Aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie (Direktor Prof. Dr. U. Schumacher) Zentrum für experimentelle Medizin Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf

Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Expression des Coxsackie Adenovirus Rezeptors in verschiedenen Tumorentitäten und seine Heraufregulierung im Hinblick auf eine onkolytische Therapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tina Wunder

aus Hamburg

Hamburg, 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.07.2011 Disputation am: 14.03.2012

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Laack Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. S. Klutmann

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromol
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACO	Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin
Ad-GFP	Adenovirus mit dem grün fluoreszierenden Protein
Anti-CxADR	Antikörper gegen Coxsackie Adenovirus Rezeptor
AP	Alkalische Phosphatase
APUD	Amin Precursor Uptake and Decarboxylation
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ca-5061	Pankreaskarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Primärtumor eines Adenokarzinoms Grad 3 des Pankreas,
Ca-5072	Pankreaskarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Primärtumor eines Adenokarzinoms des Pankreas
Ca-5156	Pankreaskarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Primärtumor eines Adenokarzinoms des Pankreas
CaCo	Kolonkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem primären Kolonkarzinom, zeigt Charakteristika einer Differenzierung eines Enterozyten
CAM	Zelladhäsionsmolekül (Cell adhesion molecule)
CAR	Coxsackie Adenovirus Rezeptor
Cat	Katalog (Catalog)

CK-BB	Keratinkinase des Gehirns (Creatinkinase-Brain type)	
Cm	Zentimeter	
Corp.	Corporation	
DAB	3'3-Diaminobenzidin	
DCM	Dilative Kardiomyopathie (Dilative Cardiomyopathy)	
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium	
DMF	Dimethylformamid	
DNA	Desoxyribonucleinsäure (Deoxyribonucleic acid)	
DU145	Prostatakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer Gehirnmetastase eines Primärkarzinoms der Prostata	
DU4475	Mammakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer kutanen Metastase des Primärtumors der Mamma, schlecht differenziert	
E1A/E1B	Frühe region 1A/1B (Early region 1A/1B)	
ED	Extensive disease	
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition	
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)	
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)	
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	
Н	Stunde (hour)	
Н69	Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Pleuraerguss, klassischer Phänotyp	
H82	Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Pleuraerguss, abweichender Phänotyp	
HE	Hämatoxylin Eosin	

HSV	Herpes Simplex Virus	
НТ29	Kolonkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Adenokarzinom des Kolons	
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer	
Ig	Immunoglobulin	
IgG	Immunoglobulin G	
iHDAC	Histondeacetylase-Inhibitor	
IMR32	Neuroblastom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Erttmann, Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
iv.	Intravenös	
kD	Kilodalton	
Kelly	Neuroblastom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Erttmann, Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
LAN1	Neuroblastom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Erttmann, Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
LD	Limited disease	
LNCAP	Prostatakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer linksseitigen supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms	
М	Mol	
MCF7	Mammakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem malignen Pleuraerguss eines primär infiltrierenden duktalen Karzinoms	
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition	

Mg	Milligramm
Min	Minute
Ml	Milliliter
mM	Millimol
Moi	Multiplizität der Infektion (Multiplicity of infection)
MZ10	Ovarialkarzinom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Dr. G. Brunner, Fachklinik Hornheide für Tumoren und Wiederherstellung an Gesicht und Haut an der Universität Münster, Deutschland
Ν	Mol
No.	Nummer
nM	Nanomol
NPC	Nasopharyngeales Karzinom (Nasopharyngeal Carcinoma)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Non small cell lung cancer)
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OC2	Ovarialkarzinom-Zellllinie, zur Verfügung gestellt von Dr. D. Thormeyer, Fachklinik Hornheide für Tumoren und Wiederherstellung an Gesicht und Haut an der Universität Münster, Deutschland
OH1	Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Pleuraerguss, klassischer Phänotyp
OH3	Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Pleuraerguss, klassischer Phänotyp
OVCAR3	Ovarialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer malignen Aszites eines Patienten mit einem progressiven Adenokarzinoms des Ovars
PBS	Phosphate buffered saline
PC3	Prostatakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer Knochenmetastase eines Grade 4 Adenokarzinoms

	der Prostata
PE	Cisplatin, Etoposid
pH	Potentia hydrogenii
POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Kulturmedium
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real time- Polymerase chain reaction)
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure (Suberoylanilide hydroxamic acid)
SCCHN	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals Bereich (Squamous cell carcinoma of the head and neck)
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (Small cell lung cancer)
SFDA	State Food and Drug Administration
SKNSH	Neuroblastom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Erttmann, Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SW2	Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einer Knochenmetastase, abweichender Phänotyp
SW480	Kolonkarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Grade 3-4 Adenokarzinom des Kolons
T47D	Mammakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem Pleuraerguss eines infiltrierenden duktalen Karzinoms
TBS	Tris buffered saline
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor-Nodes-Metastasis

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union Internationle Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
VALG	Verteran's Administration Lung Cancer Group
VLD	Very limited disease
VPA	Valproat Säure
W	Watt
WHO	World Health Organization
Z.i.A.	Zellen in Agar

Inhaltsverzeichnis

I.	Fragestellung und Arbeitshypothese
II.	Einleitung
2.1.	Krebs und seine Prognose bei Metastasierung2
2.2	Adenoviren4
2.3	Onkolytische Therapie5
2.4	Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR)
2.5	Das Bronchialkarzinom
2.5.1	Das kleinzellige Bronchialkarzinom10
2.6	Das Neuroblastom
2.7	Das Mamma- und Ovarialkarzinom12
2.8	Nasopharynxkarzinome13
III.	Material und Methoden15
3.1	Fixierung15
3.2	Paraffineinbettung und Herstellung der Schnitte15
3.3	Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR Antikörper mit alkalischer Phosphatase Enzymreaktion15
3.4	Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR Antikörper mit Glukoseoxidase Enzymreaktion
3.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung19
3.6	Mikroskopische Auswertung
3.7	Zellkulturversuch mit Ad-GFP19
3.7.1.	Kultivierung der Zelllinien20
3.7.2	Virustiterbestimmung
3.7.3	Infektion der Zelllinien
3.7.4	FACS-Analyse
3.8	Zellkulturversuche mit Trichostatin A (TSA)
3.8.1	Kultivierung der Zelllinien
3.8.2	Vorbehandlung mit TSA
3.8.3	FACS Färbung
3.8.4	Überprüfung der Zellvitalität nach 24 Stunden23
IV.	Ergebnisse
4.1.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Anti-CxADR24
4.1.1.	Färbung der kleinzelligen Bronchialkarzinome24
4.1.2.	Färbung der Neuroblastome

4.1.3.	Färbung der Ovarialkarzinome
4.1.6.	Färbung der Mammakarzinome32
4.1.6.	Färbung der Pankreaskarzinome
4.1.6.	Färbung der Kolonkarzinome
4.1.7.	Färbung der Prostatakarzinome36
4.1.8.	Färbung der klinischen Fälle37
4.2.	Ergebnisse der Infektion der kleinzelligen Bronchialkarzinom Zelllinien mit dem Virus Ad-GFP41
4.3.	Ergebnisse der FACS-Färbung der mit TSA vorbehandelten humanen Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome45
4.3.1.	Ergebnisse der Zellzahl und –vitalität nach 24 Stunden mit TSA-Behandlung47
V.	Diskussion
VI.	Zusammenfassung
VII.	Literaturverzeichnis
VIII.	Appendix73
IX.	Danksagung
XI.	Erklärung

I. Fragestellung und Arbeitshypothese

Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR) ist als Transmembranprotein ein integraler Bestandteil von epithelialen tight junction Zellkontakten, an den sich Adenoviren binden können. Sowohl bei onkolytischen Adenoviren, als auch bei Adenoviren als Carrier in der Gentherapie hängt der Virusbefall der Zellen primär von der CAR Expression an der Zelloberfläche ab. Die CAR Expression ist in den unterschiedlichen Tumoren variabel und häufig herunter reguliert.

In dieser Arbeit soll die CAR Expression analysiert werden, um für Therapien geeignete Tumoren zu identifizieren. Es wurde die These aufgestellt, dass in dem Tumorgewebe der kleinzelligen Bronchialkarzinome eine CAR Expression gefunden wird, da das Ursprungsgewebe der Tumoren aus der Lunge stammt und damit für eine Expression des Rezeptors prädestiniert sein dürfte. Dieser Tumor ist besonders für experimentelle Therapien interessant, da er kaum geheilt werden kann. Deshalb ist ein Xenograftmodell dieses Tumors erschaffen worden, an dem neue Therapien entwickelt werden können.

Folgende Fragen sollen an diesem Xenograftmodell untersucht werden:

- 1. Lässt sich CAR immunhistochemisch in Krebszellen verschiedener Tumorgewebe nachweisen?
- 2. Wie hoch ist die Expression in den Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms?
- 3. Gibt es einen Unterschied der CAR Expression zwischen in vitro Zellen aus der Zellkultur und den in vivo Zellen aus Xenografttumoren in Mäusen?
- 4. Wie verhält sich die CAR Expression in Metastasen?
- 5. Ist eine Infektion mit einem Adenovirus möglich und korreliert die Infektionsrate mit der Höhe der CAR Expression beim kleinzelligen Bronchialkarzinom?
- 6. Korrelieren die CAR Expressionshöhen der unterschiedlichen Nachweismethoden in der Immunhistochemie und dem FACS-Färbung miteinander?
- 7. Lässt sich die Expression von CAR durch Histondeacetylase-Inhibitoren hochregulieren und damit die Aussicht auf eine höhere Infektionsrate verbessern?
- 8. Wie verhält sich die CAR Expression bei klinischen Fällen?

II. Einleitung

2.1. Krebs und seine Prognose bei Metastasierung

Neoplasien haben eine hohe Inzidenz in der Bevölkerung. Die Entscheidung, ob es sich um eine bösartige Krebserkrankung handelt, wird dabei nach verschiedenen Malignitätskriterien getroffen. Während benigne Tumore langsam und verdrängend wachsen, gut differenziert und abgrenzbar sind, sind maligne Tumore durch ein schnelles invasives Wachstum, eine Anaplasie der Tumorzellen und der Zellkerne, sowie die Metastasierung gekennzeichnet. Um das voraussichtliche Verhalten des Tumors und die Prognose für den Patienten beurteilen zu können wird die von Pierre Denoix (1950) entwickelte TNM-Klassifikation (Tumor-Nodes-Metastasis) angewandt, die auch von der WHO (World Heath Organisation) verwendet wird (siehe Tabelle 1). Zusätzlich zu dieser Klassifikation existiert für jede Tumorart noch eine Krankheitsstadieneinteilung von I bis IV von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 1997). Die Stadien werden über die TNM-Klassifikation definiert.

Tabelle 1: TNM Klassifikation	n
-------------------------------	---

Т	Primärtumor	
T0	Keine Anzeichen eines Primärtumors	
T1	Größte Tumorausdehnung höchstens 2 cm	
T2	Größte Tumorausdehnung > 2 cm, aber < 5 cm	
T3	Größte Tumorausdehnung > 5 cm	
T4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut	
N	Regionäre Lymnhknoten	
1 4	Regionare Lympiknoten	
NO	Keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall	
N0 N1-3	Keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall Zunehmender Lymphknotenbefall abhängig von der Lokalisation des Primärtumors	
N0 N1-3 M	Keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall Zunehmender Lymphknotenbefall abhängig von der Lokalisation des Primärtumors Fernmetastasen	
N0 N1-3 M M0	Keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall Zunehmender Lymphknotenbefall abhängig von der Lokalisation des Primärtumors Fernmetastasen Keine Anzeichen für Fernmetastasen	

Einheitlich für alle Tumore ist das fortgeschrittene Stadium IV, das T1-4, N1-3 und M1 umfasst. Zwar kommt es bei jeder Beurteilung der Prognose eines Krebspatienten auf das befallene Gewebe, die Größe des Tumors und Faktoren, wie den Allgemeinzustand, das Alter, das Geschlecht des Patienten, sowie viele weitere Einflüsse an. Doch sind die Invasion und Metastasierung bei allen Tumoren die Gesichtspunkte, die am lebensbedrohlichsten sind (Liotta et al., 1991). Der Metastasierungsprozess wurde von Fidler und Poste (1982) als eine Kaskade beschrieben, die, beginnend mit dem unkontrollierten Tumorwachstum, der Einsprossung und Invasion in das Lymph- und Gefäßsystem, über die Zirkulation der Tumorzellen im Blutkreislauf hin zum Zielorgan, bis zur Invasion in das Bindegewebe und die dortige Bildung der Metastasen reicht. Man unterscheidet die lymphogene und die hämatogene Metastasierung, denen beiden das invasive Wachstum des Primärtumors und damit das Durchbrechen der Basalmembran voran stehen. Sowohl die Zell-Zell, als auch die Zell-Stroma Interaktionen sind von besonderer Bedeutung bei der metastatischen Kaskade.

