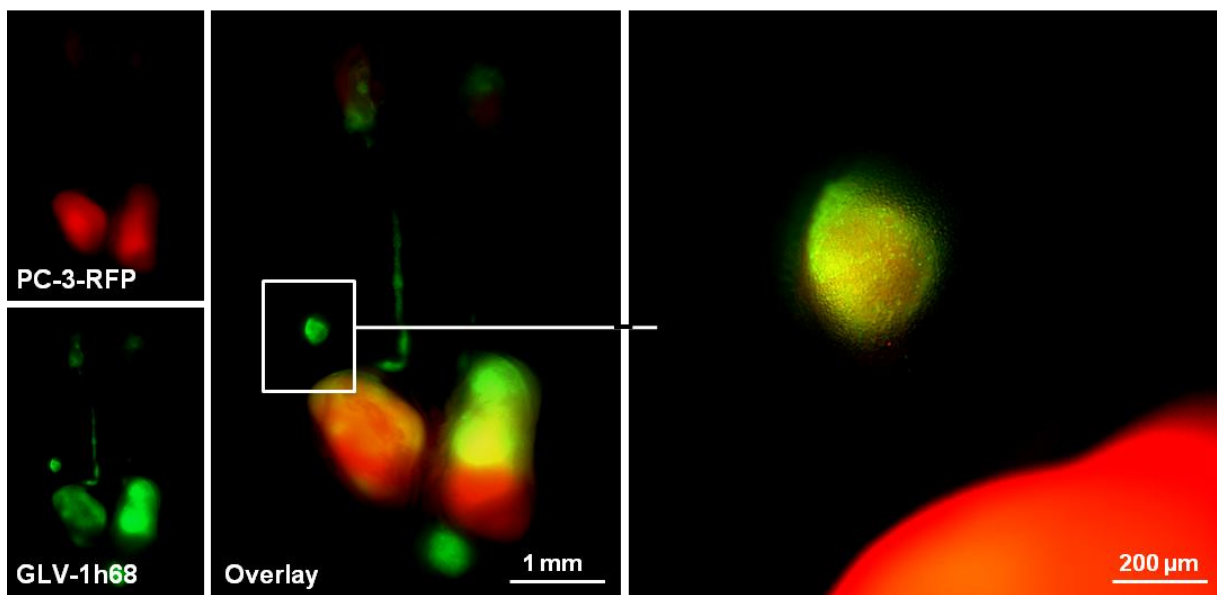


Abbildung 43: Verhältnis der Konzentration von GLV-1h68 RN/LN. An Tag 3 und 7 nach Injektion betrug der Quotient 2,3 bzw. 3,14. An Tag 14 sank er auf 0,83. Während zu Beginn (3 und 7 dpi) nach Injektion die renalen Lymphknotenmetastasen deutlich erhöht kolonisiert waren, nahmen die Unterschiede in der Kolonisation der renalen und lumbalen Lymphknotenmetastase mit der Zeit nach Injektion (14 dpi) ab.

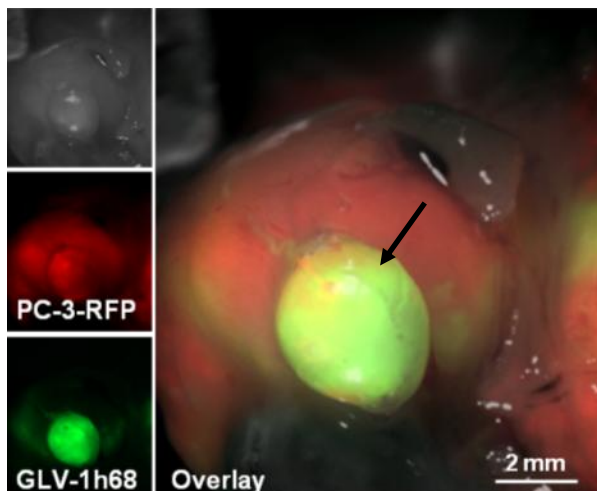
4.7.6 Kolonisierung verschiedener Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68

Neben der effektiven Kolonisierung von lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 konnte gezeigt werden, dass auch weitere Lymphknotenmetastasen kolonisiert werden konnten. So wurde bei PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen sieben Tage nach intravenöser GLV-1h68-Injektion und 69 Tage nach Implantation, ein starkes GFP-Signal in inguinalen Lymphknotenmetastasen, in Metastasen des Sitzbeinlymphknotens und in Metastasen nicht näher definierter Lymphknoten beobachtet (Abb. 44). Die Fähigkeit von GLV-1h68 effektiv Metastasen zu kolonisieren, war somit nicht auf lumbale und renale Lymphknotenmetastasen begrenzt.

A



B



C

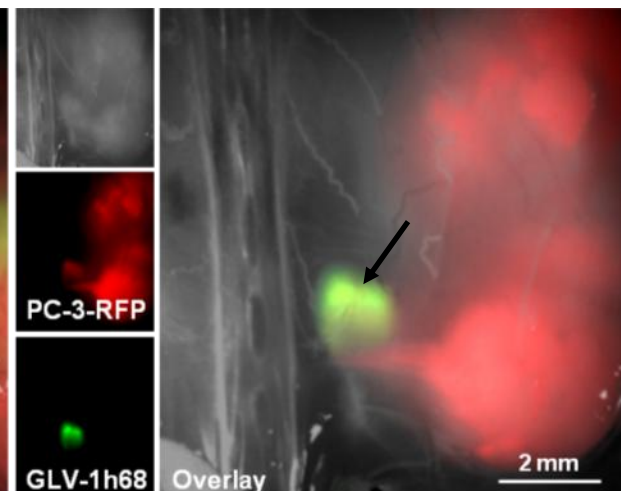


Abbildung 44: Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 sieben Tage nach intravenöser Injektion und 69 Tage nach Implantation der PC-3-RFP-Tumore. (A) inguinale Lymphknotenmetastase, (B) nicht näher definierte Lymphknotenmetastase, welche direkt auf dem PC-3-RFP-Tumor lokalisiert war und (C) Sitzbeinlymphknotenmetastase.

4.8 Ursache der präferentiellen Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen

4.8.1 Untersuchung der Amplifikation von GLV-1h68 in lymphatischem Gewebe

4.8.1.1 GLV-1h68-Injektion in nicht-Tumor-tragende Mäuse

Eine mögliche Ursache der präferentiellen Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen könnte eine mögliche Anreicherung im Lymphsystem bzw. im lymphatischen Gewebe der Lymphknotenmetastasen sein. Um eine Amplifikation von GLV-1h68 im Lymphsystem auszuschließen, wurden nicht-Tumor-tragende Mäuse mit GLV-1h68 infiziert. In den folgenden Wochen wurden je drei Mäuse entnommen und die detektierbaren Lymphknoten analysiert. Für die Analyse wurden Lysate der Lymphknoten hergestellt und Plaque-Assays zur Virustiterbestimmung durchgeführt. Es wurde der Titer von GLV-1h68 pro Lymphknoten bestimmt (Abb. 45). Analysiert wurden lumbale, renale, Sitzbein-, axilläre und brachiale Lymphknoten. Der höchste GLV-1h68-Titer lag bei 140 PFU in den axillären Lymphknoten 14 Tage nach Injektion. Anschließend nahm der GLV-1h68-Titer wieder ab. Die maximal erreichte Viruskonzentration in den lumbalen Lymphknoten war 22, in den renalen 2 PFU, beides ebenfalls 14 Tage nach Injektion. Anschließend nahm der Virustiter wieder ab. Es konnte keine Amplifikation von GLV-1h68 in den Lymphknoten nachgewiesen werden.

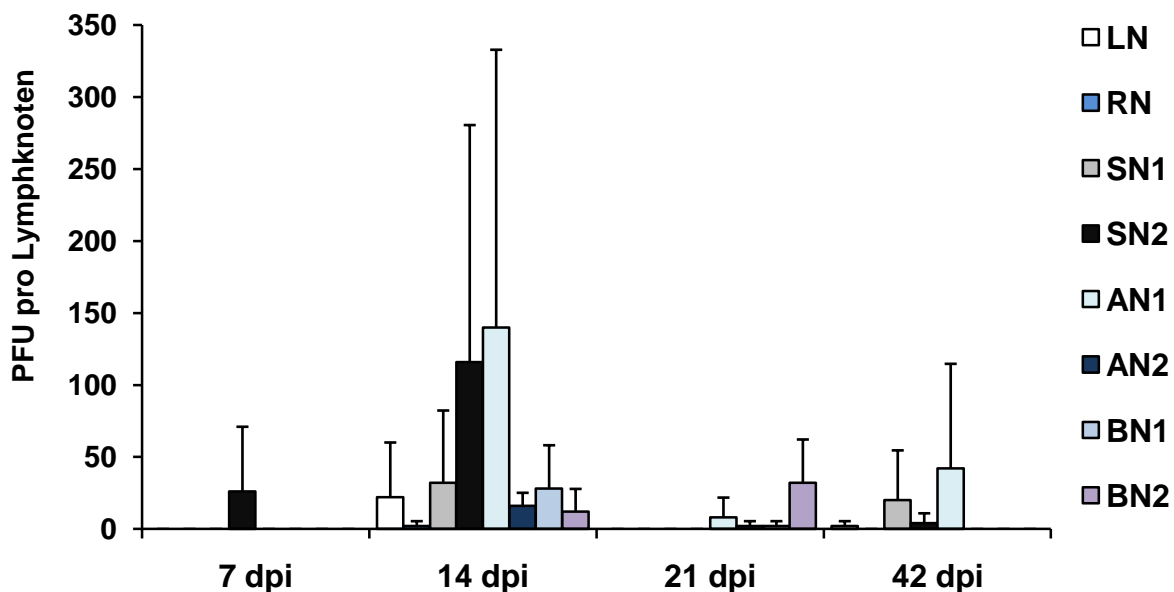


Abbildung 45: PFU von GLV-1h68 pro Lymphknoten von Nicht-Tumor-tragenden Mäusen 7, 14, 21 und 42 Tage nach Virus-Injektion. Untersucht wurden lumbale und renale Lymphknoten, Sitzbeinlymphknoten (SN1, SN2) sowie axilläre (AN1, AN2) und brachiale (BN1, BN2) Lymphknoten von drei Mäusen pro Zeitpunkt.

Im Vergleich dazu konnte in Lymphknotenmetastasen von PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen 7 und 14 Tage nach Virus-Injektion eine wesentlich höhere Konzentration von GLV-1h68 nachgewiesen werden (Abb. 46). Es wurden die Daten aus Versuch 4.7.5. verwendet, in welchem PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen GLV-1h68 intravenös injiziert und anschließend die Viruskonzentration pro Gramm ermittelt wurde. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurde die GLV-1h68-Konzentration pro Lymphknotenmetastase berechnet. Dadurch wurde gezeigt, dass der GLV-1h68-Titer 7 Tage nach Injektion in den Lymphknotenmetastasen über 1×10^7 PFU betrug. Im Gegensatz dazu konnten keine PFU in unmetastasierten Lymphknoten nachgewiesen werden. An Tag 14 nach Injektion betrug der Virustiter in den lumbalen Lymphknotenmetastasen $1,9 \times 10^7$, in den renalen 8×10^6 PFU. Zu diesem Zeitpunkt wurden in unmetastasierten lumbalen Lymphknoten 22 und in renalen 2 PFU GLV-1h68 nachgewiesen. Dadurch wurde verdeutlicht, dass GLV-1h68 Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu unmetastasierten Lymphknoten in einem wesentlich größeren Ausmaß infizierte.

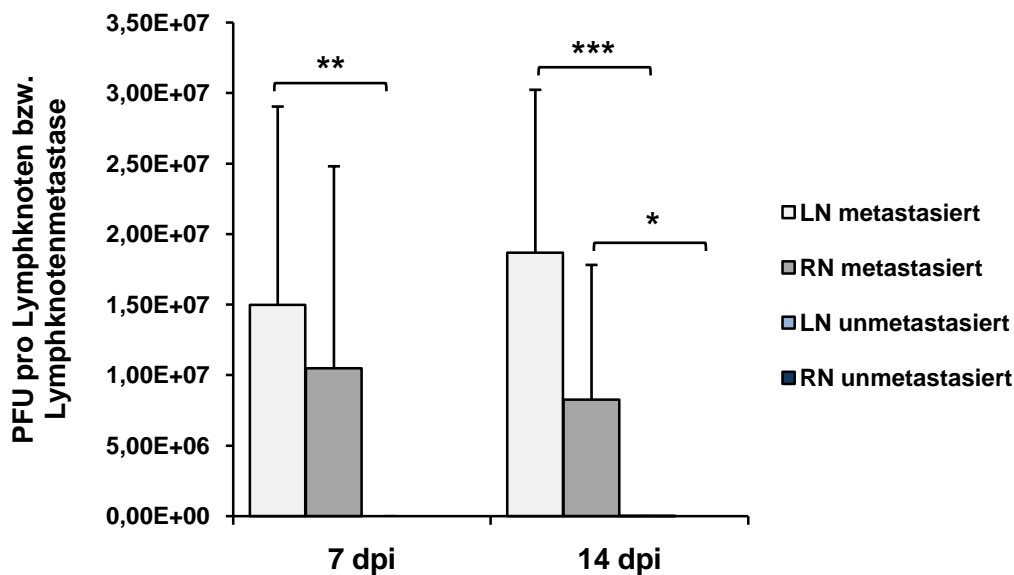


Abbildung 46: GLV-1h68-Titer in renalen und lumbalen Lymphknoten bzw. Lymphknoten-metastasen 7 bzw. 14 Tage nach Injektion. Der Titer von GLV-1h68 wurde in PFU pro Lymphknoten bzw. Lymphknotenmetastase angegeben. Es wurde pro Zeitpunkt nach Injektion die GLV-1h68 Konzentration in den Lymphknoten von drei Mäusen und in den Lymphknotenmetastasen von sechs Mäusen analysiert und miteinander verglichen. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.)

4.8.1.2 Untersuchung des lymphatischen Gewebes in Lymphknotenmetastasen

Zur Klärung der Frage, ob es zu einer vermehrten Amplifikation von GLV-1h68 im lymphatischen Gewebe der Lymphknotenmetastasen kommt, sollte der Anteil des lymphatischen Gewebes in Metastasen und Lymphknoten untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Agaroseschnitte von nativen Lymphknoten mit LYVE-1 und MHCII gefärbt, um herauszufinden, wie die Struktur eines Lymphknotens ohne Beeinflussung von PC-3-Zellinvasion aussieht. Es konnte gezeigt werden, dass die Lymphknoten einer nicht-Tumor-tragenden Maus vollkommen von lymphatisches Gewebe und MHC-II-positiven Zellen durchsetzt waren (Abb. 47).

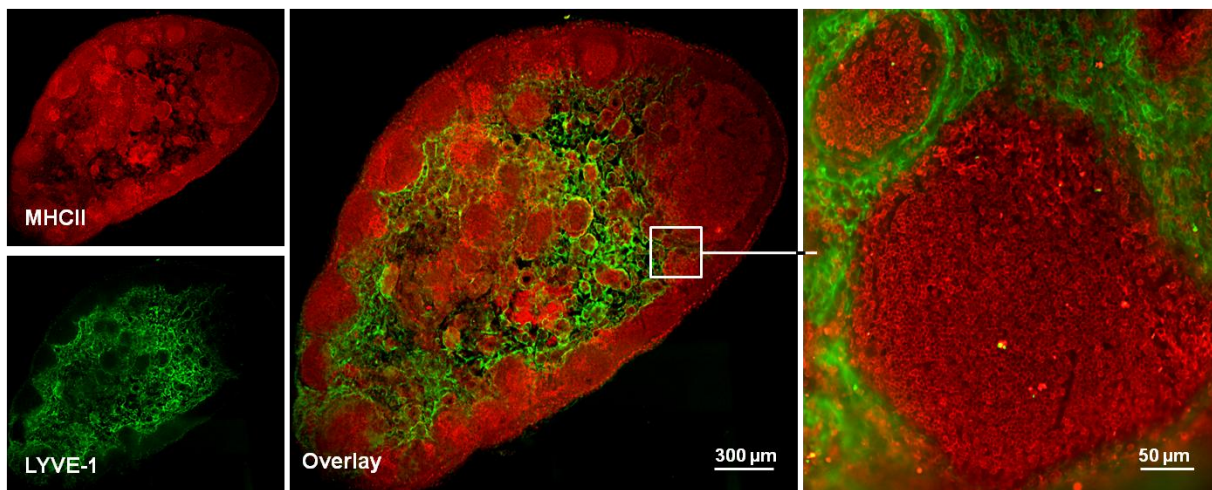


Abbildung 47: Färbung eines Lymphknotens einer nicht-Tumor-tragenden Maus mit LYVE-1 und mit MHCII. LYVE-1-Färbung (grün) zeigt lymphatisches Gewebe, MHC-II-Färbung (rot) zeigt die MHC-II-positiven Zellen des Lymphknotens.

Anschließend wurden Agaroseschnitte von Lymphknoten in verschiedenen Stadien der Metastasierung mit PC-3-RFP-Zellen untersucht. Zum einen wurden Agaroseschnitte von Lymphknoten zu Beginn der PC-3-RFP-Zellinvasion, zum anderen von Lymphknoten im fortgeschrittenen Metastasierungsstadium angefertigt. Diese wurden in der Folge mit LYVE-1 und MHCII gefärbt. Es konnte beobachtet werden, dass ein Lymphknoten zu Beginn der Metastasierung noch vergleichbar viele LYVE-1- und MHC-II-positive Zellen wie ein unmetastasierter Lymphknoten besitzt. Durch Invasion und Vermehrung der PC-3-RFP-Zellen in den Lymphknoten kam es aber zu einer Verdrängung des lymphatischen Gewebes und der MHC-II-positiven Zellen. Je fortgeschrittener der Metastasierungsgrad eines Lymphknotens war, desto weniger ähnelte dieser einem nativen Lymphknoten (Abb. 48). Der Anteil des lymphatischen Gewebes nahm mit Zunahme der PC-3-RFP-Zellen in den Lymphknoten ab. In einer Lymphknotenmetastase konnte kaum noch lymphatisches Gewebe identifiziert werden, welches von GLV-1h68 infiziert werden könnte. Die Ursache für

die präferentielle GLV-1h68-Infektion von Lymphknotenmetastasen dürfte folglich anders geartet sein.

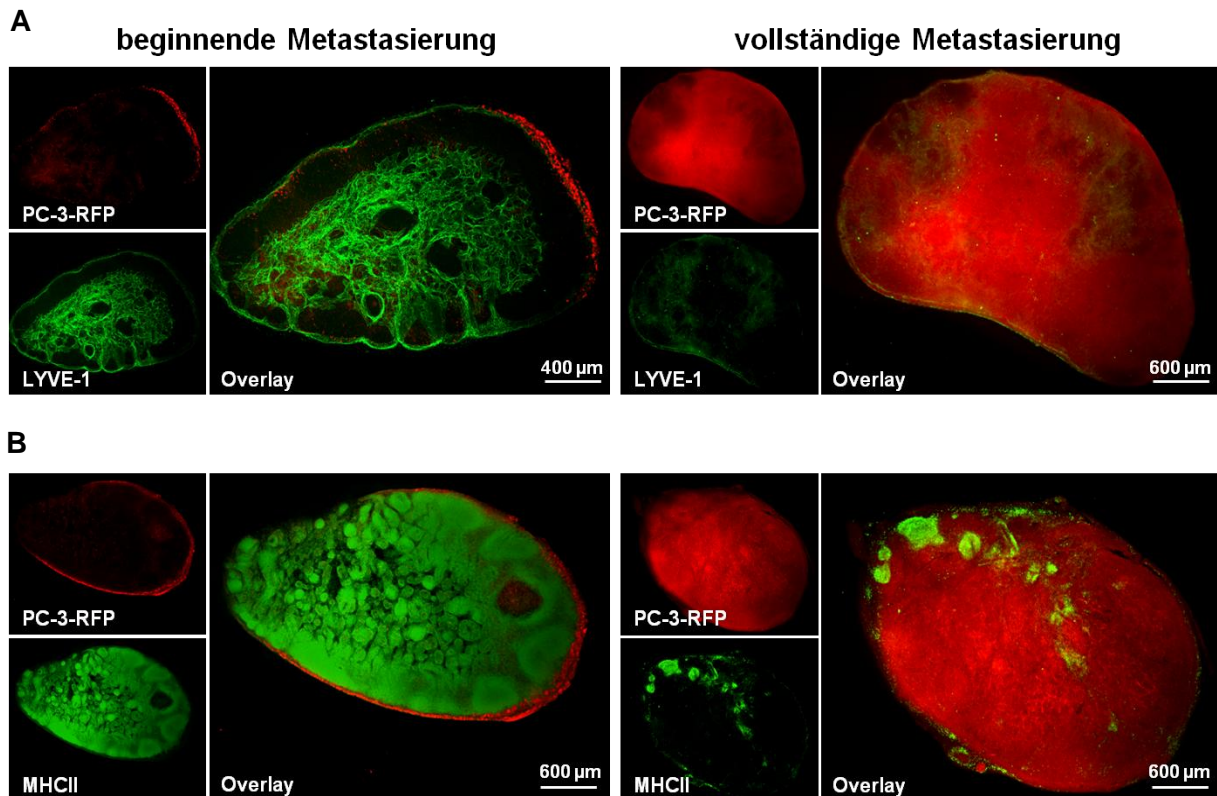


Abbildung 48: Färbung von lumbalen Lymphknoten PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse in verschiedenen Stadien der Metastasierung mit LYVE-1 und MHC-II. Links die beginnende Metastasierung, rechts die vollständige Metastasierung. (A) Färbung von LYVE-1-, (B) Färbung von MHCII-positiven Zellen.

4.8.2 Nekrotische Zonen in Tumoren und Metastasen

Eine weitere Erklärung für die präferentielle Injektion von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 könnte eine im Vergleich zum Tumor geringere nekrotische Zone darstellen. Es wird angenommen, dass die Amplifikation von GLV-1h68 in nekrotischen Zonen erschwert ist. Zur Analyse der nekrotischen Bereiche wurden PC-3-RFP-Tumore und Lymphknotenmetastasen sieben Tage nach intravenöser Injektion von 1×10^7 PFU GLV-1h68 (57 Tage nach Implantation) untersucht. Es wurde jeweils der Tumor, LN1 und RN1 von fünf PBS- und fünf GLV-1h68-behandelten Mäusen analysiert. Von jeder Probe wurden Agaroseschnitte angefertigt und die nekrotischen Areale durch Färbung mit Hoechst und anschließenden Fluoreszenzintensitätsauswertungen ermittelt. Es stellte sich heraus, dass sowohl in der PBS- als auch in der GLV-1h68-behandelten Gruppe signifikante Unterschiede zwischen Lymphknotenmetastasen und Tumoren in dem Anteil der nekrotischen Zone auftraten (Abb. 49). Es wurde gezeigt, dass der Anteil an nekrotischem Bereich in PC-3-

RFP-Tumoren höher ist als in den Lymphknotenmetastasen. Es konnten keine Unterschiede zwischen PBS- und GLV-1h68-Behandlung festgestellt werden.

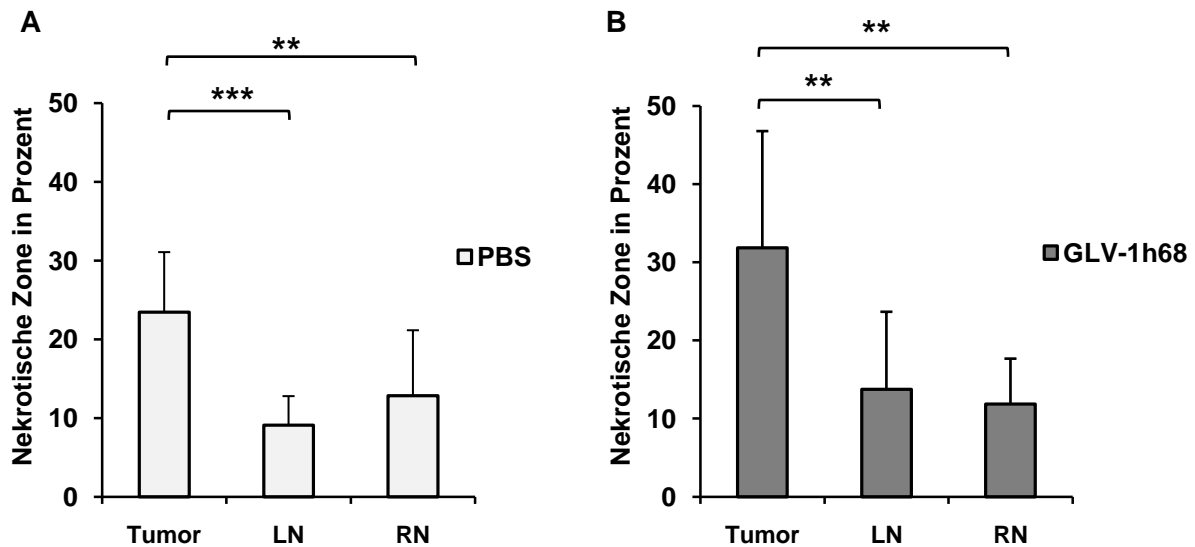


Abbildung 49: Anteil der nekrotischen Zone in PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen 57 Tage nach Implantation und 7 Tage nach (A) PBS- bzw. (B) GLV-1h68-Injektion. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.)

4.8.3 Untersuchung von Blutgefäßen in PC-3-Tumoren und –Metastasen

4.8.3.1 Anzahl von Blutgefäßen und CD31-Konzentration in Tumoren und Lymphknotenmetastasen

Unterschiede in der Durchblutung könnten die präferentielle Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen ebenfalls beeinflussen. Hierfür wurde zum einen die Dichte von CD31-positiven Blutgefäßen in PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen 57 Tage nach Implantation und sieben Tage nach PBS bzw. GLV-1h68-Injektion untersucht. Zum anderen wurde die CD31-Signalintensität der Blutgefäße ermittelt. Es wurden Agaroseschnitte von PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen mit CD31 gefärbt und die CD31-positiven Strukturen anschließend gezählt bzw. dessen Fluoreszenzintensität ermittelt. Zur Ermittlung der Blutgefäßdichte wurde die Anzahl der Blutgefäße in je vier Arealen eines Schnittes von fünf PBS- und fünf GLV-1h68-behandelten Tumoren und Metastasen bestimmt. An Hand dieser Auszählung wurde festgestellt, dass es durch Behandlung mit GLV-1h68 nach nur sieben Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Blutgefäßdichte im PC-3-Tumor und auch in den Lymphknotenmetastasen kam (Abb. 50). Außerdem wurde gezeigt, dass die Anzahl der Blutgefäße in renalen Lymphknotenmetastasen höher war als die in lumbalen.