Auch wenn noch nicht alle Faktoren identifiziert werden konnten, welche die Zell-Zell Interaktionen steuern, konnten die Cadherine und Integrine als wichtige Membranproteine in der Zell-Zell Interaktion identifiziert werden. Der Verlust von E-Cadherin führt zum Verlust der Zell-Zell Kontakte und erhöht die Beweglichkeit und damit das Metastasierungspotential während der Tumorprogression (Hoffmann et al., 1993). Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor CAR (Coxsackie Adenovirus Rezeptor) weist Parallelen zu dem Verhalten von E-Cadherin auf und ist außerdem mit Integrinen assoziiert, die ebenfalls bei der Abfolge von Adhäsionen und De-Adhäsionen während der Tumorinvasion eine Rolle spielen (Marshall und Hart, 1996). Ob CAR eine ebenso bedeutsame Rolle beim Metastasierungsprozess zu geschrieben werden kann, ist Gegenstand der heutigen Forschungen. Wie klinisch wichtig die Metastasierung für den betroffenen Patienten ist, zeigt sich in der Statistik über die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium IV. Diese liegen bei Kopf-Halstumoren zwischen 10 % und 30 % (Wittekind et al., 2003), sie ähneln den Zahlen des kolorektalen Karzinoms mit etwa 30 % (Choti et al., 2002). Noch eindringlicher vermitteln das Mammakarzinom mit nur 5 % - 10 % Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren bzw. einem Langzeitübereben von nur 2 % bis 5 % (Gennari et al., 2005) und vor allem das kleinzellige Bronchialkarzinom mit nur 1 % (Mountain, 1997) hat eine schlechte Prognose, wenn Fernmetastasen vorliegen. Auch die maximale Ausdehnung von Metastasen in der Bauchhöhle, die Peritonealkarzinose, die durch Kolon-, Pankreas-, Ovar-, Mamma- und Prostatakarzinome verursacht werden kann, zeigt mit einer durchschnittlichen Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 6 Monaten (Sadeghi et al., 2000), wie sehr die Heilungschancen verringert werden können, wenn eine Metastasierung vorliegt. Die konventionellen Behandlungsverfahren wie die Radio- und Chemotherapie führen in diesem Stadium leider selten zu einer Verlängerung der Lebenserwartung. Deshalb ist es von großer Bedeutung neu Therapiemöglichkeiten zu eröffnen, die eine verbesserte

Wirksamkeit und Selektivität gegenüber dem entarteten Gewebe aufweisen. Onkolytische Viren könnten diese Anforderungen erfüllen und stehen daher unter dem Hauptaugenmerk vieler aktueller Studien (Pesonen et al., 2011, Nguyen et al., 2010, Wong et al., 2010)

2.2 Adenoviren

Adenoviren werden den Papillomaviren zugeordnet und werden in 4 Gattungen unterteilt. Die Mastadenoviren, zu denen auch der humane Typus gehört, wird von den Siadenoviren, Aviadenoviren und Adadenoviren unterschieden. Es handelt sich um DNA-Viren, deren Genom aus einer linearen doppelsträngigen DNA besteht. Trotz des breiten Wirkspektrums befallen sie hautsächlich das Epithel der Atemwege und verursachen damit 5 - 15 % aller Erkältungskrankheiten. Für die Bindung und Internalisierung des Virus ist der Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR) von großer Bedeutung (Bergelson et al., 1997). Das Viruspartikel gelangt über clathrinbedeckte Einstülpungen der Zellmembran in die Zelle. Dieser Vesikel wird von der Zelle in ein Endosom überführt, wodurch das Virus-Core in das Zytoplasma freigesetzt werden kann. Gelangen die Adenoviren erst einmal in den Kern, vermehren sich mit einer hohen Effizienz, so dass nach einem Lebenszyklus von 24 - 36 h 10³-10⁴ Zellen pro infiziertem Wirt lytisch freigesetzt werden. Obwohl die Idee, Krebs mit Viren zu bekämpfen schon vor mehr als 100 Jahren entstand (Dock, 1904), stellte der unspezifische Befall von gesundem Gewebe ein großes Problem dar. Erst als mehr über den viralen Stoffwechsel bekannt wurde, konnten Möglichkeiten gefunden werden, das Virus mit erhöhter Tumorspezifität zu programmieren. Neben dem onkolytischen Therapieansatz wird das Adenovirus auch für die Gentherapie in Betracht gezogen. Durch die Einschleusung von Genen mittels Vektoren, die die Immunogenität des Tumors erhöhen oder die Reexpression verlorener Gene der Zell-Zyklus-Kontrolle verursachen, kann so die Malignität gesenkt werden. Allerdings waren die Resultate der adenoviral-vermittelten Krebstherapie enttäuschend, da nur eine limitierte Effizienz in den präklinischen und klinischen Studien beobachtet werden konnte (Rancourt et al. und Sterman et al., 1998).

2.3 Onkolytische Therapie

Es gibt mehrere Ansätze das Problem der Unspezifität der Viren zu lösen. Zum einen kann versucht werden, über Tumor-assoziierte Proteasen onkolytische Viren zu aktivieren, da nahezu jedes Virus abhängig von Proteasen der Wirtszelle ist. Zum anderen fokussiert sich die Forschung auf tumorspezifische Rezeptoren, die den Viren den Eintritt in die Zelle ermöglichen. Zum dritten kann an dem Punkt der Transkription und Replikation angesetzt werden. Da das Reprogrammieren der Replikationsfunktionen in DNA-Viren einfacher zu sein scheint als in RNA-Viren, ist dies der gangbarste Weg für das Konstruieren eines onkolytischen Adenovirus. Schlüsselgene des Virus stehen unter der Kontrolle gewebsspezifischer Promoter. So sind das erste adenovirale Gen, dessen Expression von zellulären Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, E1A, sowie das nachgeschaltete E1B, von besonderer Bedeutung. E1A interagiert mit vielen Proteinen und ist so an der Zellsynthese und Replikation beteiligt. E1B schützt neben vielen anderen Funktionen vor allem die virale DNA vor dem Abbau in der Wirtszelle. So konnten Kim et al. (2003) durch das Vorsetzen des humanen Telomerase-Promoters vor das E1-Gen eine selektive Replikation und einen krebszellspezifischen zytopathischen Effekt nachweisen. In China wurde von der State Food and Drug Administration (SFDA) ein Virus namens H101, das die Funktion des E1B-55K Gens verloren hat, in Kombination mit Chemotherapie für nasopharyngeale Tumore für die klinische Anwendung zu gelassen. Das codierte Gen muss vor der Replikation an das Tumorsuppressorgen p53 binden und es inaktivieren, bevor eine Vermehrung des Virus stattfinden kann. Eine Mutation im p53-Gen ist eine der meisten Anomalitäten, die Tumorzellen aufweisen. Studien zeigen allerdings, dass die zytopathischen Effekte noch nicht komplett ausgeschaltet sind und die Erfolgsraten verbesserungswürdig sind. Lu et al. (2004) zeigten beispielsweise in einem klinische Phase II-Pilotprojekt eine Remissionsrate von 30,4 % und Nebenwirkungen wie Fieber, Schmerzen an der Einstichstelle, Leberschäden und hämatologische Toxizität durch die onkolytische Therapie. Für die Effizienz der Krebstherapie müssen also weitere Möglichkeiten eröffnet werden, um eine tumorspezifische Wirksamkeit und eine erhöhte Effektivität zu erreichen. Um möglichst viele Therapiemöglichkeiten zu eröffnen, wurde ein breites Spektrum an Tumorarten untersucht, so dass auch die Möglichkeit auf verschiedene Darreichungsformen für folgende Studien gegeben ist. So wären die intravenöse (i.v.) Gabe des Virus über die Halsvene, um Kopf-Hals-Tumore zu erreichen, die intraperitoneale Applikation, bei peritonealer Metastasierung,

Ovarial-, Pankreas-, Prostatakarzinom, so wie eine inhalatorische Aufnahme, zur Bekämpfung des Bronchialkarzinoms, möglich.

2.4 Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR)

Für die onkolytische Therapie von Krebserkrankungen ist die Internalisierung des Virus notwendig. Der erste Schritt der adenoviralen Infektion umfasst die Bindung des Carboxylendes der Knopfdomäne des Fiberproteins mit dem primären zellulären Rezeptor CAR (Bergelson et al., 1997), nachfolgend wird das Virus über eine rezeptorvermittelte Endozytose über die Interaktion mit den assoziierten Integrinen $\alpha_{v}\beta_{5}$ und $\alpha_{v}\beta_{3}$ internalisiert. Bei CAR handelt sich um ein 46-kD großes, Klasse-I-Transmembranprotein, das durch seine zwei Immungobulin-(Ig)-ähnlichen, extrazellulären Domänen zur Ig-Superfamilie gehört (Bergelson et al., Carson et al., Tomko et al., 1997), über dessen zelluläre Funktion und Regulation jedoch nur wenig bekannt ist. Cohen et al. (2001) konnte in seinen Immunfluoreszenzstudien zeigen, dass CAR im Lungenepithel auf die basolaterale Membran beschränkt ist und vor allem an den Zell-Zell-adhäsiven Strukturen und an den tight junctions lokalisiert ist. Diese Lokalisation lässt auf eine potentielle Rolle in der Formation oder Stabilisation von Zell-Zell-Kontakten vermuten. Auch eine Regulation während der embryonalen Entwicklung und Gewebsdifferenzierung konnte festgestellt werden (Nalbantoglu et al., 1999, Honda et al., 2000). Noutsias et al. (2001) zeigten in ihrer Studie, dass CAR in gesundem Herzgewebe herunter reguliert ist, jedoch in erkranktem Gewebe (bei dilatativer Kardiomyopathie = DCM) vermehrt nachzuweisen war. Er schlussfolgerte daraus, dass CAR vermutlich als "pathfinder-protein" dient, das während der Embryogenese die Herzgewebsbildung unterstützt und seine Hochregulierung in erkranktem Gewebe ein Versuch des Organismus sein könnte, den Herzmuskel durch die Wiederherstellung der Zell-Zell-Kontakte zu reparieren.

Auch im Tumorgewebe scheint CAR eine bedeutende Rolle zu zukommen, denn ähnlich wie die Beobachtungen, die für das Protein E-Cadherin gemacht wurden, das als Invasionsmarker und damit als prognostischer Faktor gilt, ist CAR im Primärtumor herunter reguliert und wird in den Metastasen wieder reexprimiert (Rauen et al., 2002). Und auch Brüning und Runnebaum (2004) konnten zeigen, dass die Migration der Krebszellen, in denen CAR überexprimiert wurde, reduziert war, während in Zelllinien mit erhöhtem Migrationspotential die Expression vermindert war. Einig ist man sich darüber, dass die Expression von CAR in Karzinomzellen hochvariabel und oft nur gering ausgeprägt ist, was häufig zu einer Resistenz gegen die adenovirale Infektion führt (Matsumoto et al., 2005, Graat et al., 2005, Li et al., 1999). Dabei konnte im Bezug auf die therapeutische Effizienz der adenoviralen Vektoren gezeigt werden, dass eine direkte Beziehung zu dem Level des primären Rezeptors existiert, während andere zelluläre Faktoren ohne nennenswerten Einfluss sind (Kim et al., 2002). Die ersten Resultate der adenoviralen Krebstherapie waren allerdings enttäuschend, da nur eine geringe Effizienz in präklinischen und klinischen Studien beobachtet werden konnte (Rancourt et al., 1998, Sterman et al., 1998). Deshalb mussten entweder Gewebe gefunden werden, bei denen von Natur aus dieser Rezeptor häufig auf der Zelloberfläche vorhanden war, oder Mittel entdeckt werden, die die CAR-Expression hochregulieren können. Brüning und Runnebaum (2003) fanden auf diesem Wege heraus, dass der Tumornekrosefaktor a (TNFα) die transgene adenovirale Expression erhöhen kann und, dass die Applikation von Zytokinen die Expression von CAR, sowie die der Integrine erhöht und so zu einer verbesserten therapeutischen Effizienz beitragen könnte. Nagano und seine Kollegen (2008) vermuteten, dass der begrenzte Freiraum zwischen den Tumorzellen (~20 nm) den Erfolg der viralen Therapie verhindert, da die meisten Viren einen größeren Durchmesser haben. Mit apoptoseinduzierenden Agentien (CD8/Caspase 8, Paclitaxel, Paclitaxel und TNF) konnten sie einen erhöhten interzellulären Freiraum und eine erhöhte initiale Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Infektion nachweisen.

Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Kombination onkolytischer Viren mit zytotoxischen Agentien eine wirkungsvolle Therapieoptimierung darstellt. Unter diesen Aspekten wurde in dieser Arbeit zum einen ein Hauptaugenmerk auf das kleinzellige Bronchialkarzinom gelegt, bei dem vermutet werden könnte, dass die CAR-Expression erhöht ist, da es sich aus dem normalen Lungengewebe entwickelt hat und sich durch einen dramatischen Verlauf und eine frühe Streuung auszeichnet. Zum anderen wurde mit dem Trichostatin A (TSA) gearbeitet, das als Histondeacetylase-Inhibitor (iHDAC) die Erhöhung der CAR-Expression induzieren kann. Die transkriptionale Regulation von CAR wird durch lokales Remodelling der Chromatinstruktur gesteuert und zwar hauptsächlich durch Histonacetylierung und nicht durch die Methylierung des Promoters (Pong et al., 2003). Diese Feststellung konnte von verschiedenen Gruppen (Okegawa et al., 2000, Kitazono et al., 2001, Kitazono et al., 2002) bekräftigt werden, in dem verschiedene iHDACs zur Anwendung kamen, um die CAR Gen-Expression zu induzieren, und damit das Vorhandensein von CAR auf der Zelloberfläche und damit die adenovirale Transduktion zu erhöhen. Segura-Pacheco et al. (2007) konnte diese Effekte mit einer kurzkettigen Fettsäure, der Valproat Säure (VPA),

die in der Klinik zur Behandlung von Epilepsie und manisch depressiven Erkrankungen genutzt wird, an Cervix-, Mamma- und Blasenkarzinomzellen nachweisen. Der Vorteil der iHDACs besteht nicht nur darin, dass eine Erhöhung der CAR-Expression eine Anwendung von routinemäßig eingesetzter pharmakologischer Präparate mit HDAC-inhibitorischen Fähigkeiten die adenovirale Gentherapie effizienter machen könnte, sondern auch, dass iHDAC-Medikamente per se anti-neoplasmatische Fähigkeiten besitzen (Drummond et al., 2005, Minucci et al., 2006). Somit könnte eventuell die CAR Expression unabhängig von dem Expressionsgrad und der Tumorentität erhöht werden.

2.5 Das Bronchialkarzinom

Noch bis in die 30er Jahre war die Inzidenz des Bronchialkarzinoms sehr gering, seine Häufigkeit begann erst zwischen den beiden Weltkriegen zu steigen, so dass es heute mit 25 % aller Malignome die häufigste Krebsform in der Europäischen Union darstellt. Mit einer Mortalitätsrate von 34,66 für Männer und 13,2 für Frauen für das Jahr 2008 gehört der Lungenkrebs zu einer der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Deutscher Krebsatlas, 2008). Die Zahl der Neuerkrankungen weist mit 13,2 % aller neu aufgetretenen Tumore eine steigende Tendenz auf, in Deutschland rechnet man mit 37.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Digel et al., 2001).

Obwohl Männer im Verhältnis 3:1 häufiger betroffen sind, steigt auch der Anteil der weiblichen Erkrankten, was durch den vermehrten Tabakkonsum der Frauen bedingt ist. Damit stellt das Bronchialkarzinom eine Besonderheit dar, denn es ist einer der wenigen Tumore, bei denen das Karzinogen bekannt ist. 85 % der Bronchialkarzinome entstehen durch aktive Zigaretteninhalation (Häußinger und Kohlhäufl, 2000). Allerdings hat sich aus der Entdeckung, dass nicht jeder starke Raucher an Lungenkrebs erkrankt die These der interindividuellen Variation und des genetischen Polymorphismus bei der Kazinogenese entwickelt. Eine genetische Prädisposition konnte nur bedingt nachgewiesen werden, so erhöht Lungenkrebs in der Familie lediglich das Risiko an Krebs zu erkranken, jedoch nicht speziell an einem Bronchialkarzinom. Neben weiteren ätiologischen Faktoren wie Asbest, Arsen, Beryllium, Senfgas, Chrom-6-Verbindungen, Haloethern, Dichlordiethylsulfiden, Nickelmetall und ionisierender Strahlung, haben chronische entzündliche Reizungen des Respirationstraktes ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung des Bronchialkarzinoms.

Eine Frühentdeckung gelingt meist nur zufällig, weshalb die 5-Jahresüberlebensrate mit nur 14 % aller Lungentumoren gering ist (Travis et al., 1995), die für small cell lung cancer (SCLC) liegt bei lediglich 5 % (Worden und Kalemkerian, 2000) und einer mittleren Überlebenszeit zwischen 7 und 20 Monaten (Hoffman et al., 2000). Die Prognose des einzelnen Patienten hängt allerdings von der lokalen Tumorausbreitung und dem Stand der Metastasierung ab.

Bei der komplexen Entstehung des Bronchialkarzinoms wird von einem Mehrstufenkonzept ausgegangen, bei dem chronische Reizung und Einwirkung karzinogener Noxen in den pluripotenten Reservezellen zu genetischen Schäden führt. Mit einer Plattenepithelmetaplasie, einer Becherzellhyperplasie oder einer Entartung neuroendokriner Zellen kann das Epithel so die verschiedenen Subtypen des Bronchialkarzinoms hervorrufen (Brüning et al., 2004). Die WHO klassifiziert das Bronchialkarzinom nach histologischen Gesichtspunkten in neun Subtypen (Travis et al., 1999), siehe Tabelle 2.

Die primäre Unterscheidung wird in kleinzellige und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (non small cell lung cancer = NSCLC) vorgenommen, wobei die letztere mit etwa 80 % die größere Gruppe darstellt.

Tabelle 2: WHO Klassifikation des Bronchialkarzinoms nach histopathologischen Gesichtspunkten (Travis et al., 1999) mit prozentualem Anteil (Travis et al., 1995)

Histopathologischer Subtyp	prozentualer Anteil
Plattenepithelkarzinom	29,4 %
Kleinzelliges Karzinom	17,8 %
Adenokarzinom	31,5 %
Großzelliges Karzinom	9,2 %
Karzinome mit pleomorphen sarkomatoiden oder sarkomatösen Anteilen	0,1 %
Karzinoidtumor	1,0 %
Karzinome vom Speicheldrüsentyp (Bronchialdrüsenkarzinom)	0,1 %
Unklassifizierbare Karzinome	< 0,1 %

2.5.1 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

Bei 20 bis 25% aller Lungenkrebsformen handelt es sich um das kleinzellige Bronchialkarzinom, das auch als Haferzellkarzinom bezeichnet wird. Es entsteht aus Epithelzellen neuroektodermalen Ursprungs (Onganer et al., 2005). 1988 hat die International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) eine Klassifikation vorgeschlagen, in der das reine kleinzellige Bronchialkarzinom von zwei selteneren Varianten, dem gemischten kleinzelligen/großzelligen Karzinom und dem kombinierten kleinzelligen Bronchialkarzinom unterschieden wird. Diese Einteilung wird nun üblicherweise benutzt. Alle drei Formen nehmen einen sehr aggressiven klinischen Verlauf und zeichnen sich durch seine frühe hämatogene und lymphogene Metastasierung in Skelett, Knochenmark, Leber und Gehirn aus. Die starke Neigung zur systematischen Streuung ist signifikant für das SCLC und unterscheidet es von den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, was große Bedeutung für die Therapie hat. Da bei der Diagnosestellung in den meisten Fällen schon eine Fernmetastasierung satt gefunden hat, wird die klinische Einteilung dieses Subtyps nicht nach der TNM Klassifikation vorgenommen, sondern entweder nach einem zwei Stadien Prinzip der Veteran's Administration Lung Cancer Group (VALG) in "limited disease" (LD) und "extensive disease" (ED) oder nach der ausführlicheren Marburger Klassifikation (siehe Tabelle 3).

Stadien	VALG	Marburger Definition
Very Limited Disease (VLD)	-	Primärtumor von Lungengewebe oder viszeraler Pleura umgeben mit maximal partieller Atelektase; Kleiner Winkelerguss ohne maligne Zellen; Lymphknotenbefall ipsilateral
Limited Disease (LD)	Auf einen Hemithorax begrenzt, mit und ohne ipsilaterale oder kontralaterale mediastenale oder supraklavikuläre Lymphknoten, mit und ohne Pleuraerguss	Primärtumor mit Thoraxwand-, mediastinaler Pleura-, oder Zwerchfellinfiltration; Lymphknotenbefall mediastinal ipsi- oder kontralateral sowie kontralateral hilär
Extensive Disease I (ED I)	Jede Erkrankungsausdehnung über das Stadium Limited Disease hinaus	Primärtumor mit Herz-, Speiseröhren- oder Wirbelsäuleninfiltration; Maligner Pleuraerguss; Maligner Perikarderguss; Recurrens-, Phrenicusparese; Vena Cava Superior Syndrom; Lymphknotenbefall supraklavikuläre ipsi- oder kontralateral
Extensive Disease	_	Hämatogene Fernmetastasen in
IIa (ED IIa)		kontralateraler Lungenbefall
Extensive Disease IIb (ED IIb)	-	Hämatogene Fernmetastasen in mehr als einem Organ

Tabelle 3: Vergleich der Marburger Klassifikation mit der Stadieneinteilung des SCLC nach der VALG

Das Karzinom ist typischerweise peribronchial lokalisiert und infiltriert zunächst die Submukosa, um sich dann endobronchial weiter auszubreiten. Da sich Symptome wie chronische Heiserkeit, Blut im Sputum oder die vor allem bei kleinzelligen Bronchialkarzinom auftretenden paraneoplastischen Symptome erst in späteren Stadien der Erkrankung manifestieren, bestehen häufig keine kurativen Behandlungsmethoden mehr. Nur bei einer Minderheit der Patienten im (V)LD-Stadium wird eine Resektion mit anschließender Chemotherapie als sinnvoll erachtet. Auf Grund der frühen Metastasierung wird mit einer systemischen Chemotherapie begonnen. Üblich sind dabei Polychemotherapien nach dem ACO- (Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin) oder PE- (Cisplatin, Etoposid) Schema. Sie führen häufig zu einer Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit, allerdings selten zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit. So liegt die mittlere Überlebenszeit im Stadium LD bei 14-20, bei ED zwischen 7 und 10 Monaten (Hoffmann et al., 2000 und Pandit et al., 2003). Gründe für das aggressive Wachstum des SCLC könnten die immunsuppressive Wirkung auf NK-Zellen (Ikeda et al., 1991) als auch/und der Verlust vieler Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sein. Die so aufgehobenen Zellkontakte führen zu einer Invasion in die extrazelluläre Matrix, ein Vorgang, der der Metastasierung ähnelt (Behrens et al, 1989). Eine spätere Reexpression der CAMs würde den Kontakt zu den jeweiligen Zielorganen herstellen (Albelda, 1993). Auch der Ursprung aus dem Neuroektoderm könnte ein Faktor sein, der die rasche Streuung beeinflusst. Die Metastasierung wird unter diesem Aspekt als eine deregulierte Form von physiologischen Invasionsprozessen angesehen (Liotta und Clair, 2000).

2.6 Das Neuroblastom

Bei dem Neuroblastom handelt es sich um einen Tumor, der sich embryologisch von der Neuralleiste herleiten lässt. Mit 7-10 % aller kindlichen Krebserkrankungen stellt er den häufigsten extrakraniellen, soliden Tumor im Kindesalter dar (Brodeur, 2000). Er zeichnet sich durch seine Heterogenität in der Histologie, Biologie und dem klinischen Verhalten aus und kann überall dort auftreten, wo sich sympathisches Nervengewebe befindet. Häufig tritt er in den Nebennieren, entlang des zervikalen, thorakalen und abdominalen Grenzstranges, sowie in den Paraganglien auf. Da etwa 50 % der Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Maris et al., 2007) und der Tumor oft frühzeitig in regionale und periphere Lymphknoten, das Knochenmark, Knochen, Leber und Haut metastasiert, ist eine Resektion meist nicht möglich. Dabei hängt die bestmögliche Therapieform nicht nur vom Stadium der Erkrankung, sondern auch vom Alter des Kindes ab. Die 5-2009) Jahresüberlebensrate liegt bei 70 % (Cohen al., die et Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeit im fortgeschrittenen Stadium bei nur 30-40 % (Escobar et al., 2006).

2.7 Das Mamma- und Ovarialkarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau, etwa jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Den dritthäufigsten Tumor beim weiblichen Geschlecht stellt das Ovarialkarzinom dar, das 6 % aller tödlichen Krebserkrankungen und 50 % der

Todesfälle bei gynäkologischen Krebsarten ausmacht. Die beiden Tumore weisen einige Gemeinsamkeiten auf, so ist das Risiko in fortgeschrittenem Alter zu erkranken bei beiden erhöht, das Mammakarzinom zeigt einen Altersgipfel bei 50-55 Jahren, das durchschnittliche Erkrankungsalter beim Ovarialkarzinom liegt bei 65 Jahren, außerdem ist ein familiär gehäuftes Auftreten bei beiden Karzinomen bekannt. Die Mutationen in zwei Genen, dem BRAC1 und dem BRAC2, führen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko, das beim Mammakarzinom mit 85 % bis zum 70. Lebensjahr höher liegt als beim Ovarialkarzinom mit 53 % (Antoniou et al., 2008). Die Gesamtüberlebensrate für fünf Jahre liegt bei Mammakarzinom-Patientinnen mit 76,4 %, für zehn Jahre mit 59,4 % und für 15 Jahre bei 46.7 % noch deutlich höher als beim Ovarialkarzinom das mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von ca. 35 % die schlechteste Prognose aller Genitalmalginomen hat (Engel et al., 2000). Um eine Streuung zu verhindern, falls dies noch nicht geschehen ist, und um ein Rezidiv zu vermeiden, werden Karzinome in der Mamma meistens operativ entfernt. Zusätzlich werden Chemo- und Radiotherapie, eine antihormonelle Therapie bei hormonsensitiven Karzinomen, sowie eine Behandlung mit Antikörpern gegen den HER2/neu-Rezeptor bei dessen Überexpression angewandt. Da beim Ovarialkarzinom das Ansprechen auf eine hormonelle und eine Strahlentherapie gering sind, wird dieser Tumor in großem Ausmaß reseziert und eine zusätzliche Chemotherapie durchgeführt.