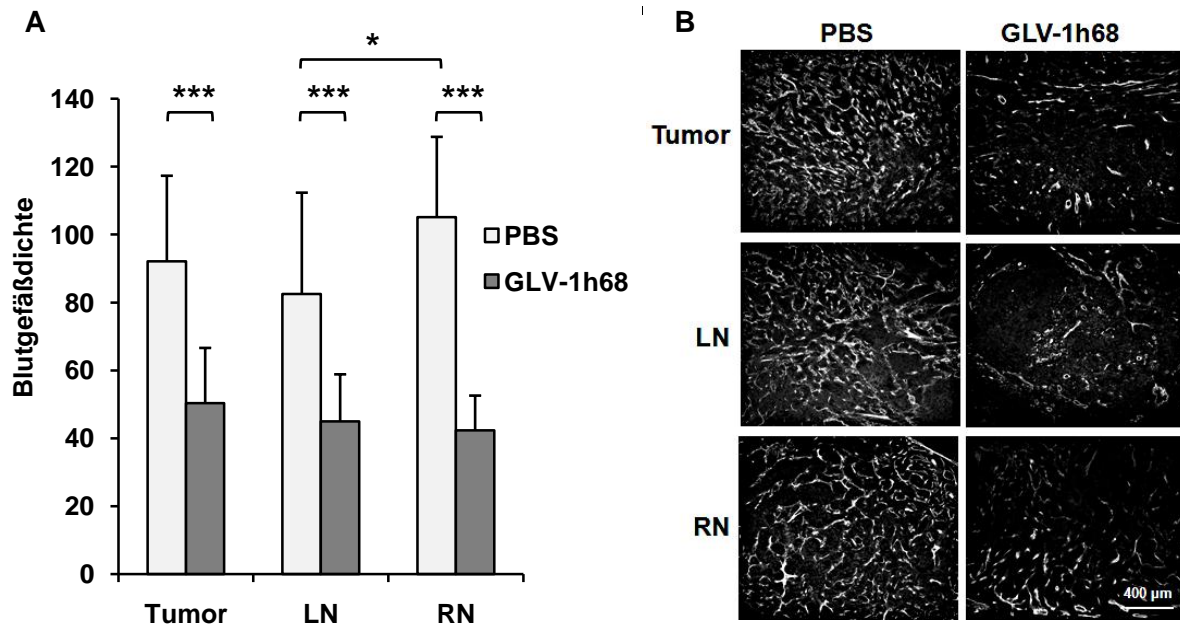


Abbildung 50: Blutgefäßdichte in PC-3-RFP-Tumoren und-Lymphknotenmetastasen 7 Tage nach PBS- bzw. GLV-1h68-Behandlung. (A) Blutgefäßdichte in PC-3-RFP-Tumor, LN und RN in Kontrollmäusen bzw. infizierten Mäusen. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.) (B) Konfokale Aufnahmen der gezählten CD31-positiven Gefäße in Tumor, LN und RN.

Nachdem keine Unterschiede zwischen soliden Tumoren und Lymphknotenmetastasen in der Anzahl der Blutgefäße gezeigt werden konnte, wurde die Intensität des Signals der CD31-Färbung analysiert. Zur Bestimmung der Intensität wurden abermals vier Areale eines Schnittes von je fünf PBS- und fünf GLV-1h68-behandelten Tumoren und Metastasen untersucht.

Auf diese Weise konnte ein signifikanter Anstieg der Signalintensität von CD31 in lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum PC-3-RFP-Tumor sowohl in der PBS- als auch in der GLV-1h68-behandelten Gruppe gezeigt werden (Abb. 51). Des Weiteren stellte sich heraus, dass es sieben Tage nach Injektion von GLV-1h68, trotz der Abnahme der Blutgefäßdichte, zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität von CD31 im Vergleich zur PBS-Gruppe kam.

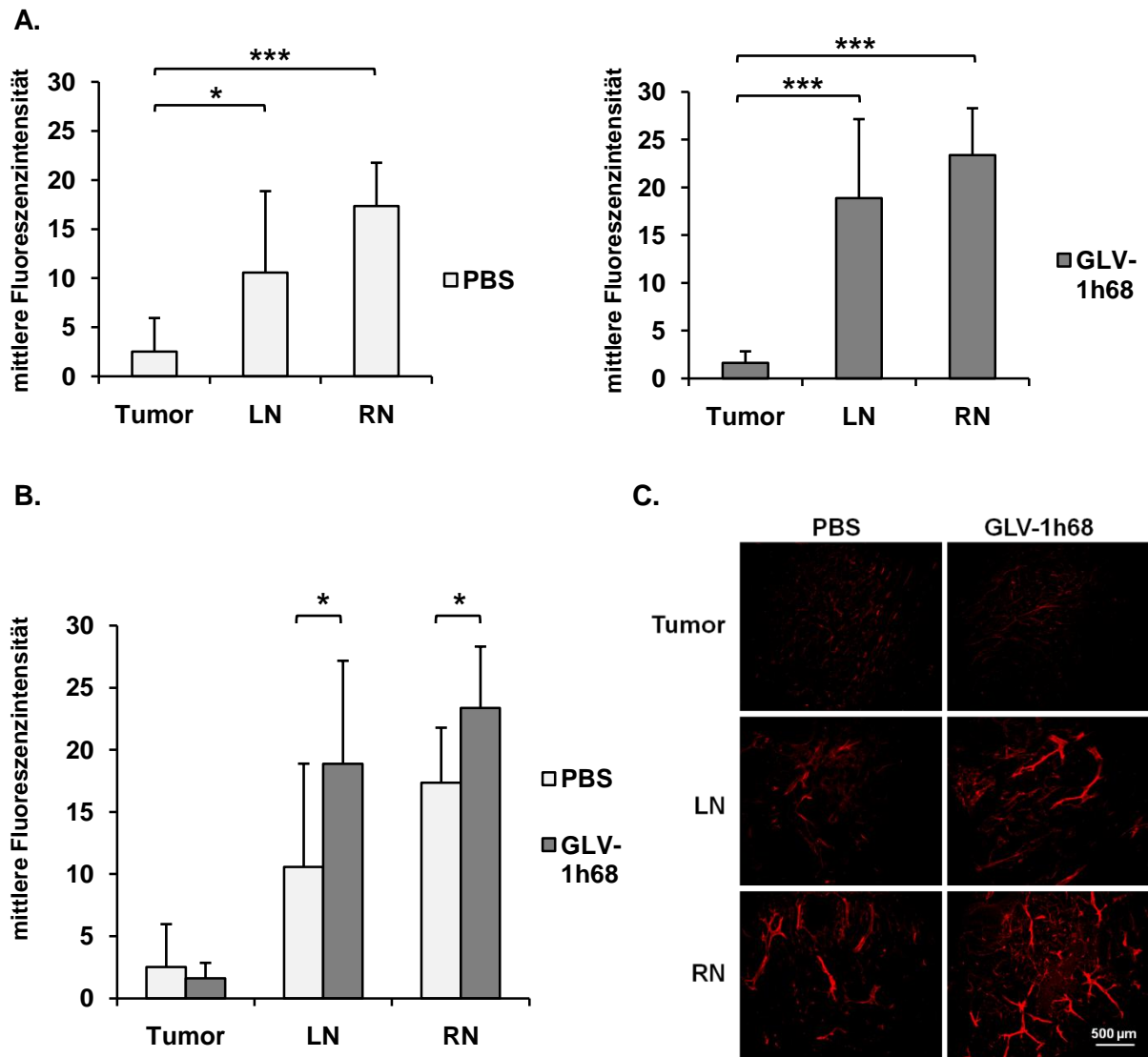


Abbildung 51: Mittlere Fluoreszenzintensität der CD31-Färbung in PC-3-RFP-Tumoren und Lymphknotenmetastasen sieben Tage nach PBS- bzw. GLV-1h68-Injektion. (A) Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität zwischen Tumoren, LN und RN zum einem nach PBS-Behandlung und zum anderen nach GLV-1h68-Behandlung. (B) Unterschiede zwischen PBS und GLV-1h68-Behandlung ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) Mikroskopische Aufnahmen der CD31-Färbung in Agaroseschnitten von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen mit und ohne GLV-1h68-Behandlung.

4.8.3.2 Analyse der CD31-Expression auf Proteinebene

Zusätzlich wurde die CD31-Expression in Tumoren und Lymphknotenmetastasen PC-3-Tumor-tragender Mäuse mit Hilfe des Western Blot analysiert. Hierfür wurden Proteinlysate von Tumoren und Lymphknotenmetastasen von sechs PC-3-Tumor-tragenden Mäusen untersucht, drei davon 47 Tage, die anderen drei 64 Tage nach Implantation. Die Daten aller sechs Mäuse wurden zusammengefasst, da der Zeitpunkt nach Implantation in diesem Fall unerheblich war. Des Weiteren wurden die Werte von LN1 und LN2 zu LNs und die von RN1

und RN2 zu RNs zusammengefasst. Unterschiede in der Expression von CD31 in Tumoren und Metastasen wurden mit Hilfe des Night-Owl-Imagers dokumentiert. Die Signalstärken, welche mit der CD31-Konzentration korrelieren, wurden über die Lichtemission gemessen und konnten so miteinander verglichen werden (Abb. 52). In den lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen wurde im Vergleich zum Tumor eine erhöhte CD31-Expression nachgewiesen.

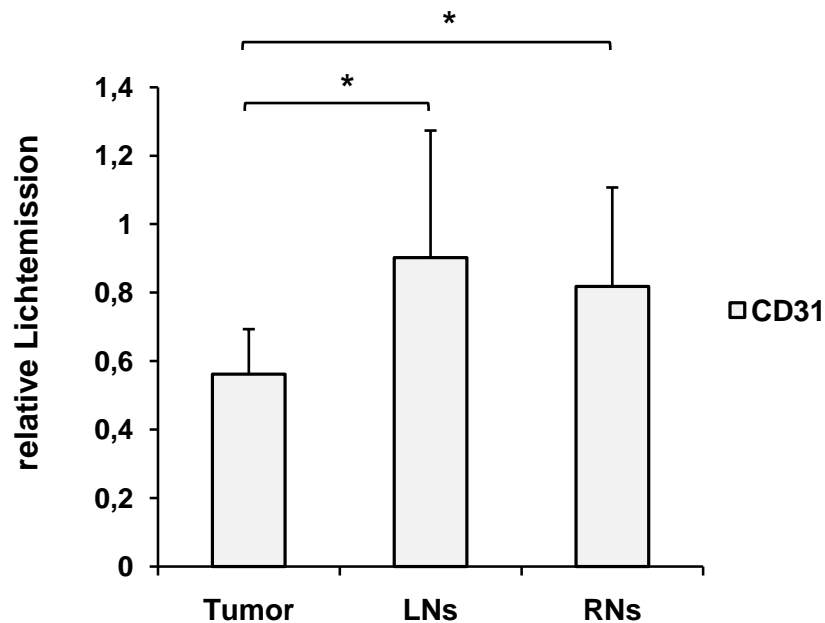


Abbildung 52: Relative Lichtemission der CD31-Expression in PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen ohne Virusbehandlung. ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$)

4.8.4 Anzahl und LYVE-1-Konzentration der Lymphgefäße in PC-3-Tumoren und -Metastasen

Es wurden nach der Analyse der Vaskularisierung von PC-3-Tumoren und -Metastasen auch deren Lymphgefäße untersucht. 50 Tage nach Implantation wurden fünf PC-3-RFP-Tumore mit PBS und fünf mit GLV-1h68 behandelt. Nach sieben Tagen der Injektion wurden Agaroseschnitte der Tumore und Metastasen angefertigt. Diese wurden mit LYVE-1 gefärbt. Anschließend wurden die Lymphgefäße gezählt und die Fluoreszenzintensität ermittelt. Zur Bestimmung der Lymphgefäßdichte wurden wiederum vier Areale je Schnitt von PC-3-RFP-Tumoren und -Lymphknotenmetastasen ausgezählt. Die Zählung von Lymphgefäßen erfolgte analog der Zählung der Blutgefäße. Es konnten keine Unterschiede in der Lymphgefäßdichte zwischen PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Sowohl im Tumor als auch in den Metastasen kam es jedoch sieben Tage nach der Injektion von GLV-1h68 zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der Lymphgefäße (Abb. 54).

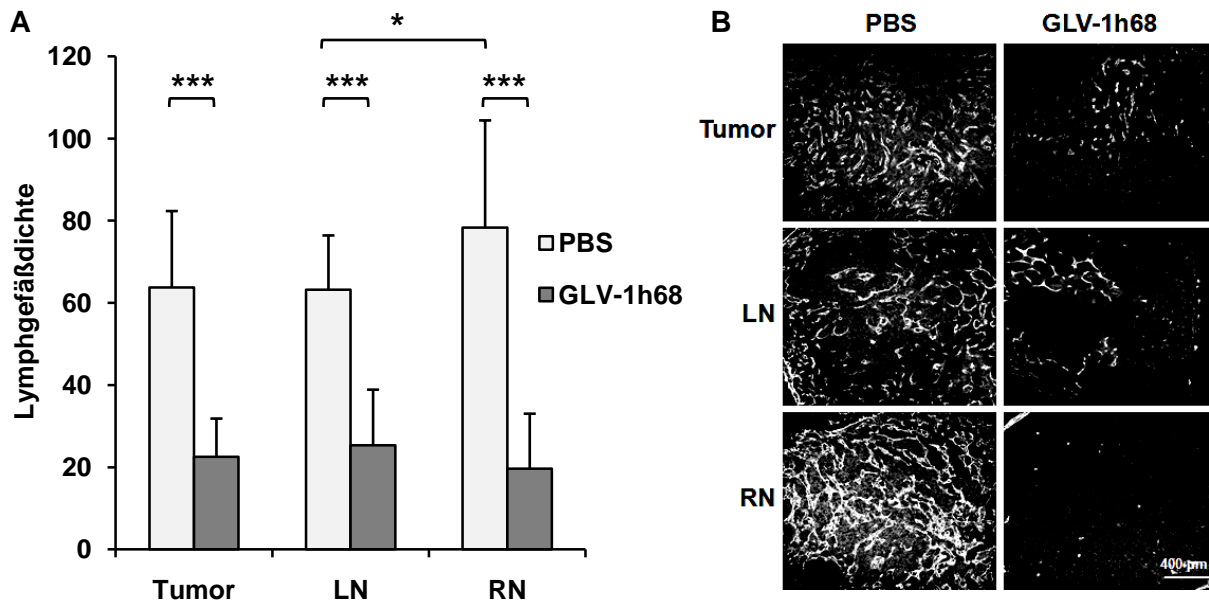


Abbildung 53: Lymphgefäßdichte in Tumoren und Metastasen sieben Tage nach GLV-1h68-Injektion. (A) Lymphgefäßdichte in PC-3-RFP-Tumoren, LN und RN in Kontrollmäusen bzw. infizierten Mäusen ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) Konfokale Aufnahmen der gezählten Lymphgefäße in Tumor, LN und RN.

Da auch in der Anzahl der Lymphgefäße zwischen Tumoren und Lymphknotenmetastasen keine Unterschiede gezeigt werden konnten, wurde die Fluoreszenzintensität der Färbung analysiert. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität von LYVE-1 erfolgte analog der Bestimmung der CD31-Fluoreszenzintensität. Hierbei stellte sich heraus, dass trotz gleicher Anzahl der Lymphgefäße in Tumoren und Lymphknotenmetastasen die Fluoreszenzintensität der Färbung für LYVE-1 in den Lymphknotenmetastasen sowohl in der PBS- als auch in der GLV-1h68-behandelten Gruppe signifikant erhöht ist. Durch GLV-1h68-Behandlung kam es im Tumor und in der lumbalen Lymphknotenmetastase nicht zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität von LYVE-1, während bei der renalen Lymphknotenmetastase eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (Abb. 54).

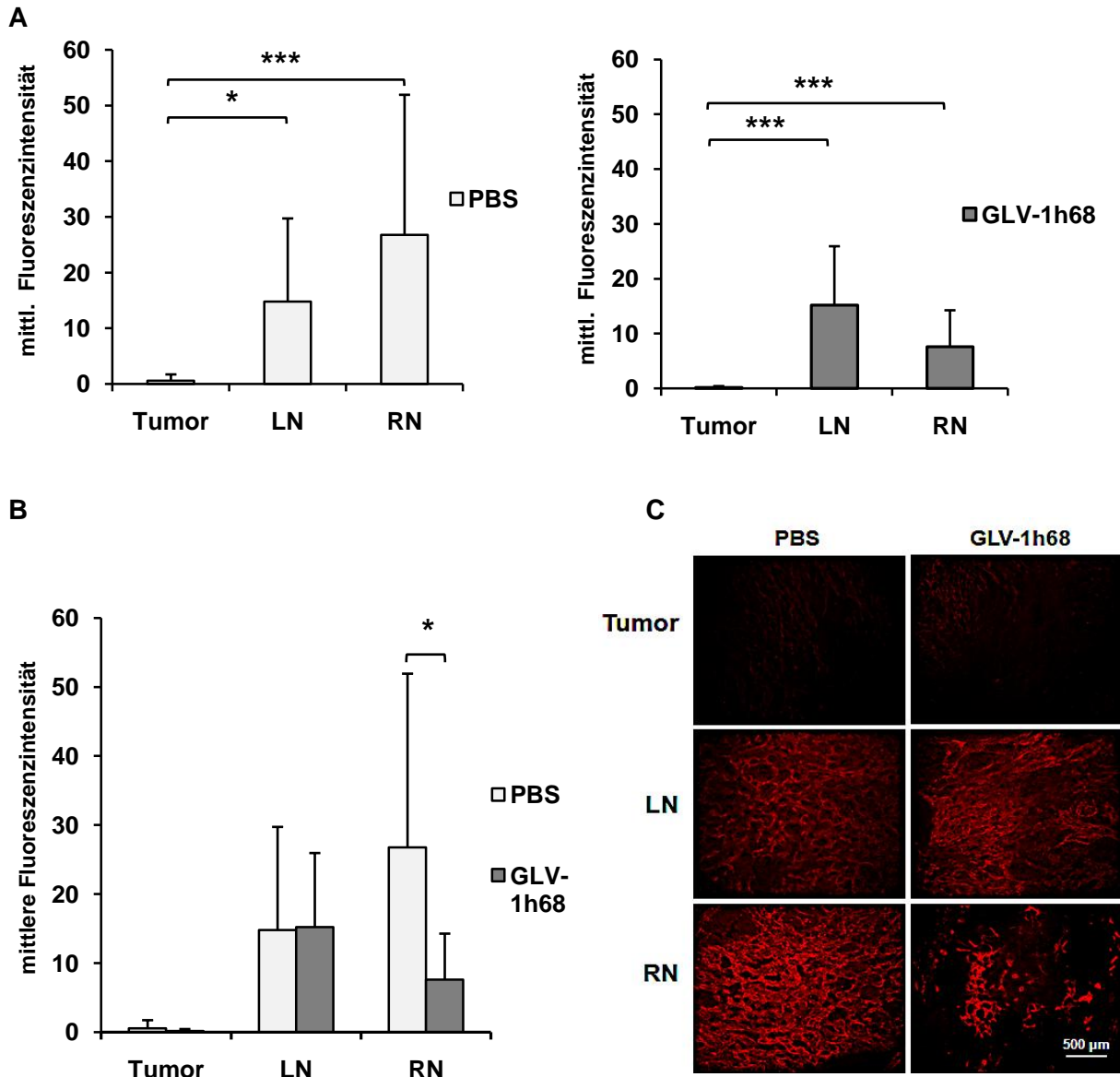


Abbildung 54: Fluoreszenzintensität der LYVE-1-Färbung in PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen sieben Tage nach Injektion von GLV-1h68 bzw. PBS. (A) Unterschiede der mittleren Fluoreszenzintensität zwischen Tumor, LN und RN zum einem nach PBS-Behandlung und zum anderen nach GLV-1h68-Behandlung. (B) Unterschiede der Fluoreszenzintensität zwischen PBS und GLV-1h68-Behandlung ($p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) Mikroskopische Aufnahmen der LYVE-1-Färbung in Agaroseschnitten von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen mit und ohne GLV-1h68-Behandlung.

5 Diskussion

5.1 Das Metastasenmodell der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Man geht davon aus, dass der Tod von Krebspatienten in 90 % der Fälle direkt oder indirekt durch Metastasen verursacht wird. Die Prognose zum Krankheitsverlauf ist dadurch unmittelbar an den metastatischen Status des Karzinoms gebunden [69,70]. Primäre Tumore an sich können oftmals chirurgisch entfernt werden, aber diejenigen Zellen, welche die Fähigkeit zu migrieren und sich an neuen Stellen anzusiedeln erlangt haben, üben eine enorm schädliche Wirkung auf den Körper aus. Lange Zeit stand die Erforschung von Entwicklung und Wachstum des primären Tumors im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, im Gegensatz zu dem komplizierteren und weniger erforschten Gebiet der Metastasierung dieser Tumore [129]. Die Metastasierung ist ein schwer kontrollierbarer Krankheitsprozess und stellt damit ein Hauptproblem des Gesundheitswesens dar. Aus diesem Grunde war ein erstes Ziel dieser Arbeit, ein metastasierendes Tumormodell zu finden, um dieses anschließend im Detail analysieren zu können. Dies gelang am Beispiel des humanen Prostatakarzinoms.

Wird das Prostatakarzinom früh erkannt, liegt die Heilungsrate bei 80 bis 90 %, unabhängig davon, ob eine innere Bestrahlung (Brachytherapie), eine äußere Strahlentherapie oder eine radikale Prostatektomie durchgeführt wird. Sobald jedoch das Prostatakarzinom nicht mehr organbegrenzt vorliegt und bereits Lymphknoten befallen sind, sinkt die Heilungswahrscheinlichkeit der Patienten dramatisch. Trotz dieses Wissens verläuft die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten des metastasierenden Prostatakarzinoms sehr langsam [3].

In dieser Arbeit wurden bei Untersuchungen von Mäusen mit Tumoren der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 vergrößerte lumbale und renale Lymphknoten gefunden. Diese Vergrößerung war ein erstes Indiz für eine Metastasierung der PC-3-Tumore in die Lymphknoten. Aus diesem Grund wurden anschließend vergrößerte Lymphknoten auf das Vorhandensein von metastasierenden PC-3-Zellen hin getestet. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer RT-PCR unter Verwendung von Primern für humanes β -Aktin. Dadurch konnte gezeigt werden, dass 42 Tage nach subkutaner Implantation von PC-3-Tumoren in 90 Prozent aller vergrößerten Lymphknoten metastasierende PC-3-Zellen vorlagen. Zusätzlich wurde durch Fluoreszenz-basierte Visualisierung der PC-3-Zellen in der Maus die Lymphknotenmetastasierung in den vergrößerten lumbalen und renalen Lymphknoten der Tumor-tragenden Mäuse nachgewiesen. Die Visualisierung wurde durch Einführung des für

das rot fluoreszierenden Protein (RFP) kodierenden Gens in PC-3-Zellen mittels lentiviraler Transduktion ermöglicht. So konnte ein weiterer Nachweis erbracht werden, dass die Vergrößerung der Lymphknoten auf Invasion metastasierender, sich teilender PC-3-Zellen zurückzuführen war.

Die Metastasierung von Karzinomen in Lymphknoten wurde sowohl in Tierversuchen als auch im Menschen vielfach in der Literatur beschrieben [5,6,11,16,130,131], unter anderem auch für das Prostatakarzinom [18]. Dabei ist neben der Metastasierung des Prostatakarzinoms in Lymphknoten auch eine Metastasierung in weitere Organe bekannt. Im Januar 2000 wurde von Bubendorf *et al.* eine Studie publiziert, in der 1.589 Autopsien von Prostatakrebspatienten auf das Vorhandensein von hämatogenen Metastasen untersucht wurden [55]. Es stellte sich heraus, dass in 35 % eine hämatogene Metastasierung vorlag, d.h. eine Metastasierung der Tumorzellen über das Blutsystem. Dabei waren 90 % Metastasen in den Knochen, 46 % in der Lunge, 25 % in Leber und 13 % in Nieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben metastasierten Lymphknoten auch PC-3-RFP-Metastasen in den Lungen PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse detektiert werden. Dennoch konnten keine metastasierenden PC-3-Zellen in Knochen, Leber oder Nieren nachgewiesen werden. Die Knochen und Organe von PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen, die aus einem Versuch genommen wurden, wurden jeweils fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Weder in den Knochen, noch in den Nieren oder Lebern konnte ein RFP-Signal der PC-3-Zellen detektiert werden. Zum einen könnte es sein, dass in diesem PC-3-RFP-Modell keine Metastasenbildung in Knochen, Nieren oder Leber stattgefunden hatte, zum anderen könnte eine Detektion dieser Metastasen aus technischen Gründen nicht gelungen sein. In Studien anderer Gruppen konnten Knochenmetastasen der PC-3-Zelllinie durch inseriertes GFP ermittelt werden [132]. Hier war dies durch RFP nicht möglich. Eventuell waren die PC-3-RFP-Metastasen in Knochen sehr klein oder schlecht ausgeprägt, falls überhaupt vorhanden.

Um zu untersuchen, ob dennoch PC-3-Metastasen in Knochen, Leber und Nieren vorhanden sind, wäre es möglich, deren RNA zu isolieren und über eine RT-PCR auf das Vorhandensein von humanem β -Aktin hin zu überprüfen. Des Weiteren wird zurzeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Nuklearmedizin der Universität Würzburg versucht, PET-Imaging an lebenden PC-3-Tumor-tragenden Mäusen zu etablieren. Durch diese Art der Bildgebung könnte die Metastasierung in Knochen und weiteren Organen, wie Leber oder Nieren, verfolgt werden. Auch könnte durch Implantation von PC-3-Zellen, denen lentiviral eine Luciferase (*click beetle green luciferase*, CBG) eingefügt wurde, eine Visualisierung weiterer Metastasen durch Verwendung eines *Low-Light-Imagers* ermöglicht bzw. vereinfacht werden.

5.2 Ausbreitung von PC-3-Zellen über das Lymphsystem

Viele Indizien sprachen dafür, dass in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen eine Migration der PC-3-Zellen in hohem Maße über das Lymphsystem erfolgte. Zum einen konnte gezeigt werden, dass lumbale und renale Lymphknoten durch PC-3-Zellen kolonisiert werden und zum anderen, dass PC-3-Zellen in Lymphgefäßen zwischen diesen Lymphknoten migrierten.

Es wurde beobachtet, dass Lymphknoten in unmittelbarer Nähe zum PC-3-Tumor als erstes von der Metastasierung betroffen waren. Bei Implantation in die Flanke handelte es sich um die lumbalen Lymphknoten der Maus. Die Metasierung der Lymphknoten, in dessen Einzugsbereich der Tumor liegt, die regionären Lymphknoten, ist vielfach beschrieben [9,13]. In dieser Arbeit wurden neben den lumbalen Lymphknotenmetastasen auch metastasierte PC-3-Zellen in den entfernter gelegenen renalen Lymphknoten gefunden. Des Weiteren konnten in einigen PC-3-RFP-Tumor-tragenden Mäusen zu sehr späten Zeitpunkten nach Implantation, ab 90 Tage, auch PC-3-RFP-Zellen in entfernt gelegenen Lymphknoten des Darms (mesenteriale Lymphknoten) und des Mediastinums (mediastinalen Lymphknoten) gefunden werden. Auch konnte eine Metastasierung von regionären Lymphknoten in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-Tumors nachgewiesen werden. Je nachdem wo der Tumor in der Maus lokalisiert war, bildeten sich Metastasen in den nächstgelegenen Lymphknoten. Die Metastasierung von Lymphknoten durch PC-3-Zellen in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen verlief demnach hierarchisch und in Abhängigkeit von der Lokalisation des PC-3-Tumors. Die hierarchische Lymphknotenmetastasierung und die Metastasierung von regionären Lymphknoten ist in vielen Karzinomen zu beobachten, unter anderen bei dem Brustkarzinom, dem Melanom [133] und auch dem Prostatakarzinom [3].

Neben dem Nachweis der PC-3-Zellen in Lymphknoten, konnten diese auch in Lymphgefäßen, welche zwischen lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen verliefen, visualisiert werden. Dies konnte durch eine Färbung von Agaroseschnitten mit LYVE-1, einem Marker für lymphatische Endothelzellen, bestätigt werden. Nach Besiedlung der Lymphknoten durch PC-3-RFP-Zellen kam es im fortgeschrittenen Stadium der Metastasierung zu einer Anreicherung der PC-3-RFP-Zellen in Lymphgefäßen zwischen den besiedelten Lymphknoten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen diese zur Migration von Lymphknoten zu Lymphknoten nutzen. Im Gegensatz dazu konnten mit Hilfe einer CD31-Färbung in Blutgefäßen keine PC-3-Zellen nachgewiesen werden.