2.8 Nasopharynxkarzinome

Nasopharynxkarzinome (NPC für englisch Nasopharyngeal Carcinoma) gehören zur Klasse der Kopf-Hals-Tumore und sind epithelialer Abstammung. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 0,3/ 100000 pro Jahr (Niedobitek, 1998) und ist somit, wie auch in ganz Zentraleuropa und Nordamerika mit 0,2 % aller Tumoren, ein recht seltener Tumor. Es gibt allerdings Regionen in denen diese Tumorart endemisch auftritt. Dazu zählen Südostasien, Grönland, Alaska und Nordafrika, mit einer Inzidenz von 30/ 100000. In Taiwan ist das NPC so zur häufigsten Todesursache bei jungen Männern geworden (Titcomb, 2001). Nach Einteilung der WHO unterscheidet man drei histologische Formen:

- 1. Das verhornte, gut differenzierte Plattenepithelkarzinom
- 2. Das nichtkeratinisierende Plattenepithelkarzinom
- 3. Den undifferenzierten Typ

Bei dem dritten Typ handelt es sich um ein lymphoepitheliales Karzinom, das in direktem Zusammenhang zu einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus steht (Vasef et al., 2007). Zu den ätiologischen Faktoren zählen außerdem, wie auch bei anderen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs. Nikotinabusus in Verbindung mit Alkoholkonsum. Auf Grund der epidemiologischen Besonderheiten konnte gesalzener Trockenfisch, der teilweise einen erhöhten Gehalt von Nitrosaminen aufweist, als weiterer Risikofaktor gefunden werden. Da die Tumore wegen ihrer geringen Symptomatik erst spät diagnostiziert werden, ist eine Operation nur selten das Mittel der Wahl. Die Strahlentherapie schlägt nur beim nichtverhornenden und undifferenzierten Typ an. Deshalb befassen sich viele Studien mit der kombinierte Therapie (Chemotherapie und Radiotherapie) für die fortgeschrittenen Stadien des NPC. Vor allem in China werden neue Therapien erforscht, so dass Su und seine Kollegen (2008) in einem nasopharyngealem Tumor Xenograftmodell eine Inhibition des Tumorwachstums nach einer kombinierten viralen onkolytischen und einer antiangiogenese Therapie nachweisen konnten und Pan (2008) eine Studie mit rekombinanter Adenovirusp53- und Radiotherapie für Patienten mit Nasopharynxkarzinomen angefertigt hat. In dieser konnte gezeigt werden, dass die 5-Jahresüberlebensrate und die rezidivfreie Überlebensrate über 5-Jahre um 7,5 % und 11,7 % höher lagen als bei der Kontrollgruppe, die nur mit Strahlentherapie behandelt wurden.

III. Material und Methoden

3.1 Fixierung

Die aus den Mäusen entnommenen Primärtumore, die dazugehörigen Zellen aus der Zellkultur in Agar, sowie die Lungen wurden in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH = 7,2-7,4 gelöst und das Gewebe bei Raumtemperatur 24 Stunden fixiert.

3.2 Paraffineinbettung und Herstellung der Schnitte

Nach Auswaschen des Formalins wurde das fixierte Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach dem anschließenden Xylolbad in Paraffin eingebettet (3 h in Puffer, 2 h in 50 % Ethanol, 2 h in 70 % Ethanol, dreimal für 2 h in 90 % Ethanol, dreimal für 3:30 h in absolutem Ethanol, 4:45 h in Paraplast und Isopropanol im Verhältnis 1:1, zweimal für 3:30 h in reinem Paraplast). Von dem eingebetteten Gewebe wurden nun mit dem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf silanbeschichtete Objektträger (HistoBond®, Marienfeld, Deutschland) gezogen wurden. Zum Trocknen und zur Haftung an den Objektträgern wurden die Schnitte über Nacht bei 37° C im Trockenschrank gelagert.

3.3 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR Antikörper mit alkalischer Phosphatase Enzymreaktion

Zunächst wurden kleinzellige Bronchialkarzinome der Zelllinien OH1, OH3, SW2, H82 und H69, die aus immundefizienten pfp/rag2-Mäusen stammten, entnommen. Zusätzlich wurden auf Scid-Mäusen gewachsene Neuroblastome, Ovarialkarzinome, Mammakarzinome, Kolonkarzinome, Prostatakarzinome, Pankreaskarzinome mit den dazugehörigen Zellpellets, die aus den gleichen Zellen aus der Zellkultur erstellt worden waren, gefärbt. Außerdem wurden noch Metastasen einiger Zellpinien der SCLC und klinische Fälle des Nasopharynxkarzinoms mit derselben Methode auf den Rezeptor hin untersucht (Tabelle 4). Als klinische Fälle wurden Nasopharynxkarzinome freundlicherweise von Prof. Friedrich aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKE, Deutschland,

zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um 41 Patientenfälle, deren Karzinome zwischen 1983 und 1987 operativ entfernt wurden und die unterschiedliche Grade der Erkrankung aufwiesen.

Aus vorangegangenen Färbungen zur Erstellung des Färbeprotokolls konnten die Zellen in Agar von OH1 auf Grund der ausgezeichneten Färbeeigenschaften als Positivkontrolle verwendet werden.

Tabelle 4: Humane Karzinomzelllinien, deren Expression von CAR untersucht wurde

Karzinome	Zelllinien
SCLC	OH1, OH3, SW2, H69, H82
Neuroblastome	Kelly, SKNSH, LAN1, IMR32
Ovarialkarzinome	OC2, OVCAR3, MZ10
Mammakarzinome	T47D, MCF7, DU4475
Kolonkarzinome	SW480, CaCo, HT29
Prostatakarzinome	DU145, PC3, LNCAP
Pankreaskarzinome	Ca-5061, Ca-5156, Ca-5072
Metastasen der SCLC	H69, OH3, OH1
Nasopharynxkarzinome	Klinische Fälle

Bevor mit der Färbung begonnen werden konnte, wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (zweimal für 5 Minuten in Xylol, zweimal für 5 Minuten in 100 %igem Ethanol, 5 Minuten in 96 %igem Ethanol, 5 Minuten in 70 %igem Ethanol, 5 Minuten in 50 %igem Ethanol und abschließend 2 Minuten in Aqua dest.). Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zunächst einer hitzeinduzierten Vorbehandlung unterzogen. In einer Zitratpufferlösung (Zitronensäure Monohydrat, mit 10 N NaOH Aqua dest. pH 6,0) wurden die Schnitte zur Epitop-Demaskierung einmal bei 1000 W in der Mikrowelle aufgekocht und darauf folgend dreimal für fünf Minuten bei 500 W erwärmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte immer von genügend Zitratpuffer umgeben waren. Im

folgenden Schritt kühlte der Puffer über 30 min bei Raumtemperatur ab, wobei nach 20 min die Hälfte des Puffers durch Kalten ersetzt wurde. Um den Zitratpuffer abzuwaschen, wurde als nächstes mit einem kochsalzhaltigen Tris/HCl Puffer (Trizma Base SIGMA 50 mM, NaCl 150 mM mit 2 N HCl Aqua dest. pH 7,6 = TBS) dreimal für fünf Minuten gespült.

Alle folgenden Verdünnungsangaben beziehen sich auf eine Verdünnung mit DAKO® Antibody Diluent With Background Reducing Components (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA). Bis auf die Inkubation mit dem primären Antikörper wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden zunächst die Schnitte 30 min mit Schweine-Normalserum (Swine Serum (Normal), DakoCytomation, Glostrup, Denmark, X0901) 1:10 verdünnt inkubiert, bevor mit der Inkubation mit dem Primärantikörper begonnen werden konnte. Zwischen beiden Schritten wurde nicht gespült, sondern nur das überschüssige Serum abgeklopft und folgend der Antikörper Anti-CxADR 1:200 verdünnt aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4° C über Nacht. Am nächsten Morgen wurde nach dreimaligen Spülen mit TBS für jeweils fünf Minuten mit dem sekundären biotinyliertem Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (Swine anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated, DakoCytomation, Glostrup, Denmark, E0353), 1:200 verdünnt, für 30 min inkubiert. Nach weiterem Spülen wie oben angegeben, folgte die Inkubation mit dem Vectastain[®] ABC alkalische Phosphatase Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA, ABC-AP Kit Universal, AK 5200) für 30 min. Nach Angaben des Herstellers wurde das Avidinreagenz und das biotinylierte Enzym mindestens eine halbe Stunde vor der Verwendung angesetzt. Vor der Entwicklung der Alkalischen-Phosphatase-Enzymreaktion mit Neufuchsin und Naphthol wurde wieder wie vorher gespült und während dessen das Reaktionsgemisch angesetzt. Für 200 ml wurden 400 mg Natrium-Nitrit in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 400 µl Neufuchsin (5 g/100 ml 2 N HCl) sowie 200 ml Trispuffer (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, mit 2 N HCl Aqua dest. pH 8,24) vermischt. Nachdem 40 mg Naphthol AS in 1000 µl Dimethyformamid (DMF) gelöst worden waren, wurde es ebenfalls hinzubegeben. Als letztes folgten 260 µl Tween 20 zu dem Ansatz, mit dem die Schnitte 30 min im Dunkeln inkubiert wurden. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte fünf Minuten in fließendem Leitungswasser gespült und nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser mit filtriertem Mayers Hämalaun (1:1 in Aqua dest.) für drei Sekunden gegengefärbt. Es folgten die fünfminütige Bläuung in fließendem Leitungswasser und nach der Überführung in Aqua dest. das Eindecken mit dem wasserhaltigen Medium Clarion/Crystal Mount I und II (Biomeda corp., Foster City, California, USA).

3.4 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR Antikörper mit Glukoseoxidase Enzymreaktion

Als weiterer Versuch, die Intensität der Färbung zu steigern, wurde für die ABC-Methode ein anderer Enzymkomplex mit Peroxidaseaktivität verwendet. Es handelte sich hierbei um die Glukoseoxidase, die durch die Verwendung von Ammonium-Nickelsulfat zu einer Signalverstärkung führen soll. Der Ablauf der Färbeschritte ist dem der vorangegangen beschriebenen Färbung sehr ähnlich. Im Unterschied dazu wurde jedoch anstatt des TBS-Puffers 0,05 M saliner Phosphatpuffer, PBS-Puffer, (Di-Natriumhydrogenphosphat x H₂O 50 mM, NaCl 150 mM mit 2 N HCl Aqua dest. pH 7,4) verwendet. Nach der hitzeinduzierten Vorbehandlung und dem ersten Mal Spülen wurde mit 3 %igem H₂O₂ in Methanol über 15 min die endogene Peroxidasereaktivität gehemmt, um sicherzustellen, dass es sich um die in der Immunreaktion dargestellte und für die Lokalisierung der zellulären Antigene verantwortliche Peroxidase handelt. Alle folgenden Schritte wurden beibehalten bis zur Inkubation mit dem Vectastain[®] ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA, ABC-POX Kit Standard, PK-6100), das anstatt AP als Enzym die Peroxidase (POX) enthält. Nach der Inkubation mit dem Vectastain[®] ABC POX Kit und dem dreimaligen Spülen mit PBS folgte die Entwicklung. Angesetzt wurde das Reaktionsgemisch für 300 ml indem 120 mg Ammoniumchlorid in 300 ml 0,1 M PB-Puffer (KH₂PO₄, Na₂HPO₄ mit Na₂HPO₄ x 2 H₂O, pH 7,4) unter Rühren gelöst wurden, 150 mg DAB (3'3-Diaminobenzidin), 6 ml Nickelsulfat (0,05 M), 6 ml Glukose (10 %) und 1000 µl Glukoseoxidase (Ansatz: 1,2 mg/1 ml Aqua dest.) wurden hinzugefügt. Die Entwicklung bedarf einer mikroskopischen Kontrolle, da es schnell zu einer Überfärbung kommen kann. Nach Überprüfung der Positivkontrolle wurde unter fließendem, destilliertem Wasser die Reaktion gestoppt und die Präparate mit Clarion/Crystal Mount I und II eingedeckt. Auf eine Gegenfärbung wurde verzichtet, da die Blaufärbung des Hämalauns keinen guten Kontrast zu dem Braun-Schwarz des DAB lieferte. Neben den zu färbenden Schnitten wurde für jedes Gewebe eine Negativkontrolle mit DAKO Antibody Diluent With Background Reducing Components, sowie eine Isokontrolle mit Kaninchen IgG (Rabbit Immunoglobulin Fraktion (Normal), Negative Control, DAKO A/S, Glostrup, Denmark, X0903) in selber Verdünnung und Konzentration wie Anti-CxADR anstatt des primären Antikörpers verwendet. Alle anderen Färbeschritte waren identisch. Bei diesen Geweben konnte keinerlei Färbereaktion festgestellt werden.

3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Da bei der Glukoseoxidase-Verstärkungsreaktion nicht gegengefärbt wurde, waren weder Kerne noch Zellgrenzen erkennbar, weshalb parallel zur immunhistochemischen Färbung die gleichen Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) unterzogen wurden. Sie wurden wie die anderen Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und folgend mit Hämalaun und Eosin gefärbt (3 min in Hämalaun, 2 min in Aqua dest., 5 min in Leitungswasser, 3 min in Eosin, 30 min in Aqua dest.). Nach der Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (15 min in 70 %igem Ethanol, zweimal 30 min in 96 %igem Ethanol, zweimal 5 min in 100 %igem Ethanol, dreimal 5 min in Xylol) konnte mit Eukitt[®] (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingedeckt werden.

3.6 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde am Mikroskop Axiolplan 2 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) vorgenommen. Mit der Digitalkamera Axiovision MRc5 (Zeiss) wurden repräsentative Areale aufgenommen und mit dem dazugehörigen Computerprogramm (Axiovision Release 4.6.3 SP1 (11-2007)) sichtbar gemacht. Um die Qualität, als auch die Quantität der Färbung zu erfassen, wurden bei der Auswertung zum einen die Intensität des Farbstoffs von schwacher (+) bis zu starker Färbung (+++) unterteilt, zum anderen der prozentuale Anteil des gefärbten Gewebes eines Schnittes (von 0-100 %) bewertet. Die Ergebnisse sind das Produkt zweier unabhängiger Bewerter, die sich in den meisten Fällen glichen. Bei den Präparaten, die nicht einstimmig bewertet wurden, wurde nach kurzer Diskussion zwischen den Begutachtern ein übereinstimmendes Ergebnis gefunden.

3.7 Zellkulturversuch mit Ad-GFP

Die Zelllinien wurden in Kultur genommen, um zu überprüfen, ob eine Infektion mit einem Adenovirus möglich ist. Der Virus besitzt dafür das Gen für das Grün fluoreszierende Protein (GFP), das bei seiner Expression zu einer Fluoreszenz führt, über die wiederum eine Infektion der Zellen nachgewiesen werden kann.

3.7.1. Kultivierung der Zelllinien

Es wurden die Zelllinien OH1, OH3, H69, H82 und SW2 in Kultur genommen. Die im -80° C kalten Tiefkühlschrank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 30° C aufgetaut, mit dem Vollmedium (DMEM high Glucose 4,5 g/l, with Sodium Pyruvate, with L-Glutamine, PAA Laboratories, Pasching, Österreich, E15-843), dem 1 mM fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt worden waren, versetzt und suspendiert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium erneuert oder die Zellen 1:4 gesplittet.

3.7.2 Virustiterbestimmung

Zur Bestimmung des Virustiters des Virus Ad-GFP wurde die adhärente Zelllinie 293 mit einer definierten Zellzahl von 1 x 10^6 Zellen in 1 ml Medium pro Napf in der sechs Napf-Platte ausgesät. Es wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt, in dem 1089 µl vorgewärmten DMEM ohne FCS 11 µl Virusüberstand hinzu pipettiert wurden (Verdünnung 10^{-2}). In die folgenden Falconröhrchen mit 990 µl DMEM wurden jeweils 110 µl aus dem vorherig Verdünntem gegeben. So ergab sich eine Verdünnung von 10^{-2} bis 10^{-7} Viren pro Falconröhrchen. Die 293 Zellen wurden mit DMEM gewaschen und die Verdünnungsreihe aufgetragen. Die folgenden 90 min verweilten die Zellen im Inkubator und wurden alle 15 min geschwenkt. Gestoppt wurde die Infektion, nach Angaben eines etablierten Protokolls freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn P. Groitl, technischer Assistent in der Abteilung für molekulare Virologie am Heinrich-Pette-Institut, Deutschland, mit 2 ml Vollmedium. Nach 48 h wurden die Zellen unter UV-Licht am Mikroskop ausgezählt.

3.7.3 Infektion der Zelllinien

Die Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome wurden mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und OH1, H82 und SW2 mit einer Zellzahl von 300.000 pro 1 ml, OH3 und H69 auf Grund der langsamen Wachstumsrate jeweils mit 1,6 ml auf eine Sechs-Napf-Platte ausgesät. Die Virusstammlösung wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit DMEM verdünnt. Mit einer multiplicity of infection (moi) von 20, also der 20-fachen Menge an Viren im Verhältnis zur Zellzahl (Flint et al., 2003), wurden die Zellen infiziert, 90 min im Brutschrank inkubiert und alle 15 min geschwenkt. Gestoppt wurde die Infektion mit 2 ml Vollmedium.

Als zweiter Versuchsansatz wurden die Zelllinien ebenfalls mit 300.000 Zellen pro 1 ml ausgesät und mit einer moi von 20 infiziert. Allerdings wurde die Infektion zeitlich auf 1,5 h begrenzt, in dem durch das Abzentrifugieren die in dem Medium gelöste Viren abgesaugt werden konnten, und so eine nachträgliche Infektion ausgeschlossen wurde. Die Zellen wurden nach dem Entfernen des Virus mit DMEM gewaschen und danach in 9 ml Vollmedium aufgenommen um jeweils 3 ml jeder Zelllinie auf eine Sechs-Napf-Platte für die drei Messwerte zu verteilen.

3.7.4 FACS-Analyse

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen aus den Sechs-Napf-Platten in 15 ml Falcons transferiert, bei 2000 U/min und 20 °C 3 min zentrifugiert, zweimal mit PBS gespült und dann in frischem PBS resuspendiert.

Mit Hilfe des FACS-Gerätes BDFACSCanto konnte die Zahl der Zellen bestimmt werden, die mit GFP fluoreszierten. Dies entspricht der Zahl der Zellen, die den Virus über den CAR aufgenommen haben. Außerdem wurde anhand der Flussrate die Gesamtzellzahl errechnet. Ausgewertet wurden die Daten mit der BD FACSDivaSoftware (Becton, Dickson and Company, fluorescence activated cell sorting, BD Biosciences, San Jose, CA, USA.).

3.8 Zellkulturversuche mit Trichostatin A (TSA)

Das TSA, mit dem die SCLC Zellen vorbehandelt wurden, gehört zu den Histondeacetylase-Inhibitoren (iHDACs). Ein möglicher Effekt auf die CAR Expression wurde mit dem FACS überprüft.

3.8.1 Kultivierung der Zelllinien

Die fünf Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome wurden wie oben beschrieben in Kultur genommen und versorgt, diesmal allerdings mit dem Kulturmedium GIBCO RPMI 1640 von Invitrogen, Paisley, PA49RF, Scotland, UK, + 10 % FCS, L-Glutamin und 1 % Streptomycin/Penicillin, versetzt.

3.8.2 Vorbehandlung mit TSA

An Hand der Vorversuche, in denen verschiedene Messzeitpunkte (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h) und Konzentrationen (100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM) des TSA ausgetestet wurden, sollte festgestellt werden, wie die optimale Infektion der Zellen mit dem Virus erzielt werden kann. Es wurden 2.000.000 Zellen jeder Zelllinie in 2,5 ml Vollmedium aufgenommen und in eine Sechs-Napf-Platte ausgesät, drei dieser Platten wurden angefertigt. Die Zellen der ersten Platte wurden mit 2,5 ml Medium mit 2 µM, die der zweiten mit 2,5 ml und 20 nM TSA versetzt. Auf der dritten Platte wurden zu jeder Zelllinie 2,5 ml reines Medium hinzu gegeben. Alle drei wurden dann für 6 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank inkubiert. Zu der Fixierung der Zellen wurden sie in 10 ml Röhrchen aufgenommen, bei 15.000 U/min für 6 min und Raumtemperatur zentrifugiert und in 1 ml Fixierungspuffer (Dulbecco's PBS Gibco, Darmstadt, Deutschland, Ref. 14190-094, pH = 7,4, 1 % BSA, 0,5 % Natriumazid, 2 % Formalin) aufgenommen. Nach einer Einwirkungszeit von 20 min wurden 10 ml PBS (Dulbecco's PBS, Gibco, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben, die Lösung geschwenkt und wieder, wie oben beschrieben, zentrifugiert. In 1 ml PBS wurden die fixierten Zellen über Nacht im Kühlschrank gelagert.

3.8.3 FACS Färbung

Um den Rezeptor im FACS nachweisen zu können, mussten die Zellen ähnlich der Immunhistochemie mit dem Antikörper Anti-CxADR gefärbt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst wieder zentrifugiert und mit Zelldissoziationspuffer (Cell Dissociation Buffer, enzyme free, PBS-based, Invitrogen, San Francisco, CA, USA, Cat. No. 13151-014) resuspendiert. Das Resuspendieren wurde nach fünfminütiger Wartezeit zweimal wiederholt, die Zellen zentrifugiert und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen jeder Platte wurden dann geteilt und jeweils mit 1:50 verdünntem Antikörper und Kaninchenserum (Rabbit Serum (Normal), DakoCytomation, Glostrup, Denmark, X0902) in gleicher Konzentration versetzt in 1 ml Röhrchen auf Eis für 30 min inkubiert. So wurden für jede Zelllinie eine Färbung mit dem Antikörper und dazugehöriger Isotypkontrolle für die TSA-Konzentrationen 1 µM und 10 nM sowie ein zum Vergleich benötigter unbehandelter Versuchsansatz angefertigt. Alle angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf eine Verdünnung mit dem FACS-Puffer, bei dem ebenfalls darauf geachtet wurde, dass er gekühlt verwendet wurde. Um die Inkubation zu beenden, wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugeben, die Zellen bei 2250 U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend 100 µl des 1:200 verdünnten sekundär Antikörpers (Schwein-anti- Kaninchen) auf die Zellen gegeben. Auch hier folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis, das Stoppen mit FACS-Puffer und das Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge. Die nachfolgende Inkubation mit Streptavidin APC (BD Pharmingen[®], Franklin Lakes, NJ, USA, 554067) 1:100 verdünnt lief auf Eis und im Dunkeln ab. Nach 30 min erfolgte der Stoppvorgang und die Zellen wurden in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Mit der Durchflusszytometrie konnte so für jede Zelllinie über die Fluoreszenzintensität der Einfluss des TSA auf die Expression des Rezeptors ermittelt werden.

3.8.4 Überprüfung der Zellvitalität nach 24 Stunden

Da vermutet wird, dass TSA durch seine histondeacetylase-inhibierenden Eigenschaften auch einen Effekt auf das Zellwachstum und auf die Einleitung der Apoptose in den behandelten Zellen hat (Xu et al., 2006) wurde die Zellzahl und -vitalität nach 24 Stunden mit der 1 μ M und 10 nM Lösung mit TSA mit dem CASY[®] (Schärfe System, Reutlingen) gemessen. Die Zellen wurden wie in dem Versuchsansatz für die FACS-Färbung zu 2 x 10⁶ Zellen auf eine Sechs-Napf-Platte ausgesät, in 2,5 ml Medium, zu dem weitere 2,5 ml Medium mit TSA versetzt hinzugefügt wurden. Für jede Zelllinie wurden zwei Versuchsansätze mit den TSA Konzentrationen 1 μ M und 10 nM vorbereitet und für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und 100 μ l der Zellsuspension in 10 ml CASY[®] ton (Schärfe System, Reutlingen), einer isotonen Lösungsflüssigkeit, aufgenommen und mit CASY[®] ausgewertet.

IV. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Anti-CxADR

Alle ausgewählten Gewebe wurden mit dem Antikörper gegen humanes CxADR gefärbt, auch wenn nur die Nasopharynxkarzinome aus dem Menschen entnommen wurden. Da zunächst einige der Schnitte nur schwach angefärbt waren, musste ausgetestet werden, ob sich die Ergebnisse noch verbessern lassen. Zum einen wurde dies mit einer höheren Konzentration des Antikörpers versucht. Die Verdünnungsreihe (1:200, 1:100, 1:50) führte leider zu keinem besseren Ergebnis, da die Intensität, im Gegensatz zu dem prozentualen Anteil des gefärbten Gewebes, nicht zugenommen hatte, und die Unspezifität der Färbung gleichfalls erhöht wurde. Zum anderen wurde als weitere Färbemethode die Glukoseoxidase-Verstärkungsreaktion getestet, die aber im Vergleich zu immunhistochemischen Färbung mit AP keine deutliche Verstärkung aufwies. Zwar wiesen einige Zelllinien (z.B. OH3 und LAN1) einen höheren Anteil gefärbten Gewebes auf, allerdings war die Intensität sehr schwach und in den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse mit der Färbung mit AP überein. Das schwächere Farbergebnis und der sich als aufwendiger und damit fehleranfälliger erweisende Abgleich mit den HE-Färbungen zur Unterscheidung des befallenen Gewebes von nekrotischen Bezirken führte dazu, das alle nachfolgenden Färbungen nur mit der AP-Reaktion vorgenommen wurden mit einer Verdünnung des Antikörpers von 1:200.