Nachdem herausgefunden wurde, dass die Ausbreitung der PC-3-Zellen in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen über das Lymphsystem erfolgt, sollte die Lymphgefäßdichte in PC-3-Tumoren analysiert werden. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Anzahl von Lymphgefäßen in Tumoren oft mit Lymphknotenmetastasierung und damit einer schlechten Prognose für den

Patienten korreliert [5]. Ein positiver Zusammenhang zwischen Lymphgefäßdichte und Lymphknotenmetastasierung konnte vielfach nachgewiesen werden [131,134-138]. Dabei spielt die Erkenntnis, dass Tumore aktiv die Lymphangiogenese induzieren können, eine entscheidende Rolle [46]. Die Tumor-induzierte Lymphangiogenese verursacht eine Erhöhung der Dichte von Lymphgefäßen innerhalb des Tumors und um den Tumor herum. Als Folge dessen wurde vielfach eine erhöhte Metastasierung zu lokalen Lymphknoten beobachtet [22-24]. Tumor-assoziierte Lymphgefäße begünstigen somit die Verbreitung des Tumors in regionalen Lymphknoten, denn durch eine erhöhte Anzahl der Lymphgefäße wird auch die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Tumorzellen in das lymphatische System einwandern und dort eine Bildung von Metastasen verursachen. Dennoch ist zu beachten, dass diese positive Korrelation zwischen Lymphgefäßdichte des Tumors und der Lymphknotenmetastasierung ein kontrovers diskutierter Sachverhalt ist. So gibt es auch eine Vielzahl von Studien in denen kein Zusammenhang gefunden werden konnten [50-52].

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Lymphgefäßen in PC-3-Tumoren und metastasierten Lymphknoten nachgewiesen werden. Hierfür wurden PC-3-Tumore 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach Implantation entnommen, Agaroseschnitte von diesen angefertigt und darauffolgend eine Färbung der Agaroseschnitte mit LYVE-1 durchgeführt. Anschließend wurde durch Auszählen der Lymphgefäße die Lymphgefäßdichte der PC-3-Tumore bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Anzahl der Lymphgefäße von Woche zu Woche nach Implantation zunahm. Erst stieg die Anzahl der Lymphgefäße am Rand der Tumore, die peritumoralen Lymphgefäße, dann ab Tag 21 nach Implantation auch die Anzahl der Lymphgefäße in der Mitte der Tumore, die zentraltumoralen Gefäße. Diese Erhöhung der Lymphgefäßdichte könnte auf eine Tumor-induzierte Lymphangiogenese zurückzuführen sein. Die Lymphknoten der PC-3-Tumor-tragenden Mäuse wurden parallel auf das Vorhandensein von metastasierenden PC-3-Zellen hin untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass analog zur Zunahme der Lymphgefäßdichte auch die Lymphknotenmetastasierung zunahm. Der Anteil der Lymphknoten, die positiv für PC-3-Zellen getestet wurden, stieg mit der Zunahme der Lymphgefäßdichte. Daher lässt sich vermuten, dass PC-3-Zellen in der Lage sind, über Tumor-assoziierte Lymphgefäße den Tumor zu verlassen und in nächstgelegene Lymphknoten zu migrieren. Dennoch konnte in dieser Arbeit der Schritt des Austrittes von migrierenden PC-3-Zellen aus den PC-3-Tumor nicht visualisiert werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Lymphgefäßdichte von Tumor- zu Tumorart variieren könnte. Daher könnten in Zukunft verschiedene Tumormodelle auf deren Lymphgefäßdichte hin analysiert und ein möglicher Zusammenhang zu Lymphknotenmetastasen untersucht werden.

5.3 Zusammenhang zwischen lymphatischer und hämatogener Metastasierung von PC-3-Zellen

Ein Zusammenhang zwischen lymphatischer und hämatogener Metastasierung von Karzinomen wurde mehrfach beschrieben. So konnten neben Lymphknotenmetastasen auch hämatogene Metastasen in entfernt zum Tumor gelegenen Organen wie z.B. den Lungen nachgewiesen werden [31,46,53]. Dieser Zusammenhang ist von enormer Bedeutung, da die Lymphknotenmetastasierung an sich zwar selten lebensbedrohliche Ausmaße annimmt, dennoch einen Indikator für das Stadium darstellt, in dem sich der Tumor befindet und damit über die folgende Behandlung entscheidet [17]. Auch für das Prostatakarzinom konnte eine Verbindung zwischen der lymphatischen und der hämatogenen Metastasierung nachgewiesen werden. So zeigten Bubendorf *et al.* [55], dass in 84 % der Patienten, die positiv auf Lymphknotenmetastasen getestet wurden, auch eine hämatogene Verbreitung von Tumorzellen zu beobachten war. In den 16 % der Patienten, bei denen keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnten, wurden auch keine Hinweise auf eine hämatogene Verbreitung von Tumorzellen gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch im Falle der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 ein Zusammenhang zwischen hämatogener und lymphatischer Metastasierung vorhanden ist. Es war möglich aus dem Blut von PC-3-Tumor-tragenden Mäusen RNA zu isolieren und auf das Vorhandensein von humanem β -Aktin, stellvertretend für PC-3-Zellen, hin zu testen. Dabei zeigte sich, dass in 4 von 6 untersuchten Blutproben (nicht Virus-behandelter Mäuse) PC-3-Zellen vorhanden waren. Weiterhin konnten hämatogene Mikrometastasen in den Lungen PC-3-RFP-Tumor-tragender Mäuse fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass neben der lymphatischen Metastasierung eine hämatogene Verteilung der PC-3-Zellen in der Maus stattfindet.

Da das Lymph- und das Blutssystem über den *ductus thoracicus* miteinander in Verbindung stehen, könnten die PC-3-Zellen nach Besiedlung der lumbalen und renalen Lymphknoten Eintritt in das Blutssystem gefunden haben. Des Weiteren besteht aber auch die Möglichkeit, dass die lymphatische und hämatogene Verbreitung der PC-3-Zellen parallel ablief. PC-3-Zellen könnten sowohl Tumor-assoziierte Lymphgefäße als auch Tumor-assoziierte Blutgefäße unabhängig voneinander für die Migration nutzen.

5.4 Prämetastatischer Zustand von Lymphknoten

Bei der Untersuchung von vergrößerten Lymphknoten im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht in allen vergrößerten Lymphknoten auch metastasierende PC-3-Zellen nachgewiesen werden. So wurden z.B. an Tag 35 nach Implantation von PC-3-Zellen in 4 Mäusen 17 vergrößerte Lymphknoten detektiert. Bei diesen 17 vergrößerten Lymphknoten konnte allerdings nur in 14 Lymphknoten humanes β -Aktin nachgewiesen werden. Dementsprechend waren zu diesem Zeitpunkt 3 Lymphknoten nicht auf Grund einer PC-3-Zellinvasion vergrößert.

Der Grund für die Vergrößerung könnte in diesem Fall der prämetastatische Zustand sein, in dem sich diese Lymphknoten befunden haben könnten. Es wurde beschrieben, dass diese Vergrößerung durch eine Hyperplasie und Proliferation des Endotheliums des Lymph-Sinus verursacht werden kann [27]. Die Veränderungen in den regionären Lymphknoten werden dabei direkt oder indirekt durch die Faktoren ausgelöst, welche durch tumorassoziierte Lymphgefäße zu den Lymphknoten transportiert werden [30]. Durch den Tumor wird dadurch eine prämetastatische Nische gebildet, welche ideale Voraussetzungen für die Besiedlung von Lymphknoten durch Tumorzellen bietet [33].

5.5 Einfluss von GLV-1h68 auf PC-3-Metastasen

Das rekombinante Vaccinia-Virus GLV-1h68 stellt ein vielversprechendes Therapeutikum in der Krebstherapie dar. In vielen präklinischen Studien konnte eine Tumor-regredierende Wirkung von GLV-1h68 nachgewiesen werden [89,112-115,121-123]. Dennoch wurden bis zu diesem Zeitpunkt nur wenige Versuche über den Effekt von GLV-1h68 auf Metastasen veröffentlicht. In 2004 von Yu *et al.* durchgeführten Versuchen konnte in einigen Lymphknoten MCF-7-Tumor tragender Mäuse das GFP-Signal des rekombinanten Vaccinia-Virus rVV-RUC-GFP detektiert werden. Kelly *et al.* zeigten 2008 die Kolonisierung von primären Melanom-Tumoren und regionären Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 [139]. In beiden Arbeiten wurde eine Kolonisierung von Metastasen durch rekombinante Vaccinia-Viren beobachtet, dennoch wurde ein möglicher therapeutischer Effekt der Viren auf die Metastasen nicht untersucht. Aus diesem Grunde sollte festgestellt werden, ob GLV-1h68 neben einer Tumor-regredierenden Wirkung, auch eine inhibierende Wirkung auf Metastasen ausüben kann.

Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass GLV-1h68 in der Lage ist, Lymphknotenmetastasen im PC-3-Modell erfolgreich zu kolonisieren. Die Kolonisierung von PC-3-Zellen war somit nicht auf den PC-3-Tumor beschränkt. Des Weiteren konnte gezeigt

werden, dass auch in Lymphgefäßen migrierende PC-3-RFP-Zellen infiziert werden können. GLV-1h68 kann offensichtlich nahezu alle Tumorzellen in der Maus detektieren und infizieren, unabhängig davon, ob diese sich in einem Tumor- oder Metastasenverband befinden.

Neben der effektiven Kolonisierung von PC-3-Zellen durch GLV-1h68 konnte auch ein enormer Rückgang von Lymphknotenmetastasen durch Behandlung mit GLV-1h68 beobachtet werden. Drei Wochen nach einer intravenösen Injektion von GLV-1h68 kam es zu einer Reduktion der Anzahl und des Volumens von vergrößerten Lymphknoten in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen. Weiterhin konnte zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Rückgang der Lymphknoten verzeichnet werden, die positiv auf metastasierende PC-3-Zellen getestet wurden. In der PBS-behandelten Kontroll-Gruppe wurden insgesamt 49 vergrößerte Lymphknoten gefunden, von denen 45 (91 %) metastasierende PC-3-Zellen enthielten. Durch die GLV-1h68-Behandlung wurde die Anzahl der vergrößerten Lymphknoten in derselben Anzahl an Mäusen auf 28 reduziert. Bei diesen 28 vergrößerten Lymphknoten konnte nur in sechs PC-3-Zellen nachgewiesen werden (21 %). GLV-1h68 verursachte einen drastischen Rückgang der Lymphknotenmetastasen in PC-3-Tumor-tragenden Mäusen.

Darüber hinaus konnte ein inhibierender Effekt auf hämatogene Lungenmetastasen PC-3-Tumor-tragender Mäuse festgestellt werden. Drei Wochen nach Virus-Injektion konnten in keiner einzigen GLV-1h68-behandelten PC-3-Tumor-tragenden Maus Lungenmetastasen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde der Einfluss von GLV-1h68 auf PC-3-Zellen im Blut PC-3-Tumor-tragender Mäuse getestet. Schon sieben Tage nach der Virus-Injektion war auf RNA-Ebene kein humanes β -Aktin mehr nachzuweisen, wohingegen zum selben Zeitpunkt in zwei von drei Blutproben PBS-behandelter PC-3-Tumor-tragender Mäuse humanes β -Aktin detektiert werden konnte. Ebenso war auch 21 Tage nach Virus-Injektion kein humanes β -Aktin in den Blutproben von GLV-1h68-behandelten Mäusen nachzuweisen. GLV-1h68 besitzt somit eine effektive Metastasen-reduzierende Wirkung im PC-3-Modell.

Es stellte sich nun die Frage, ob GLV-1h68 neben der onkolytischen Wirkung auf schon vorhandene Metastasen auch die Bildung neuer Metastasen verhindern kann. Hierbei ist zu beachten, dass in allen Proben in denen keine humanen Zellen detektiert wurden, auch kein GLV-1h68 nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass keine Amplifikation von GLV-1h68 in den Lymphknoten nicht-Tumor-tragender Mäuse stattfindet. GLV-1h68 infiziert anscheinend nur dann Lymphknoten, wenn in diesen metastasierende Tumorzellen vorhanden sind. Auf Grundlage dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass GLV-1h68 die schon in die Lymphknoten migrierten Tumorzellen kolonisiert und eliminiert. Dementsprechend übt GLV-1h68 eine onkolytische Wirkung auf PC-3-Zellen in

Lymphknoten oder -gefäßen aus und verhindert so die folgende Metastasierung in weitere abfließende Lymphknoten.

Des Weiteren könnte GLV-1h68 zusätzlich zu dem onkolytischen Effekt auch einen inhibierenden Effekt auf das Migrationsverhalten der Tumorzellen ausüben. So konnte gezeigt werden, dass 7 Tage nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 keine PC-3-Zellen mehr im Blut detektierbar waren. Zum einen könnte die Reduktion der im Blut zirkulierenden PC-3-Zellen durch direkte Infektion und Eliminierung dieser durch GLV-1h68 verursacht worden sein. Zum anderen könnte es sein, dass durch die GLV-1h68-Infektion die PC-3-Zellen des Tumors und der Lymphknotenmetastasen in so hohem Maße geschädigt wurden, dass ihre Fähigkeit zur Migration erheblich reduziert wurde. Durch GLV-1h68 könnte auch eine Veränderung des Tumormikromilieus ausgelöst worden sein, welche ebenso die Migration von PC-3-Zellen inhibieren könnte.

5.6 Besonderheiten der Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68

Neben der erfolgreichen Reduktion von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 konnten besondere Kolonisierungsmuster nach intravenöser Injektion von GLV-1h68 beobachtet werden. Es kam 3, 7 bzw. 14 Tage nach Virus-Injektion zu einem signifikant erhöhten Titer von GLV-h68 in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum PC-3-Tumor. Es lag dementsprechend eine präferentielle Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Tumor vor. Zu frühen Zeitpunkten nach Virus-Injektion (3 und 7 dpi) konnte zusätzlich in renalen Lymphknotenmetastasen ein höherer GLV-1h68-Titer nachgewiesen werden als in lumbalen Lymphknotenmetastasen. Auch nach intraperitonealer und nach intratumoraler Injektion von GLV-1h68 wurde eine erhöhte Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum PC-3-Tumor beobachtet.