4.1.1. Färbung der kleinzelligen Bronchialkarzinome

Um eine allgemeine Aussage über das Färbeverhalten der kleinzelligen Bronchialkarzinome treffen zu können, wurden nicht nur fünf verschiedene Zelllinien, sondern auch mehrere Tumore und die dazugehörigen Zellen in Agar gefärbt. Dazu wurden von OH3, H82 und SW2 von fünf und von H69 und OH1 von drei Tumoren Schnitte erstellt. Die unterschiedlichen Tumorzahlen ergaben sich aus den schon 2004 entnommenen gelagerten Paraffinblöcken der pfp/rag2-Mäuse. Die Auswertung der Färbung ergab zunächst, dass alle Tumore sowie die Zellen in Agar eine Färbung aufwiesen (Tabelle 5 und 6). Allerdings wiesen die verschiedenen Zelllinien starke Unterschiede in den prozentualen Anteilen und auch in den



Intensitäten auf. Die Zelllinie mit den schwächsten Färbeeigenschaften ist OH3, bei der keiner der Tumore mehr als 20 % Färbung aufwies.

Abbildung 1: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR der SCLC. Die Zelllinie OH1 zeigt sowohl in den Zellpellets (a), als auch im Tumorgewebe (b) das stärkste Färbeergebnis. Im Unterschied zu den anderen Zelllinien zeigt SW2 nur eine geringe Expression von CAR in den Zellen in Agar (c), dafür aber eine intensive Färbung im Tumor (d). Im histologischen Präparat des Tumors von der Zelllinien H69 (e) lässt sich die Anfärbung der Zellgrenzen besonders gut erkennen.

Dem gegenüber steht OH1 mit dem wohl besten Färbeergebnis (bis zu 80 % gefärbt mit einer Intensität von $++ \rightarrow +++$), dessen Zellen in Agar deshalb auch als Positivkontrolle verwendet wurden. Auffällig war außerdem, dass bei allen Zelllinien mit einer Ausnahme die Zellpellets eine stärkere Färbung hatten als die Tumore. Bei SW2 zeigte sich dieses Phänomen auf umgekehrte Weise (Zellen in Agar 20 %, (+) gefärbt, Tumore bis zu 60 % mit einer Intensität von durchschnittlich ++). Bei allen Färbungen konnte die Lokalisation des Rezeptors nachgewiesen werden, da immer die Membran angefärbt wurde, was vor allem in den Schnitten der Zellpellets sichtbar war. Im Tumor wurden so die Zellgrenzen sichtbar, die den membranösen Sitz von CAR wieder spiegelten (Abbildung 1).

Um den Verlauf der Expression von CAR während der Progression des Tumors darzustellen, wurden auch die Metastasen einiger SCLC Zelllinien mit Anti-CxADR gefärbt. Dafür wurden die Zelllinien OH1, H69 und OH3 und ihre Metastasen in Lungen für die Färbung als sinnvoll erachtet. Die Auswahlkriterien bezogen sich sowohl auf die voran gegangene Färbung, als auch auf das Metastasierungspotential der Zelllinien. OH1 wurde als Zelllinie mit den meisten Metastasen (medianer Wert = 13.038 in pfp/rag2 Mäusen), H69 mit einer mittleren Anzahl an Metastasen (medianer Wert = 181 in pfp/rag2 Mäusen) und OH3 wurde mit wenigen Metastasen (medianer Wert = 45 in pfp/rag2 Mäusen) ausgewählt (Sodeur et al., 2009). OH1 und H69 zeigten nicht nur eine starke Färbung, sondern auch eine hohe Metastasierungsrate, während OH3 im Tumor nur wenig angefärbt war und nur wenig metastasierte. Zum exakten Vergleich wurden die Tumore, die die Metastasen verursachten und damit aus demselben Tier stammten wie die Lunge, mit gefärbt. Von den 24 in allen Schnitten gefundenen Metastasen waren 83,3 % positiv (20 Metastasen), 7 davon mit einer starken Färbung (Intensität ++) (Abbildung 2).

Besonders die Metastasen von OH1 wiesen ein starke Färbung auf, wohin gegen die gestreuten Zellen H69 durchschnittlich schwächer angefärbt waren (Intensität (+)). Von OH3 wurden nur wenige Metastasen gefunden und ihre Färbung war ebenfalls nur von geringer Intensität. Die Ergebnisse der Färbung der Zellen in Agar, des Tumorgewebe sowie der Metastasen sind in Abbildung 3 dargestellt.


Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung mit Anti-CxADR der Metastasen der Zelllinien H69 (a), OH1 (b und c) der kleinzelligen Bronchialkarzinome in den Lungen. Die Färbung der einzelnen Metastasen ist erkennbar (\rightarrow) .



Abbildung 3: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der kleinzelligen Bronchialkarzinome im Tumor und in den Zellpellets für alle fünf Zelllinien. Für die Zelllinien OH1, OH3 und H69 sind zusätzlich noch die Färbeergebnisse der Metastasen dargestellt. Die Zelllinien OH1 zeigt nicht nur die prozentual höchsten Anteil an gefärbtem Gewebe, sondern auch die stärkste Intensität (++/+++).

4.1.2. Färbung der Neuroblastome

Im Gegensatz zu den fast durchgängig positiven Färbeergebnissen der SCLC wiesen drei der ausgewählten Zelllinien der Neuroblastome keinerlei positive Reaktion auf den Antikörper auf. Kelly und SKNSH zeigten weder im Tumorgewebe noch in den Zellpellets eine Färbung, die Entwicklungsreaktion mit der alkalischen Phosphatase rief dabei die gleichen Ergebnisse wie die Glukoseoxidase-Verstärkungsreaktion hervor. Bei der Zelllinie IMR 32 wurde der Rezeptor im Tumor genauso wenig nachgewiesen, allerdings zeigten die Zellen in Agar eine stark positive Färbung. LAN 1 erwies sich als die einzige Zelllinie, die sowohl im Tumor als auch in den Zellen in Agar CAR exprimiert (Abbildung 4).



Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung der Neuroblastome. Die Zelllinie LAN 1 zeigte als Einzige eine Färbung der Zellgrenzen in den Zellpellets (a) und im Tumorgewebe (b). IMR 32 zeigte in den Zellen in Agar (c) eine Färbung von 80 % und einer Intensität von ++.

In diesem Fall konnte die Glukoseoxidase-Verstärkungsreaktion noch weitere Ergebnisse liefern. So konnte zwar in einem größeren prozentualen Anteil der Rezeptor nachgewiesen werden, allerdings war die Färbung deutlich schwächer (Tabelle 7 und 8).



Abbildung 5: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der Neuroblastome im Tumor und in den Zellen in Agar. Die Zellinien Kelly und SKNSH zeigten keinerlei positive Ergebnisse. Die Zellen in Agar der Zelllinie IMR 32 waren mit 80 % und einer Itensität von ++ von den Neuroblastomen die einzigen Zellen, die eine deutliche Färbung ausfwiesen.

4.1.3. Färbung der Ovarialkarzinome

Auch von den Ovarialkarzinomen wurden drei verschiedene Zelllinien auf das Vorhandensein des Rezeptors getestet. CAR konnte dabei in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die Zelllinien im Vergleich untereinander eine deutliche Heterogenität. So wurde bei OVCAR 3 im Tumor etwa die Hälfte des Gewebes stark angefärbt, während die Zelllinien OC 2 und MZ 10 nur schwache Färbungen aufwiesen. OC 2 wies mit 0 - 20 % die geringste CAR-Expression auf. MZ 10 zeigte dafür mit über 50 % durchschnittlich einen deutlich höheren Anteil an gefärbtem Gewebe (Tabelle 10). Auffällig war außerdem, dass die Färbung der Zellen in Agar aller drei Zelllinien nur eine geringe Intensität hatte (+/(+)), während im Tumorgewebe von OVCAR 3 eine Intensität bis zu +++ zu erkennen war (Abbildung 6).



Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der Ovarialkarzinome mit Anti-CxADR. Das intensivste Färbeergebnis wies die Zelllinie OVCAR 3 auf (**a** und **b**).



Abbildung 7: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Ovarialkarzinome mit Anti-CxADR. Im Vergleich zu den Zelllinien OVCAR 3 und MZ10 zeigte OC 2 nur eine schwache Färbung.

4.1.6. Färbung der Mammakarzinome

Von den drei humanen Zelllinien, die repräsentativ für das Mammakarzinom ausgewählt wurden, konnte der CAR-Rezeptor nur für T47D im Tumorgewebe und in den Zellpellets nachgewiesen werden. Dabei war die Verteilung der Färbung innerhalb des Tumors sehr heterogen. DU 4475 wies zwar in den Zellen in Agar eine Färbung auf, diese schien aber nicht, wie sonst so typisch für CAR, auf die Zellmembran begrenzt, sondern im Zytoplasma lokalisiert zu sein. MCF7 zeigte keinerlei Reaktion und war somit im Tumor sowie in den Zellen negativ (Tabelle 11).



Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung der Mammakarzinome mit Anti-CxADR. Im Tumorgewebe von TD47 (a) zeigte sich die Expression von CAR sehr heterogen. Auch in den dazu gehörigen Zellen in Agar (b) sind einige Zellen stärker (++) angefärbt, als die umgebenden Zellen. Trotzdem ist der membranöse Sitz von CAR bei TD47 gut erkennbar (c).



Abbildung 9: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Mammakarzinome mit Anti-CxADR. Während die Zelllinie MCF7 keine Färbung zeigte, ließ sich sowohl in DU4475 als auch in T47D der Rezeptor in den Zellen in Agar nachweisen.

4.1.6. Färbung der Pankreaskarzinome

Für den Nachweis des CAR in den Pankreaskarzinomen wurden drei Zellpellets sowie drei Tumore ausgewählt. Dabei ließ sich der Rezeptor in den Zellen in Agar, wenn auch mit einer schwachen Intensität, nachweisen. Im Tumorgewebe konnte nur bei der Zelllinie Ca 5061 eine Färbung gezeigt werden, auch wenn diese ebenfalls nur von geringer Intensität (+) und Häufigkeit (10 %) war. Bei den beiden anderen Zelllinien konnte in dem Tumorgewebe keine positive Reaktion festgestellt werden (Abbildung 10).



Abbildung 10: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Pankreaskarzinome mit Anti-CxADR. Nur die Zelllinie Ca 5061 zeigte eine Expression von CAR in den Zellpellets und im Tumor. Insgesamt waren die Anfärbungen der Pankreaskarzinome durch den Antikörper gegen CAR schwach ausgeprägt.

4.1.6. Färbung der Kolonkarzinome

Auch in den Kolonkarzinomen konnte CAR nachgewiesen werden. Wie auch die vorangegangenen Färbungen gezeigt haben, ist die Expression in dem Tumorgewebe nur gering ausgeprägt. Besonders schwach war das Färbeergebnis der Zelllinie HT29. Hingegen konnte eine intensive (+++) und weit verbreitete Färbung (70 %) in den Zellen in Agar der Zelllinie SW480 gezeigt werden (Abbildung 11). Bemerkenswert ist allerdings, dass die Tumore aller drei Zelllinien eine Färbung zeigten, obwohl in den Zellpellets der Rezeptor bei HT29 und CaCo nicht nachzuweisen war (Abbildung 12). Auch gesundes Gewebe der Maus zeigte eine positive Reaktion auf die Färbung, so ließ sich das Mäuseepithel in allen seinen Schichten mit anfärben.



Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung der Kolonkarzinome mit Anti-CxADR. Die Zellen der Zelllinie SW480 (a) zeigten eine starke Färbung, das Tumorgewebe der entsprechenden Zellen wies allerdings nur eine schwache und innerhalb des Tumors sehr heterogen verteilte Färbung auf. HT29 ließ sich nur im Tumor anfärben (b), dafür aber nicht in den Zellpellets. Erkennbar ist außerdem die Anfärbung des Epithels.



Abbildung 12: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der Kolonkarzinome mit Anti-CxADR. Die Zellen in den Pellets der Linien CaCo und HT29 waren negativ, SW480 wies hingegen ein eindeutig positives Färbeergebnis auf.

4.1.7. Färbung der Prostatakarzinome

In den Tumoren der Zelllinien der humanen Prostatakarzinome ist die Expression von CAR stark herunter reguliert. Während zwei der Tumore eine sehr schwache Färbung aufwiesen, war das Tumorgewebe der Zelllinie PC3 komplett negativ und auch die dazugehörigen Zellen in Agar waren nicht angefärbt. Die anderen beiden Zelllinien der Prostatakarzinome waren jedoch positiv und DU145 dokumentierten mit einem Ergebnis von 80 % und einer Intensität von +++ die stärkste Färbung innerhalb dieser Tumorzelllinien.



Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung der Prostatakarzinome mit Anti-CxADR. Dargestellt sind die Zellen in Agar der Zelllinie DU145, die eine besonders intensive Färbung (+++) hatten.



Abbildung 14: Zusammenfassung der immunhistochemischen Färbung der Prostatakarzinome mit Anti-CxADR. Im Vergleich zwischen dem Tumorgewebe und den Zellen in Agar fällt das Ergebnis der Tumore deutlich schlechter aus. Bei der Zelllinie PC3 konnte CAR nicht nachgewiesen werden.