5.6.1 Mögliche Gründe für die präferentielle Amplifikation von GLV-1h68 in Lymphknotenmetastasen

Zur Ermittlung von Gründen für die präferentielle Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 wurden verschiedene Parameter wie der Anteil von nekrotischen Arealen und die Anzahl von Blut- und Lymphgefäßen in PC-3-Tumoren und –Metastasen untersucht.

Bei Analyse der nekrotischen Areale von Tumoren und Metastasen stellte sich heraus, dass in PC-3-Tumoren ein signifikant höherer Anteil an nekrotischem Gewebe vorhanden ist als in

Lymphknotenmetastasen. Da davon ausgegangen wird, dass die Replikation von Vaccinia-Viren nur in lebenden Tumorzellen erfolgen kann, dürfte der niedrigere Anteil an nekrotischen Arealen in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu PC-3-Tumoren dazu beitragen, dass in Lymphknotenmetastasen höhere Titer an GLV-1h68 gebildet werden können.

Eine weitere Vermutung war, dass durch eine höhere Blut- oder Lymphgefäßdichte in den Metastasen die Viruszufuhr erleichtert ablaufen könnte, was wiederum zur präferentiellen Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen beitragen könnte. Bei einer Analyse der Anzahl von Blut- und Lymphgefäßen konnte jedoch kein Unterschied zwischen Tumoren und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden.

Unerwarteterweise konnten jedoch höhere Signalintensitäten der CD31- und der LYVE-1-Färbungen in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Tumor nachgewiesen werden. In anschließenden Western Blot-Analysen konnte eine erhöhte Expression von CD31 in den Lymphknotenmetastasen bestätigt werden. CD31 ist in vielen Prozessen involviert, welche relevant für das Wachstum und die metastatische Verbreitung eines Tumors sind. Dazu gehören unter anderem Angiogenese und vaskuläre Permeabilität [48,49]. Eine erhöhte Expression von CD31 ist Zeichen einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, durch welche GLV-1h68 leichter in Lymphknotenmetastasen gelangen könnte, als in PC-3-Tumoren. Dies könnte zur präferentiellen Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen beitragen.

Die erhöhte LYVE-1-Signalintensität in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum PC-3-Tumor könnte durch eine hohe Proliferationsrate von Lymphgefäßen verursacht worden sein, zu welcher es im Rahmen der Tumor-induzierten Lymphangiogenese kommt [47,48].

5.6.2 Einfluss von GLV-1h68 auf Blut- und Lymphgefäßdichte von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von GLV-1h68 auf die Blut- und Lymphgefäßdichte von PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur sieben Tage nach intravenöser GLV-1h68-Injektion die Dichte von Blut- und von Lymphgefäßen sowohl in den PC-3-Tumoren als auch in Lymphknotenmetastasen signifikant verringert wurde. Zum gleichen Zeitpunkt war auch eine intensive Kolonisierung der Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 zu beobachten.

Tumor-assoziierte Blut- und Lymphgefäße sind entscheidend für das Tumorstadium und die Metastasierung [54,57,58]. Aus diesem Grund stellt sowohl die Inhibierung der Angiogenese [55,56] als auch die der Lymphangiogenese [133,143] einen vielfach

untersuchten Ansatz in der Krebstherapie dar. Beide Therapieansätze werden durch GLV-1h68 in dem PC-3-Modell realisiert, da sowohl die Blut- als auch die Lymphgefäße effektiv reduziert wurden.

Es ist anzunehmen, dass durch Verringerung der Anzahl von Lymphgefäßen durch GLV-1h68 die lymphatische Migration der PC-3-Zellen inhibiert wird. Durch zusätzliche Reduktion der Anzahl der Blutgefäße durch GLV-1h68 wird die Zufuhr von essentiellen Nährstoffen und von Sauerstoff inhibiert und zusätzlich die hämatogene Metastasierung reduziert.

Weiterhin wurde die Intensität der CD31-Färbung in PC-3-Tumoren und Lymphknotenmetastasen 7 Tage nach GLV-1h68-Injektion untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass trotz der durch GLV-1h68 verursachten Abnahme der Blutgefäßdichte die mittlere Fluoreszenzintensität der CD31 positiven Strukturen in Lymphknotenmetastasen der GLV-1h68-Gruppe signifikant erhöht war. Im PC-3-Tumor war jedoch kein Unterschied der Fluoreszenzintensität der CD31-Färbung zwischen der GLV-1h68-behandelten und der PBS-Gruppe zu verzeichnen. Weibel *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass Blutgefäße in Brustkrebstumoren nach GLV-1h68-Injektion den Blutgefäßen in verletztem Gewebe ähneln [147], welche durch Gefäßdilatation, Hyperpermeabilität und einer erhöhten Expression von CD31 charakterisiert sind [148]. Die erhöhte Fluoreszenzintensität der CD31-Färbung in lumbalen und renalen Lymphknotenmetastasen nach GLV-1h68-Behandlung, wurde höchstwahrscheinlich durch die von GLV-1h68 verursachte Entzündungsreaktion hervorgerufen.

GLV-1h68 ist in der Lage, sowohl lymphatische als auch hämatogene Metastasen der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 erfolgreich zu reduzieren. Es bleibt weiteren Versuchen vorbehalten zusätzliche metastasierende Karzinommodelle in der Maus zu finden und zu analysieren, um zu klären, ob die Metastasen-reduzierende Wirkung von GLV-1h68 auch in anderen Modellen erfolgt.

Ebenso ist es wichtig mehr Informationen über die Gründe für die präferentielle Kolonisierung von Lymphknotenmetastasen durch GLV-1h68 zu erlangen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der geringere Anteil an nekrotischen Arealen in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum PC-3-Tumor und die Hochregulation von CD31 in Lymphknotenmetastasen zu der präferentiellen Kolonisierung beitragen könnten. Des Weiteren gilt es künftig zu untersuchen, ob GLV-1h68 Lymphknotenmetastasen auf Grund eines möglicherweise erhöhten Tumorstammzell-Anteils bevorzugt infiziert bzw. ob diese für die konventionelle Tumorthherapie besonders problematischen Zellen überhaupt durch onkolytische Vaccinia Viren behandelt werden können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] A.K. V. Rohde, J. Wasem, "Gesundheitsberichterstattung des Bundes," *Krankenhaus-Hygiene Infektionsverh*, vol. 32, May. 2010, pp. 56-56.
- [2] A. Whittemore, A. Wu, L. Kolonel, E. John, R. Gallagher, G. Howe, D. West, C. Teh, and T. Stamey, "Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada," *American journal of epidemiology*, vol. 141, Apr. 1995, pp. 732-40.
- [3] "Klinisches Krebsregister Kodierhilfe - Stand Januar 2010," *Tumorzentrum Ludwig Heilmeyer*, 2010, pp. 1-8.
- [4] J. Sleeman and W. Thiele, "Tumor metastasis and the lymphatic vasculature," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 125, Dec. 2009, pp. 2747-56.
- [5] J. Sleeman, A. Schmid, and W. Thiele, "Tumor lymphatics," *Seminars in cancer biology*, vol. 19, Oct. 2009, pp. 285-97.
- [6] K. Alitalo and P. Carmeliet, "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease," *Cancer cell*, vol. 1, Apr. 2002, pp. 219-27.
- [7] H. Lippert, "Lehrbuch Anatomie," 2000.
- [8] N. Ulfing, "Kurzlehrbuch Histologie," 2003.
- [9] L. Leak, "The structure of lymphatic capillaries in lymph formation," *Federation proceedings*, vol. 35, Jun. 1976, pp. 1863-71.
- [10] M. Pepper, "Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality?," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 7, Mar. 2001, pp. 462-8.
- [11] M. Karkkainen, T. Mäkinen, and K. Alitalo, "Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research," *Nature cell biology*, vol. 4, Jan. 2002, pp. E2-5.
- [12] M. Baillie, "The Morbid Anatomy in Some of the Most Important Parts of the Human Body," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 24, Jan. 1974, pp. 49-56.

- [13] J. Leake, "Medical instructions towards the prevention and cure of chronic and slow disease peculiar in women," *London*, 1777.
- [14] P. Sugarbaker, "Carcinoma of the colon--prognosis and operative choice," *Current problems in surgery*, vol. 18, Dec. 1981, pp. 753-802.
- [15] T. Cai, G. Nesi, G. Tinacci, G. Giubilei, A. Gavazzi, N. Mondaini, E. Zini, and R. Bartoletti, "Clinical Importance of Lymph Node Density in Predicting Outcome of Prostate Cancer Patients," *The Journal of surgical research*, vol. 6, Jun. 2009, pp. 1-6.
- [16] J. Sleeman, "The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors," *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, vol. 157, Jan. 2000, pp. 55-81.
- [17] S. Leong, B. Cady, D. Jablons, J. Garcia-Aguilar, D. Reintgen, J. Werner, and Y. Kitagawa, "Patterns of metastasis in human solid cancers," *Cancer treatment and research*, vol. 135, Jan. 2007, pp. 209-21.
- [18] K. Datta, M. Muders, H. Zhang, and D. Tindall, "Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer," *Future oncology (London, England)*, vol. 6, May. 2010, pp. 823-36.
- [19] R.K. Jain, "Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 81, Apr. 1989, pp. 570-6.
- [20] M. Arya, R. Patel, C. McGurk, R. Tatoud, H. Klocker, J. Masters, and M. Williamson, "The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis," *Journal of experimental therapeutics & oncology*, vol. 4, Dec. 2004, pp. 291-303.
- [21] A. Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. Wagner, J. Barrera, A. Mohar, E. Verástegui, and A. Zlotnik, "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis," *Nature*, vol. 410, Mar. 2001, pp. 50-6.
- [22] J. Shields, M. Fleury, C. Yong, A. Tomei, G. Randolph, and M. Swartz, "Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling," *Cancer cell*, vol. 11, Jun. 2007, pp. 526-38.
- [23] S. Paget, "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889," *Cancer metastasis reviews*, vol. 8, Aug. 1989, pp. 98-101.
-

- [24] U. Veronesi, "NIH consensus meeting on early breast cancer," *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 26, Jan. 1990, pp. 843-4.
- [25] S. Eccles, L. Paon, and J. Sleeman, "Lymphatic metastasis in breast cancer: importance and new insights into cellular and molecular mechanisms," *Clinical & experimental metastasis*, vol. 24, Jan. 2007, pp. 619-36.
- [26] G. Nicolson, "Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites," *Cancer metastasis reviews*, vol. 7, Jun. 1988, pp. 143-88.
- [27] B.-H. FV, "Lehrbuch der pathologischen Anatomie," 1887, pp. 1887-1887.
- [28] A. Cochran, D. Wen, Z. Farzad, M. Stene, W. McBride, A. Lana, D. Hoon, and D.L. Morton, "Immunosuppression by melanoma cells as a factor in the generation of metastatic disease," *Anticancer research*, vol. 9, 1989, pp. 859-64.
- [29] C. Reiss, F. Volenec, M. Humphrey, O. Singla, and L. Humphrey, "The role of the regional lymph node in breast cancer: a comparison between nodal and systemic reactivity," *Journal of surgical oncology*, vol. 22, Apr. 1983, pp. 249-53.
- [30] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, and K. Arihiro, "Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity," *The lancet oncology*, vol. 7, Dec. 2006, pp. 1006-16.
- [31] S. Hirakawa, L.F. Brown, S. Kodama, K. Paavonen, K. Alitalo, and M. Detmar, "VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites," *Blood*, vol. 109, Feb. 2007, pp. 1010-7.
- [32] M. Harrell, B. Iritani, and A. Ruddell, "Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis," *The American journal of pathology*, vol. 170, Feb. 2007, pp. 774-86.
- [33] A.D.L. Rosandra N. Kaplan, Shahin Rafii, "NIH Public Access," *October*, vol. 66, 2010, pp. 11089-11093.
- [34] J. Sleeman and N. Cremers, "New concepts in breast cancer metastasis: tumor initiating cells and the microenvironment," *Clinical & experimental metastasis*, vol. 24, Jan. 2007, pp. 707-15.

- [35] E. Kukk, A. Lymboussaki, S. Taira, A. Kaipainen, M. Jeltsch, V. Joukov, and K. Alitalo, "VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development," *Development (Cambridge, England)*, vol. 122, Dec. 1996, pp. 3829-37.
- [36] V. Joukov, K. Pajusola, A. Kaipainen, D. Chilov, I. Lahtinen, E. Kukk, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo, "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases," *The EMBO journal*, vol. 15, Apr. 1996, p. 1751.
- [37] M. Achen, M. Jeltsch, E. Kukk, T. Mäkinen, A. Vitali, A. Wilks, K. Alitalo, and S. Stacker, "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, Jan. 1998, pp. 548-53.
- [38] M. Jeltsch, "Hyperplasia of Lymphatic Vessels in VEGF-C Transgenic Mice," *Science*, vol. 276, May. 1997, pp. 1423-1425.
- [39] S. Oh, M. Jeltsch, R. Birkenhäger, J. McCarthy, H. Weich, B. Christ, K. Alitalo, and J. Wiltling, "VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane," *Developmental biology*, vol. 188, Aug. 1997, pp. 96-109.
- [40] T. Veikkola, L. Jussila, T. Makinen, T. Karpanen, M. Jeltsch, T.V. Petrova, H. Kubo, G. Thurston, D.M. McDonald, M.G. Achen, S.A. Stacker, and K. Alitalo, "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice," *The EMBO journal*, vol. 20, Mar. 2001, pp. 1223-31.
- [41] J. Sleeman, J. Krishnan, V. Kirkin, and P. Baumann, "Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail?," *Microscopy research and technique*, vol. 55, Oct. 2001, pp. 61-9.
- [42] S. Breiteneder-Geleff, A. Soleiman, H. Kowalski, R. Horvat, G. Amann, E. Kriehuber, K. Diem, W. Weninger, E. Tschachler, K. Alitalo, and D. Kerjaschki, "Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium," *The American journal of pathology*, vol. 154, Feb. 1999, pp. 385-94.

- [43] S. Banerji, J. Ni, S.X. Wang, S. Clasper, J. Su, R. Tammi, M. Jones, and D.G. Jackson, "LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan," *The Journal of cell biology*, vol. 144, Feb. 1999, pp. 789-801.
- [44] M. Pusztaszeri, W. Seelentag, and F. Bosman, "Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues," *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 54, Apr. 2006, pp. 385-95.
- [45] T. Tammela, T. Petrova, and K. Alitalo, "Molecular lymphangiogenesis: new players," *Trends in cell biology*, vol. 15, Aug. 2005, pp. 434-41.
- [46] L. Kopfstein, T. Veikkola, V. Djonov, V. Baeriswyl, T. Schomber, K. Strittmatter, S. Stacker, M. Achen, K. Alitalo, and G. Christofori, "Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis," *The American journal of pathology*, vol. 170, Apr. 2007, pp. 1348-61.
- [47] M. Achen and S. Stacker, "Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 119, Oct. 2006, pp. 1755-60.
- [48] Y. He, T. Karpanen, and K. Alitalo, "Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1654, Mar. 2004, pp. 3-12.
- [49] S.J. Mandriota, L. Jussila, M. Jeltsch, A. Compagni, D. Baetens, R. Prevo, S. Banerji, J. Huarte, R. Montesano, D.G. Jackson, L. Orci, K. Alitalo, G. Christofori, and M.S. Pepper, "Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis," *The EMBO journal*, vol. 20, Feb. 2001, pp. 672-82.
- [50] L. Cheng, E. Bishop, H. Zhou, G. MacLennan, A. Lopez-Beltran, S. Zhang, S. Badve, L. Baldrige, and R. Montironi, "Lymphatic vessel density in radical prostatectomy specimens," *Human pathology*, vol. 39, Apr. 2008, pp. 610-5.
- [51] A. Roma, C. Magi-Galluzzi, M. Kral, T. Jin, E. Klein, and M. Zhou, "Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma," *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 19, Mar. 2006, pp. 392-8.
- [52] L. Trojan, M. Michel, F. Rensch, D. Jackson, P. Alken, and R. Grobholz, "Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: lack of

- lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1)," *The Journal of urology*, vol. 172, Jul. 2004, pp. 103-7.
- [53] M. Skobe, T. Hawighorst, D.G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey, and M. Detmar, "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis," *Nature medicine*, vol. 7, Feb. 2001, pp. 192-8.
- [54] J. Burton, S. Priceman, J. Sung, E. Brakenhielm, D. Sung, B. Pytowski, K. Alitalo, and L. Wu, "Suppression of Prostate Cancer Nodal and Systemic Metastasis by Blockade of the Lymphangiogenic Axis," *Cancer*, vol. 68, 2009, pp. 7828-7837.
- [55] L. Bubendorf, A. Schöpfer, U. Wagner, G. Sauter, H. Moch, N. Willi, T.C. Gasser, and M.J. Mihatsch, "Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients," *Human pathology*, vol. 31, May. 2000, pp. 578-83.
- [56] M. Cianfracca and L. Goldstein, "Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer," *The Oncologist Breast Cancer*, 2004, pp. 606-616.
- [57] T. Yoshida, T. Matsumoto, A. Sasaki, K. Shibata, M. Aramaki, and S. Kitano, "Outcome of paraaortic node-positive pancreatic head and bile duct adenocarcinoma," *American journal of surgery*, vol. 187, Jun. 2004, pp. 736-40.
- [58] P. Dvoretzky, K. Richards, C. Angel, L. Rabinowitz, M. Stoler, J. Beecham, and T. Bonfiglio, "Distribution of disease at autopsy in 100 women with ovarian cancer," *Human pathology*, vol. 19, Jan. 1988, pp. 57-63.
- [59] M. Clarke, J. Dick, P. Dirks, C. Eaves, C. Jamieson, D. Jones, J. Visvader, I. Weissman, and G. Wahl, "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells," *Cancer research*, vol. 66, Oct. 2006, pp. 9339-44.
- [60] U. Wellner, U. Hopt, and T. Brabletz, "Tumorstammzellen und Metastasierung," *Stem Cells*, 2010, pp. 318-322.
- [61] J. Thiery, H. Acloque, R. Huang, and M. Nieto, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease," *Cell*, vol. 139, Nov. 2009, pp. 871-90.

- [62] M. Zeisberg and E. Neilson, "Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions," *Cell*, vol. 119, 2009, pp. 1429-1437.
- [63] U. Wellner, J. Schubert, U. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, A. Sonntag, B. Waldvogel, C. Vannier, D. Darling, A. zur Hausen, V. Brunton, J. Morton, O. Sansom, J. Schüler, M. Stemmler, C. Herzberger, U. Hopt, T. Keck, S. Brabletz, and T. Brabletz, "The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs," *Nature cell biology*, vol. 11, Dec. 2009, pp. 1487-95.
- [64] A. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux, "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition," *PloS one*, vol. 3, Jan. 2008, p. e2888.
- [65] S. Mani, W. Guo, M. Liao, E. Eaton, A. Ayyanan, A. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. Zhang, M. Shipitsin, L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. Weinberg, "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells," *Cell*, vol. 133, May. 2008, pp. 704-15.
- [66] T. Brabletz, A. Jung, S. Spaderna, F. Hlubek, and T. Kirchner, "Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression," *Nature reviews. Cancer*, vol. 5, Sep. 2005, pp. 744-9.
- [67] J. Thiery, "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression," *Nature reviews. Cancer*, vol. 2, Jun. 2002, pp. 442-54.
- [68] J. Ferlay, P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, and P. Boyle, "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006," *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 18, Mar. 2007, pp. 581-92.
- [69] M. Sporn, "The war on cancer," *The Lancet*, vol. 347, May. 1996, pp. 1377-1381.
- [70] J. Sleeman and P. Steeg, "Cancer metastasis as a therapeutic target," *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 46, May. 2010, pp. 1177-80.
- [71] C. Correa, P. McGale, C. Taylor, Y. Wang, M. Clarke, C. Davies, R. Peto, N. Bijker, L. Solin, and S. Darby, "Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast," *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, vol. 2010, Jan. 2010, pp. 162-77.

- [72] B. Fisher, C. Redmond, and E. Fisher, "The contribution of recent NSABP clinical trials of primary breast cancer therapy to an understanding of tumor biology--an overview of findings," *Cancer*, vol. 46, Aug. 1980, pp. 1009-25.
- [73] Y. Shimono, M. Ugalde, R. Cho, N. Lobo, P. Dalerba, D. Qian, M. Diehn, H. Liu, S. Panula, E. Chiao, F. M, G. Somlo, R. Pera, K. Lao, and M. Clarke, "Down-regulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells," *Cell*, vol. 138, 2009, pp. 423-424.
- [74] J. Sinkovics, "[The effect of oxygenation on the biological behaviour of tumours] [comment]," *Orv Hetil.*, vol. 148, 2007, pp. 2056-2057.
- [75] G. Dock, "Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma," *Amer. J. Med. Sci.*, 1904, p. 127:563.
- [76] G. Dock, "Influence of complicating diseases upon leukemia," *Amer. J. Med. Sci.*, vol. 127, 1904.
- [77] C. Southam, "Present status of oncolytic virus studies," *Transactions of the New York Academy of Sciences*, vol. 22, Jun. 1960, pp. 657-73.
- [78] M. Vähä-Koskela, J. Heikkilä, and A. Hinkkanen, "Oncolytic viruses in cancer therapy," *Cancer letters*, vol. 254, Sep. 2007, pp. 178-216.
- [79] A. Moore, "The destructive effect of the virus of russian far east encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180," *Cancer*, vol. 2, 1949, pp. 525-534.
- [80] H. Hoster, Z.R. Jr, and V.H. E, "Studies in Hodgkin ' s syndrome ; the association of viral hepatitis and Hodgkin ' s disease ; a preliminary report," *Cancer Res.*, vol. 9, 1949, pp. 473-80.
- [81] T.L. Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Smith RR, "Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix," *Cancer.*, vol. 9, 1956, pp. 1211-8.
- [82] Y. Woo, Y; Adusumilli, PS; Fong, "Advances in oncolytic viral therapy," *Cancer*, vol. 7, 2006, pp. 16784026-16784026.
- [83] J. Bischoff, D. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick, "An Adenovirus Mutant That

- Replicates Selectively in p53- Deficient Human Tumor Cells,” *Science*, 1996, pp. 373-376.
- [84] K. Garber, “China approves world ’ s first oncolytic virus therapy for cancer treatment,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 98, 2006, pp. 298-300.
- [85] Y. Shen and J. Nemunaitis, “Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog.,” *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 11, Feb. 2005, pp. 180-95.
- [86] J. Cono, C. Casey, and D. Bell, “Smallpox vaccination and adverse reactions: guidance for clinicians,” *The Annals of pharmacotherapy*, vol. 37, Mar. 2003, pp. 467-8.
- [87] B. Moss, “Poxvirus entry and membrane fusion,” *Virology*, vol. 344, Jan. 2006, pp. 48-54.
- [88] M. Puhlmann, C. Brown, M. Gnant, J. Huang, S. Libutti, H. Alexander, and D. Bartlett, “Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant,” *Cancer gene therapy*, vol. 7, Jan. 2000, pp. 66-73.
- [89] Q. Zhang, Y. Yu, E. Wang, N. Chen, R. Danner, P. Munson, F. Marincola, and A. Szalay, “Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus,” *Cancer research*, vol. 67, Oct. 2007, pp. 10038-46.
- [90] Y. Yu, S. Shabahang, T. Timiryasova, Q. Zhang, R. Beltz, I. Gentshev, W. Goebel, and A. Szalay, “Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins,” *Nature biotechnology*, vol. 22, Mar. 2004, pp. 313-20.
- [91] F. Fenner, D. Henderson, I. Arita, and I. Ladnyi, “Smallpox and its Eradication,” *World Health Organization Geneva*, 1988.
- [92] E. Jenner, “An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the Western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox,” *Classics of Medicine and Surgery*, 1959.
- [93] B. Moss, “Poxviridae : the Viruses and Their Replication,” *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, pp. 2849-2883.
-

- [94] G. Smith, A. Vanderplasschen, and M. Law, "The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus," *The Journal of general virology*, vol. 83, Dec. 2002, pp. 2915-31.
- [95] K. Roberts and G. Smith, "Vaccinia virus morphogenesis and dissemination," *Trends in microbiology*, vol. 16, Oct. 2008, pp. 472-9.
- [96] H. Minnigan and R. Moyer, "Intracellular location of rabbit poxvirus nucleic acid within infected cells as determined by in situ hybridization," *Journal of virology*, vol. 55, Sep. 1985, pp. 634-43.
- [97] J. Hsiao, C. 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," *Journal of virology*, vol. 73, Oct. 1999, pp. 8750-61.
- [98] C. Chung, J. Hsiao, Y. Chang, and W. Chang, "A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate," *Journal of virology*, vol. 72, Feb. 1998, pp. 1577-85.
- [99] C.L. Lin, C. Chung, H. Heine, and W. Chang, "Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo," *Journal of virology*, vol. 74, Apr. 2000, pp. 3353-65.
- [100] A. Townsley, A. Weisberg, T. Wagenaar, and B. Moss, "Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway," *Journal of virology*, vol. 80, Sep. 2006, pp. 8899-908.
- [101] M. Law, G. Carter, K. Roberts, M. Hollinshead, and G. Smith, "Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, Apr. 2006, pp. 5989-94.
- [102] C. Sanderson and G. Smith, "Cell motility and cell morphology: how some viruses take control," *Expert reviews in molecular medicine*, vol. 1999, May. 1999, pp. 1-16.
- [103] N. Tolonen, L. Doglio, S. Schleich, and J. Krijnse Locker, "Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei," *Molecular biology of the cell*, vol. 12, Jul. 2001, pp. 2031-46.

- [104] S.C. Harrison, B. Alberts, E. Ehrenfeld, L. Enquist, H. Fineberg, S.L. McKnight, B. Moss, M. O'Donnell, H. Ploegh, S.L. Schmid, K.P. Walter, and J. Theriot, "Discovery of antivirals against smallpox," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, Aug. 2004, pp. 11178-92.
- [105] M. Schmelz, B. Sodeik, M. Ericsson, E. Wolffe, H. Shida, G. Hiller, and G. Griffiths, "Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network," *Journal of virology*, vol. 68, Jan. 1994, pp. 130-47.
- [106] G. Hiller and K. Weber, "Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment," *Journal of virology*, vol. 55, Sep. 1985, pp. 651-9.
- [107] J. Tooze, M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak, and H. Kern, "Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes," *European journal of cell biology*, vol. 60, Feb. 1993, pp. 163-78.
- [108] B. Moss and B. Ward, "High-speed mass transit for poxviruses on microtubules," *Nature cell biology*, vol. 3, Nov. 2001, pp. E245-6.
- [109] L. Payne, "Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus," *Journal of virology*, vol. 31, Jul. 1979, pp. 147-55.
- [110] A. Vanderplasschen, E. Mathew, M. Hollinshead, R. Sim, and G. Smith, "Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, Jun. 1998, pp. 7544-9.
- [111] S.-F. Lin, D.L. Price, C.-H. Chen, P. Brader, S. Li, L. Gonzalez, Q. Zhang, Y. a Yu, N. Chen, A. a Szalay, Y. Fong, and R.J. Wong, "Oncolytic vaccinia virotherapy of anaplastic thyroid cancer in vivo.," *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 93, Nov. 2008, pp. 4403-7.
- [112] S. Lin, Z. Yu, C. Riedl, Y. Woo, Q. Zhang, Y. Yu, T. Timiryasova, N. Chen, J. Shah, A. Szalay, Y. Fong, and R. Wong, "Treatment of anaplastic thyroid carcinoma in vitro with a mutant vaccinia virus," *Surgery*, vol. 142, Dec. 2007, pp. 976-83; discussion 976-83.