4.1.8. Färbung der klinischen Fälle

Für den klinischen Teil dieser Arbeit wurden Nasopharynxkarzinome von 41 Patienten mit unterschiedlichem Grad der Erkrankung untersucht. Es lagen 14 Patienten mit dem histologischen Grad G1, 5 mit G2, 7 mit G3, 14 mit G4 sowie ein Patient mit einer Hyperplasie ohne malignes Wachstum vor. Von einigen der Patienten standen außerdem mehrere in Paraffin eingebettete Tumorresektate zur Verfügung. Das Präparat mit der Diagnose einer Hyperplasie (n=1) in der Mundhöhle zeigte ein schwaches Färbeergebnis wobei alle Tumorzellen den Rezeptor exprimierten (100 %, (+)). Von den G1 Präparaten (Präparatanzahl n=29, Fallanzahl n=14) waren acht negativ, 11 wiesen eine Färbung von (+) \rightarrow + und von 10 % - 40 % auf, 10 waren stark angefärbt ((+) \rightarrow ++, 50 % - 100%). Von den mäßig differenzierten Nasopharynxkarzinomen (n=4) waren vier nicht angefärbt, eines zeigte eine schwache Färbung (5 % - 30 %, +) und vier waren vermehrt angefärbt (70 % - 100 %, (+) \rightarrow +). Bei schlechterer Differenzierung (n=6), also dem Grad 3, konnte bei vier Karzinomen keine Färbung festgestellt werden, drei zeigten eine schwache Färbung und ebenfalls drei eine stärkere. Bei den undifferenzierten Nasopharynxkarzinomen, zu denen auch das lymphoepitheliale Karzinom (Schmincke Tumor) zählt (n=14), waren zehn der insgesamt 25 Präparate negativ, acht konnten wenig angefärbt werden, sechs und damit ein Viertel zeigten eine stärkere Färbung. Die Färbung der klinischen Fälle zeigt also, dass die Färbung von humanem Gewebe ebenfalls funktioniert und der Rezeptor auf den Nasopharynxkarzinomen nachgewiesen werden kann. Dabei lässt sich anhand der Diagramme eindeutig erkennen, dass der Anteil der Präparate, bei denen die meiste Immunreaktivität festgestellt werden konnte bei Stadium G1 vorlag. Den höchsten Anteil der stärker positiv gefärbten Schnitte dokumentierten die mäßig differenzierten Nasopharynxkarzinome, im Verlauf der Entdifferenzierung nimmt auch die höhere Expression von CAR ab (G2 = 44,44%, G3 = 30,0%, G4 = 25,0 %). Die Färbung zeigte außerdem, dass auch innerhalb der Präparate, die von einem Patienten stammten, unterschiedliche Färbeergebnisse erzielt werden können. So zeigte das Gewebe eines Patienten mit einem anaplastischen Karzinom von dem 7 verschiedene Präparate ausgewertet werden konnten, von einem negativen Tumorausschnitt, über wenig positive Bereiche (20 % - 40 %, (+) \rightarrow +), bis hin zu 80 % angefärbten Zellen mit einer Intensität von (+) so gut wie alle Abstufungen der CAR-Expression.

Auch in gesundem Gewebe konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Besonders auffällig waren dabei die starke Färbung des Stratum basale des Epithels sowie die Färbung der serösen Azini und Streifenstücke in den mit angeschnittenen Speicheldrüsen, die sich durch ihre ausgeprägten Zellkontakte auszeichnen.



Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung der humanen Nasopharynxkarzinome mit Anti-CxADR. Abbildung a zeigt das Resektat eines soliden Karzinoms des Grades 1 mit einer 80 %igen Färbung und der Intensität ++. In der 40-fachen Vergrößerung (b) lassen sich die Zellgrenzen durch die Färbung, die sich linienförmig durch die Zellen zieht, gut von den Zellkernen mit den deutlich prominenten Nucleoli unterscheiden. Abbildung c lässt ein schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx erkennen. Die intensive Färbung mit ++ ist auch auf der höheren Vergrößerung (d) gut sichtbar. Etwa 70 % des Tumors waren in diesem Maße angefärbt. Die auf Abbildung e dargestellte Lymphknotenklappe stammt aus einem Präparat einer Kieferwinkelmetastase eines soliden Karzinoms des Grades 2. Im Lumen sind die schwach angefärbten Tumorzellen erkennbar, die auch das Bindegewebe des Lymphgefäßes schon durchsetzt haben. Abbildung f zeigt eine Gl. Submandibularis, die Bestandteil des Präparates eines mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinoms war. Im Bereich der serösen Azini (1) sind viele der Zellen positiv, die mukösen tubulären Endstücke (2) zeigen hingegen keine Färbung. Die Färbung im Streifenstück (\rightarrow) ist deutlich feiner, sodass bei genauer Betrachtung die Zellgrenzen erkennbar sind.



Abbildung 16: Zusammenfassung der Färbeergebnisse der Nasopharynxkarzinome mit Anti-CxADR, es wurde nach den verschiedenen Tumorgraden differenziert. Die Auswertung wurde mit den Parametern Intensität $(+) \rightarrow +++$ und prozentualen Anteil (0 %- - 100 %) vorgenommen und die Ergebnisse in drei Kategorien zusammen gefasst: negativ = 0 %, schwach positiv = 10 % - 40 %, $(+) \rightarrow +$, stärker positiv = 50 % - 100 %, $(+) \rightarrow +++$. Der Anteil der Präparate die negativ waren ist bei den mäßig bis zu undifferenzierten Karzinomen in etwa gleichgeblieben. Hingegen nimmt der Teil der Tumore mit vielen Anteilen positiver Färbung mit der Entdifferenzierung ab.

4.2. Ergebnisse der Infektion der kleinzelligen Bronchialkarzinom Zelllinien mit dem Virus Ad-GFP

Dieser Versuch diente der Simulation der Infektion des Tumors mit einem onkolytischen Virus. Da die kleinzelligen Bronchialkarzinome insgesamt das beste Färbeergebnis aufwiesen und sich damit auf eine ausgeprägte Expression von CAR schließen ließ, wurden diese fünf Zelllinien in Kultur genommen und mit einem GFP-markierten Virus infiziert. Die Zahl der infizierten Zellen, sowie die Gesamtzahl wurden nach 24, 48 und 72 Stunden mit dem FACS bestimmt. Dabei wurden jeweils 3 Messungen vorgenommen, aus denen dann der Mittelwert gebildet wurde. Die Ergebnisse des FACS-Gerätes werden in Prozent angegeben. Zusätzlich wurden die Prozentwerte in absolute Zellzahlen umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien herzustellen. Außerdem wurde der Versuch in zwei Varianten durchgeführt. Während bei dem ersten Versuch das Virus bis zum jeweiligen Messzeitpunkt auf den Zellen belassen wurde und die Inkubationszeit nur durch Hinzugabe von Vollmedium nach 1,5 Stunden begrenzt war, wurde im zweiten Versuch die Inkubation durch Absaugen des Mediums mit dem enthaltenen Virus gestoppt. Bei beiden Versuchen wurde mit einer Zellzahl von 3 x 10⁵ begonnen. Nach 24 Stunden ergaben sich im ersten Versuch für H69 7,4 %, für H82 6,3 %, für OH1 3,2 %, für OH3 14,7 % und für SW2 3,6 % infizierte Zellen. Zum zweiten Messzeitpunkt erhöhten sich alle Prozentzahlen mit Ausnahme der Zelllinie H82 die nur einen Wert von 5,8 % dokumentierte (H69: 22,5 %, OH1: 14,7 %, OH3: 33,4 % SW2: 12 %). Nach 72 Stunden konnte nur noch bei OH1 eine Steigerung festgestellt werden (H69: 21,4 %, H82: 5,6 %, OH1: 16,0 %, OH3: 32,4 %, SW2: 9,4 %). Deutlich niedriger erwiesen sich die Werte im zweiten Versuchsansatz (24 Stunden: H69: 2,3 %, H82: 0,7 %, OH1: 1,9 %, OH3 10,1 %, SW2: 2,1 %; 48 Stunden: H69: 3,8 %, H82: 0.9 %, OH1 8,3 %, OH3 12,7 %, SW2: 4,5 %; 72 Stunden: H69: 2,0 %, H82: 0,1 %, OH1: 4,1 %, OH3: 3,7 %, SW2: 1,8 %). Die Zelllinien H69 und OH3 zeigten in beiden Versuchen die geringste Vermehrungsgeschwindigkeit (Vermehrung um den Faktor 2,20 für H69 und 1,99 für OH3 nach 72 Stunden), dies war vor allem im ersten Versuch deutlich, in dem die anderen drei Zelllinien eine lineare Wachstumsrate aufwiesen. Im Vergleich zu dem zweiten Versuchsansatz war die Wachstumsgeschwindigkeit insgesamt langsamer, so dass die Zellzahlen der Werte nach 24 und 72 Stunden im Durchschnitt um das Dreifache bzw. das Vierfache höher lagen. Nur bei dem 48 Stunden Wert entsprach sich die Anzahl der Zellen. Auffällig ist, dass der Verlauf der Gerade der infizierten Zellen dem der Gesamtzellzahl entspricht. So weisen die Zelllinien H69 und OH3 ein Maximum nach 48 Stunden auf,

während OH1, H82 und SW2 eher einen linearen Anstieg der infizierten Zellen darlegen. Deutlich gezeigt werden konnte, dass OH1 die Zelllinie mit dem größten Infektionspotential ist. OH3 hingegen stellte sich als die Zelllinie heraus, die prozentual zu ihrer Gesamtzellzahl, über die meisten Zellen mit fluoreszierenden Eigenschaften verfügte. Auch im zweiten Versuch konnte eine Parallelität zwischen den Gesamtzellzahlen und den Zahlen der infizierten Zellen gezeigt werden, so dass der 48-Stunden-Wert von einem linearen Verlauf abwich und zum Teil sogar ein Minimum dokumentierte. Während die Gesamtzellzahl im zweiten Versuch deutlich höher lag, wiesen die Zahlen der infizierten Zellen teilweise deutlich niedrigere Werte auf. Der Virus konnte bei den Zelllinien H82 und SW2 nach 72 Stunden nur etwa die Hälfte der Zellen im Vergleich zum ersten Versuch infizieren, bei H69 waren die fluoreszierenden Zellen sogar um das Vierfache verringert. OH1 und OH3 zeigten im Gegensatz dazu ganz ähnliche Werte, wobei bemerkenswert ist, dass sowohl im ersten als auch im zweiten Versuch die Zahl der infizierten Zellen nach 72 Stunden bei der Zelllinie OH1 die anfangs eingesetzte Zellzahl überschritten hat (Versuch 1: 383147; Versuch 2: 410000).



Abbildung 17: FACS-Ergebnisse nach Infektion der Zelllinien H69, H82, OH1, OH3 und SW2 nach Infektion mit dem Virus Ad-GFP. Die Säule mit der Beschriftung 1 stellt den ersten Versuch mit Belassen der Viruslösung auf den Zellen über den Versuchszeitraum, die Säule 2 den zweiten Versuch mit einer Inkubationszeit von ausschließlich 1,5 Stunden dar. Bei allen fünf Zelllinien lagen die Prozentzahlen im ersten Versuch deutlich höher, als im Zweiten. Durch das Wachstum der nicht-infizierten Zellen sind die 72h-Werte vor allem im zweiten Versuch niedriger, obwohl mehr Zellen fluoreszierten (Vergleich: Abbildung 18).

Es wurden also mehr Zellen infiziert, als ursprünglich ausgesät. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass es zwischen den Zelllinien große Unterschiede in dem Wachstumsverhalten und der Infizierbarkeit der Zellen gibt, wobei der Faktor der Wachstumsrate keinen eindeutigen Einfluss auf die Infizierbarkeit nimmt. H82 lässt sich beispielsweise schlecht infizieren, zeigt aber eine hohe Wachstumsrate, während OH3 sich nur langsam vermehrt, dafür aber gut infizierbarkeit aufweist. Außerdem scheint das Verbleiben der Viruslösung auf den Zellen auf der einen Seite das Wachstum zu behindern, auf der Anderen scheint die dauerhafte Anwesenheit des Virus die Möglichkeit einer Infektion bei den schlecht infizierbaren Zelllinien (H82, SW2, H69) zu erhöhen.



Abbildung 18: Graphische Darstellung der Zellzahlen der Zelllinien H69, H82, OH1, OH3 und SW2. Die Werte wurden aus den FACS-Ergebnissen nach 24, 48 und 72 Stunden für Versuch 1 und Versuch 2 errechnet. Gegenübergestellt sind die absoluten Zellzahlen auf der rechten Seite denen der mit Ad-GFP-Viren infizierten Zellen, die vom FACS durch ihre Fluoreszenz erkannt wurden (linke Seite).