- [113] K. Kelly, Y. Woo, P. Brader, Z. Yu, C. Riedl, S. Lin, N. Chen, Y. Yu, V. Rusch, A. Szalay, and Y. Fong, "Novel oncolytic agent GLV-1h68 is effective against malignant pleural mesothelioma.," *Human gene therapy*, vol. 19, Aug. 2008, pp. 774-82.
- [114] Y. Yu, C. Galanis, Y. Woo, N. Chen, Q. Zhang, Y. Fong, and A. Szalay, "Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 8, Jan. 2009, pp. 141-51.
- [115] I. Gentshev, J. Stritzker, E. Hofmann, S. Weibel, Y. Yu, N. Chen, Q. Zhang, J. Bullerdiek, I. Nolte, and A. Szalay, "Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent," *Cancer gene therapy*, vol. 16, Apr. 2009, pp. 320-8.
- [116] M. Hengstschläger, M. Knöfler, E. Müllner, E. Ogris, E. Wintersberger, and E. Wawra, "Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, May. 1994, pp. 13836-42.
- [117] R. Buller, G. Smith, K. Cremer, A. Notkins, and B. Moss, "Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype," *Nature*, vol. 317, 1985, pp. 813-5.
- [118] Q. Zhang, C. Liang, Y. Yu, N. Chen, T. Dandekar, and A. Szalay, "The highly attenuated oncolytic recombinant vaccinia virus GLV-1h68: comparative genomic features and the contribution of F14.5L inactivation," *Molecular genetics and genomics : MGG*, vol. 282, Oct. 2009, pp. 417-35.
- [119] R. Izmailyan and W. Chang, "Vaccinia virus WR53.5/F14.5 protein is a new component of intracellular mature virus and is important for calcium-independent cell adhesion and vaccinia virus virulence in mice," *Journal of virology*, vol. 82, Oct. 2008, pp. 10079-87.
- [120] H. Shida, Y. Hinuma, M. Hatanaka, M. Morita, M. Kidokoro, K. Suzuki, T. Maruyama, F. Takahashi-Nishimaki, M. Sugimoto, and R. Kitamura, "Effects and virulences of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene.," *Journal of virology*, vol. 62, Dec. 1988, pp. 4474-80.

- [121] A. Frentzen, Y. Yu, N. Chen, Q. Zhang, S. Weibel, V. Raab, and A. Szalay, "Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, Aug. 2009, pp. 12915-20.
- [122] Y. Yu, S. Li, P. Brader, N. Chen, Y. Yu, Q. Zhang, A. Szalay, Y. Fong, and R. Wong, "Oncolytic vaccinia therapy of squamous cell carcinoma," *Molecular cancer*, vol. 8, Jan. 2009, p. 45.
- [123] I. Gentshev, U. Donat, E. Hofmann, S. Weibel, M. Adelfinger, V. Raab, M. Heisig, N. Chen, Y. Yu, J. Stritzker, and A. Szalay, "Regression of human prostate tumors and metastases in nude mice following treatment with the recombinant oncolytic vaccinia virus GLV-1h68," *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2010, Jan. 2010, p. 489759.
- [124] D. Trono, "Lentiviral vectors : turning a deadly foe into a therapeutic agent," *Nature Biotechnology*, 2000, pp. 20-23.
- [125] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986," *Biotechnology (Reading, Mass.)*, vol. 24, Jan. 1992, pp. 17-27.
- [126] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979," *Biotechnology (Reading, Mass.)*, vol. 24, Jan. 1992, pp. 145-9.
- [127] [Http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/cmb/InfectiousDiseasePathogenesisSection/mouseNecropsy/Pages/step3LymphNodesMammary.aspx](http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/cmb/InfectiousDiseasePathogenesisSection/mouseNecropsy/Pages/step3LymphNodesMammary.aspx), ".."
- [128] K. Pantel, C. Alix-Panabières, and S. Riethdorf, "Cancer micrometastases," *Nature reviews. Clinical oncology*, vol. 6, Jun. 2009, pp. 339-51.
- [129] C. Coghlin and G. Murray, "Current and emerging concepts in tumour metastasis," *The Journal of pathology*, vol. 222, Sep. 2010, pp. 1-15.
- [130] B. Cady, "Lymph node metastases. Indicators, but not governors of survival," *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, vol. 119, Sep. 1984, pp. 1067-72.

- [131] Y. Zeng, K. Opeskin, L. Horvath, R. Sutherland, and E. Williams, "Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer," *The Prostate*, vol. 65, Nov. 2005, pp. 222-30.
- [132] M. Yang, P. Jiang, F. Sun, S. Hasegawa, E. Baranov, T. Chishima, H. Shimada, A. Mossa, and R. Hoffman, "A Fluorescent Orthotopic Bone Metastasis Model of Human Prostate Cancer Advances in Brief," *Cancer Research*, 1999, pp. 781-786.
- [133] D.M. Mumprecht V, "Lymphangiogenesis and cancer metastasis," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 112, Aug. 2009, pp. 175-1416.
- [134] T. Tsurusaki, S. Kanda, H. Sakai, H. Kanetake, Y. Saito, K. Alitalo, and T. Koji, "Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis," *British journal of cancer*, vol. 80, Apr. 1999, pp. 309-13.
- [135] Y. Zeng, K. Opeskin, M. Baldwin, L. Horvath, M. Achen, S. Stacker, R. Sutherland, and E. Williams, "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 10, Aug. 2004, pp. 5137-44.
- [136] R. Li, M. Younes, T. Wheeler, P. Scardino, M. Ohori, A. Frolov, and G. Ayala, "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate," *The Prostate*, vol. 58, Feb. 2004, pp. 193-9.
- [137] K. Kuroda, A. Horiguchi, T. Asano, T. Asano, and M. Hayakawa, "Prediction of lymphatic invasion by peritumoral lymphatic vessel density in prostate biopsy cores," *The Prostate*, vol. 68, Jul. 2008, pp. 1057-63.
- [138] K. Jennbacken, C. Vallbo, W. Wang, and J. Damber, "Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis," *The Prostate*, vol. 65, Oct. 2005, pp. 110-6.
- [139] K. Kelly, P. Brader, Y. Woo, S. Li, N. Chen, Y. Yu, A. Szalay, and Y. Fong, "Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 in an immunocompetent animal model," *International journal of cancer*, vol. 124, 2009, pp. 911-918.

- [140] A. Muller, "The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo," *Physiology*, vol. 57, 1995, pp. 523-528.
- [141] P. Newman and D. Newman, "Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 23, Jun. 2003, pp. 953-64.
- [142] P. Lantos, "Histology and Histopathology of the Aging Brain," *Journal of Neurology, Neurosurgery*, vol. 25, Mar. 1989, pp. 428-428.
- [143] K. Nagahashi, M; Ramachandran, S; Rashid, OM; Takabe, "Lymphangiogenesis: A new player in cancer progression," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 16, 2010, p. 4003.
- [144] M. Arya, S. Bott, I. Shergill, H. Ahmed, M. Williamson, and H. Patel, "The metastatic cascade in prostate cancer," *Surgical oncology*, vol. 15, Nov. 2006, pp. 117-28.
- [145] X.C. Anand Veeravagu, Andrew R. Hsu, Weibo Cai, Lewis C. Hou, Victor C.K. Tse, "Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitors as Anti-Angiogenic Agents in Cancer Therapy," *Nature medicine*, vol. 12, Jul. 2006, pp. 59-71.
- [146] M.M. Harper J, "Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications," *EXS*, vol. 96, Jan. 2006, pp. 223-68.
- [147] S. Weibel, V. Raab, Y. Yu, A. Worschech, E. Wang, F. Marincola, and A. Szalay, "Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection," *submitted*.
- [148] D. Vestweber, "Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium," *Immunological reviews*, vol. 218, Aug. 2007, pp. 178-96.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
β	beta
μ	mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CMC	Caboxymethylcellulose
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
d	Tag/Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post infection</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence system</i>
EDTA	Ethyl diamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virus</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und Andere
FKS	Fötales Kälberserum
fwd.	<i>forward</i>
g	Gramm

Anhang

GAGs	Glycosaminoglykane
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gusA	β -Glucuronidase
h	Stunde/Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IEV	<i>intracellular enveloped virus</i>
IMV	<i>intracellular mature virus</i>
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenös
Jhd.	Jahrhundert
kb	Kilobasen
l	Liter
lacZ	β -Galaktosidase
LN	lumbale noduli
M	molare Masse
m	milli
Mg	Magnesium
min	Minute
Mio.	Millionen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MV	<i>mature virus</i>
n	Nano
P	Phosphat
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>

Anhang

rev	<i>revers</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RN	renale noduli
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RUC	Renilla-Luciferase
rVACV	rekombinantes Vaccinia-Virus
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
T	Tumor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBT	Tris-Borat-Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Thymin-Kinase
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen und allen danken, die an der Entstehung dieser Doktorarbeit beteiligt waren bzw. diese überhaupt erst ermöglicht haben.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. A. A. Szalay für die Vergabe des spannenden Themas, für die vielen Möglichkeiten die mir durch ihn und durch die Firma Genelux geboten wurden, für das Vertrauen welches er mir von Anfang an entgegengebracht hat, den kreativen Freiraum in der Forschung, die konstruktive Kritik und die fortwährende hilfreiche Unterstützung bedanken.

Ich möchte Prof. Dr. F. Grummt für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Unterstützung und die konstruktive Kritik beim Erstellen dieser Arbeit danken.

Auch gilt mein Dank Prof. Dr. G. Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. U. Fischer und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie, besonders dabei Frau Kießling für die organisatorische Unterstützung und Hilfe.

Weiterhin danke ich der Nuklearmedizin und der Experimentellen Physik der Universität Würzburg für die erfolgreiche Kooperation.

Ich danke ebenso Tony, Qian, Nanhai, Terry, Camha, Kim, Jason, Alexa, Rohit und allen weiteren Mitgliedern der Firma Genelux für die hilfsbereite Unterstützung der letzten drei Jahre.

Ein großer Dank geht auch an all meine Arbeitskollegen und Arbeitskolleginnen, für die tolle Arbeitsatmosphäre, Hilfe und Unterstützung.

Hierbei möchte ich besonders Jochen danken, der mir mit seinem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit gab und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke Ivo für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und die erfolgreiche Zusammenarbeit, Elisabeth für die Einarbeitung in viele neue Methoden, Barbara für die tatkräftige Unterstützung und ihre uneingeschränkte Hilfe, Dana für die großartigen ersten Monate in Würzburg, Johanna für die Organisation des gesamten Forschungsalltags, ihr unvergleichliches Engagement zur Realisierung einer Idee beizutragen und für die zahlreichen Stunden, in denen ich ihre Hilfe in Anspruch genommen habe, Simon, Micha, und Caro dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für jedes Problem hatten, Stefi für die umfassende Einarbeitung in die konfokale Mikroskopie und die anschließende Auswertung aller Daten, Rafi für die sorgsame Tierpflege, Meike und Juliane für das Übernehmen der

Autoklavierarbeiten (ihr wisst nicht, was für einen Gefallen ihr der Arbeitsgruppe damit gemacht hab) und Ricky für eine wunderbare Zeit in San Diego.

Julie und Johanna danke zusätzlich auch für eine Unterstützung, die weit über die Arbeit hinausging und die ich sehr zu schätzen weiß.

Meinen Freunden aus der Zeit in Greifswald danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind. Selbstverständlich danke ich auch meiner Familie und meinem Mann für die unersetzbare Unterstützung während des gesamten Studiums und vor allem in den letzten drei Jahren.

7.3 Eidesstaatliche Erklärung

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

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

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

Würzburg, den _____

(Ulrike Donat)

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulrike Donat
Geburtsdatum	08.07.1982
Geburtsort	Rostock
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1989-1993	Grundschule Evershagen Süd, Rostock
1993-2002	Ostseegymnasium Rostock
2002	Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

2002-2006	Studium der Humanbiologie, Universität Greifswald
2006	Diplomprüfungen in den Fächern Pharmakologie, Biochemie des Menschen und Humangenetik
2006-2007	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Kardiologie: <i>Aufklärung wichtiger Elemente der kardioprotektiven Wirkung von Vardenafil am Zellmodell</i>
2007	Abschluss als Diplom-Humanbiologin Univ.
2008-2011	Promotionsstudium an der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg unter Betreuung von Prof. A. A. Szalay Dissertation: <i>Detektion und Therapie von Metastasen des humanen Prostatakarzinoms durch das onkolytische Vaccinia-Virus GLV-1h68</i>

9 Publikationen

9.1 Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen

Gentschev I, Donat U, Hofmann E, Weibel S, Adelfinger M, Raab V, Heisig M, Chen N, Yu YA, Stritzker J, Szalay AA.

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

J Biomed Biotechnol. 2010;2010:489759. Epub 2010 Apr 1.PMID: 20379368

Gentschev I, Ehrig K, Donat U, Hess M, Rudolph S, Chen N, Yu YA, Zhang Q, Bullerdiek J, Nolte I, Stritzker J, Szalay AA.

Significant Growth Inhibition of Canine Mammary Carcinoma Xenografts following Treatment with Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68.

J Oncol. 2010;2010:736907. Epub 2010 Jun 23.PMID: 20631910

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

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

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

9.2 Weitere Publikationen

Methner C, Donat U, Felix SB, Krieg T.

Cardioprotection of bradykinin at reperfusion involves transactivation of the epidermal growth factor receptor via matrix metalloproteinase-8.

Acta Physiol (Oxf). 2009 Dec;197(4):265-71. Epub 2009 Jul 6.PMID: 19583703

Maas O, Donat U, Frenzel M, Rütz T, Kroemer HK, Felix SB, Krieg T.

Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG.

Br J Pharmacol. 2008 May;154(1):25-31. Epub 2008 Mar 10.PMID: 18332860