4.3. Ergebnisse der FACS-Färbung der mit TSA vorbehandelten humanen Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome

Da bekannt ist, dass iHDACs sowohl eine therapeutische als auch eine zytotoxische Wirkung besitzen, wurde mit zwei verschiedenen TSA Konzentrationen (1 µM und 10 nM) gearbeitet. Wie groß der zytotoxische Einfluss auf die Zellen ist soll anhand der Vitalität festgestellt werden. Außerdem wurden unbehandelte Zellen der Färbung unterzogen und mit der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht. Dabei konnte festgestellt werden, dass CAR auch mit dem FACS nachweisbar ist und alle eingesetzten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien den Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, obgleich die Expression zwischen den Zelllinien differierte. OH1 zeigte hierbei die höchsten Werte (7,44), gefolgt von OH3 (7,38) und SW2 (7,15) (H69: 3,5, H82: 5,75). Von den angegebenen Werten wurde der für jede Zelllinie der individuell bestimmte Wert der Isokontrolle subtrahiert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TSA die Expression von CAR erhöht. Es wurden Werte bis zu 18,08 erreicht (H82, 10 nM). H69 wies eine Steigerung von 3,5 zu 6,475 (1 µM)/ 7,76 (10 nM), H82 von 5,75 zu 14,74 (1 µM)/ 18,08 (10 nM), OH1 von 7,44 zu 8,53 (1 µM)/ 10,83 (10 nM), OH3 von 7,38 zu 9,45 (1 µM)/ 10,72 (10 nM) und SW2 von 7,15 zu 8,90 (1 µM)/ 9,39 (10 nM) auf. Durchschnittlich war der Effekt der Steigerung bei einer Vorbehandlung von 10 nM TSA also stärker und muss bei jeder einzelnen Zelllinie eigenständig betrachtet werden.

Obwohl die Expression von CAR bei OH1 schon sehr stark ausgeprägt war, konnte trotzdem noch eine Erhöhung um 50,9 % erzielt werden. Auch bei der Zelllinie mit der geringsten Expression, H69, wurde die Darstellung des Rezeptors um 134,66% angehoben. Die höchste Steigerung wurde allerdings bei H82 um 214,6 % festgestellt. Somit konnte bei allen Zelllinien eine Erhöhung des Zelloberflächenmoleküls CAR erzielt werden und bei den beiden Zelllinien, die eine geringere CAR Expression in der FACS Färbung aufwiesen wurde eine Steigerung um mehr als das Doppelte (134,66 %) bei H69 und um mehr als das Dreifache (214,60 %) bei H82 erzielt.



Abbildung 19: FACS-Ergebnisse der SCLC Zelllinien nach Behandlung mit TSA. Der obere Graph zeigt die Absolutwerte der fünf Zelllinien der Färbung der unbehandelten Zellen (CAR), nach Stimulation mit 1 µM und 10 nM TSA im Vergleich. Unten ist ausgehend von den Werten der CAR Expression der unbehandelten Zellen die errechnete prozentuale Steigerung dargestellt. Bei allen Zelllinien konnte eine Steigerung durch die Behandlung mit TSA festgestellt werden, die bei allen Zelllinien bei 10 nM stärker ausfiel.

4.3.1. Ergebnisse der Zellzahl und –vitalität nach 24 Stunden mit TSA-Behandlung

Bei allen eingesetzten Zelllinien wurde vor Versuchsbeginn darauf geachtet, dass sich die Zellen in einem guten Zustand befanden, also die Vitalität über 85 % lag. Wie man anhand des Diagramms erkennen kann (Abbildung 20), hat die Behandlung mit TSA in der Konzentration 10 nM nach 24 Stunden nur wenig Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen gehabt. So liegt die Vitalität bei der Zelllinien H69 durchschnittlich bei 87,51 %, bei H82 bei 87,30 %, bei OH1 bei 89,52 %, bei OH3 bei 89,42 % und bei SW2 mit dem geringsten Wert bei 83,65 %. Angesichts des schlechteren Ergebnisses der Zelllinie SW2 lässt sich ein negativer Einfluss von TSA auf die Vitalität vermuten, dieser wird verdeutlicht, wenn man die Prozentzahlen der Zellen nach der Behandlung mit der höheren Konzentration betrachtet. Diese liegen durchschnittlich 10,6 % unter den oben genannten Vitalitätswerten (Ø 10,49), besonders hervor zu heben ist dabei der Wert von SW2 mit nur 67,45 %. Hingegen zeigen die Zellzahlen kein so einheitliches Ergebnis. Die Zahlen schwanken von $6,28 \ge 10^6$ der Zelllinie OH1 (10 nM TSA) bis zu 3,49 x 10⁶ Zellen von H82 bei 1 µM. Zwischen den Zelllinien schwanken nicht nur die Zellzahlen erheblich, sondern auch der Einfluss der TSA-Konzentration auf die Überlebensrate. Obwohl bei allen Zelllinien eine Vermehrung der Zellen festgestellt werden konnte, fiel die Zunahme der Zellen der Zellinien H82, OH1 und SW2 bei 10 nM größer aus, während bei OH3 und H69 die 1 µM Konzentration TSA einen positiveren Effekt zu haben schien. Der in der Literatur beschriebene apoptotische Effekt von TSA lässt sich hiermit also nicht widerlegen (Zhu et al., 2001).



Abbildung 20: Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur Vitalität und Zellzahl der Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome in Folge der Behandlung mit TSA nach der Inkubationszeit von 24 Stunden. In dem Diagramm für die Vitalität ist ein negativer Effekt der höheren Konzentration des TSA auf die Zellen erkennbar.

V. Diskussion

Trotz Fortschritten in der molekularen Medizin ist die Sterblichkeit an bösartigen soliden Tumoren in den letzten Jahrzehnten nahezu gleich geblieben. Dieser Mangel an Therapiefortschritt ist dadurch bedingt, dass die Tumoren nicht mehr erfolgreich systemisch behandelt werden können, wenn sie metastasiert haben. Deshalb ist es dringend erforderlich, neue Therapieoptionen zu entwickeln. Eine solche neue Möglichkeit der systemischen Therapie könnte die Behandlung mit onkolytischen Adenoviren darstellen. Voraussetzung für eine Therapie mit diesen Viren ist, dass sie an die Tumorzellen binden und in diese internalisiert werden. Diese Bindung wird von zellulärer Seite aus von dem Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR) vermittelt. Seine Anwesenheit auf den (Tumor-) Zellen ist Voraussetzung für die onkolytische Therapie mit Adenoviren. Der Nutzen und die Wirksamkeit dieser Therapien hängen damit von der adenoviralen Infektion und somit von dem Expressionslevel von CAR als limitierendem Faktor ab. So konnte gezeigt werden, dass ein niedriger Level von CAR die therapeutische Effizienz von rekombinanten adenoviralen Vektoren herabsetzt (Kim et al. 2002) und eine enge Beziehung zwischen der CAR Expression und Effizienz des Adenovirus in der Therapie besteht (Ai Zheng, 2005). Allerdings stellte schon Bergelson et al. (1998) fest, dass die Expressionslevel hoch variabel sind und besonders in Karzinomzellen eine geringe Ausprägung von CAR zu einer Resistenz gegen die adenovirale Infektion führen kann (Matsumoto et al., 2005, Graat et al., 2005, Li et al., 1999).

Generelles Ziel dieser Arbeit ist es, CAR auf Tumorzellen nachzuweisen und Möglichkeiten zur Steigerung seiner Expression zu finden. Der Level der CAR Expression ist bei den meisten Tumoren noch nicht untersucht worden, dies trifft besonders auf Xenografttumore zu. Diese sind besonders deshalb von Interesse, da an ihnen präklinische Untersuchungen durchgeführt werden können, die nötig sind, ehe Untersuchungen am Menschen durchgeführt werden. Deshalb sollte als ein Teil der Arbeit die CAR Expression in Xenografttumoren von kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Neuroblastomen, Mamma-, Ovarial-, Pankreas-, Kolonund Prostatakarzinomen untersucht werden. Zusätzlich sollte klinisches Material von Nasopharynxkarzinomen mittels Immunhistochemie auf die CAR Expression untersucht werden. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Expression hoch variabel ist (Gu et al., 2004, Marsee et al., 2005) und nicht nur zwischen den einzelnen Tumorentitäten, sondern auch zwischen den verschiedenen Zelllinien der gleichen Tumorentität variiert. Weiterhin gab es lokale Unterschiede der CAR Expression innerhalb eines Tumors und innerhalb der Entwicklungsstadien einer Tumorentität.

Hervorzuheben ist die generell gute CAR Expression in den SCLC Zellen. So konnte bei den SCLC-Zellen in allen Zelllinien ein positives Färbeergebnis erzielt werden, welches durchschnittlich in den Zellen in Agar intensiver ausfiel als im Gewebe des Primärtumors. Die Neuroblastome zeigten im Vergleich dazu eine deutlich schlechtere Anfärbbarkeit, da nur zwei der vier Zelllinien eine CAR Expression aufwiesen. Für die Ovarialkarzinome konnte für die Zelllinie OVCAR3 eine intensive positive Reaktion dargestellt werden. Dieses Ergebnis in der Immunhistochemie deckt sich mit den Ergebnissen zur klinischen Relevanz des CAR in epithelialen Ovarialkarzinomen von Reimer et al. (2007), in denen mittels realtime PCR (RT-PCR) ein hohes Level aller vier Isoformen von CAR für OVCAR3 gefunden wurde. Während der Nachweis von CAR auf mRNA-Ebene von Reimers et al. (2007) nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Arbeit die Expression auf Proteinebene bestätigt. Ebenfalls verschiedenen konnte eine Heterogenität zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien bestätigt werden, obwohl alle drei den Rezeptor aufwiesen, waren die Zellen in Agar sowie der Primärtumor der Zelllinie OC2 prozentual in der Anfärbbarkeit den beiden anderen deutlich unterlegen.

Auch bei den Mammakarzinomen war eine solche Heterogenität erkennbar, denn jede Zelllinie zeigte einen anderen Ausprägungsgrad an CAR Expression. Während T47D ein deutliches positives Ergebnis von ++/40 % in den Zellpellets und +/60 % in den Primärtumoren aufwies, zeigte DU4475 nur in den Zellen in Agar eine schwache Färbung (+/30 %) und MCF7 besaß weder in den Zellen aus der Zellkultur noch im Primärtumor eine CAR Färbung. Gründe für dieses Expressionsverhalten könnten zum einen die Differenzierung des Tumors sein, da es eine Korrelation zwischen einem hohen Expressionslevel und guter Differenzierung zu geben scheint. Ein weiterer Grund könnte die Östrogenempfindlichkeit sein, die ebenfalls mit einer hohen CAR-Expression in Beziehung stehen soll (Auer et al. 2008). Bei Betrachtung der Färbeergebnisse der Prostata- und Pankreaskarzinome wird ein Befund besonders deutlich, der sich mit Ausnahme der Kolonkarzinome in allen Färbungen wieder finden lässt. Hier zeigte sich nämlich, dass die Zellen in Agar häufiger eine CAR-Expression aufweisen als die Zellen im Primärtumor in der Maus und die Färbungen meistens prozentual, sowie von der Farbintensität im Vergleich zu dem dazu gehörigen Primärtumorgewebe stärker ausgeprägt sind. Diese Beobachtung lässt sich zum einen durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Zellen in der Zellkultur, im Gegensatz zu denen in vivo im Tier erklären. Während sich das Wachstum in

der Zellkultur auf die zweidimensionale (2D) Ebene beschränkt, liegt in der Maus ein dreidimensionales (3D) Wachstum vor. Ferner spielen im Xenograft-Modell auch Zell-Matrix Kontakte eine Rolle, da die Tumorzellen mit dem Stroma der Maus interagieren. Epitheliale Gewebe, die eine Zellpolarität besitzen und neben den Interzellularkontakten auch von der Basalmembran begrenzt werden, können diese Strukturen im Laufe der Karzinogenese verlieren. Ein biologischer Prozess, der als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird, führt zu einer Ausprägung eines mesenchymalen Phänotypus der ursprünglichen Epithelzellen, der als Folge den Verlust ihrer epithelialen Komponenten und der Zellpolarität hat (Ozdamar et al., 2005). Die fibroblastenähnliche Morphologie führt auch zu einer Herunterregulierung epithelialer Marker wie dem E-Cadherin und anderer tight junction Proteine (Ikenouchi et al., 2003), sowie zu einer erhöhten Expression des filamentären Proteins Vimentin (Frederick et al., 2007). Da CAR eine Verbindung zu tight junctions zu geschrieben wird (Coyne und Bergelson, 2005) kann vermutet werden, dass auch sein Expressionslevel im Zusammenhang mit der EMT steht. Dieser Prozess führt nicht nur zu einem erhöhten Migrationspotential, sondern auch zu einer vermehrten Invasivität, Apoptoseresistenz und vermehrten Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix (Kalluri und Neilson, 2003). Wenn man also davon ausgeht, dass die meisten Tumorzelllinien CAR exprimieren und diese Funktion während der Gewebebesiedelung und Progression verlieren, könnte dies also mit der Transition zu Mesenchymzellen in Verbindung stehen. Wie schon bei den Mammakarzinomen beschrieben, wurde auch für die Prostatakarzinome eine höhere Expression bei gut differenzierten Tumoren festgestellt. Wobei normales Prostatagewebe die besten Färbeergebnisse aufwies und eine Abnahme von Intensität und Prozent mit dem Grad der Entdifferenzierung beobachtet werden konnte. Die jeweiligen Knochen-, Leber- und Lymphknotenmetastasen waren hingegen alle positiv (Rauen et al., 2002). Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit für die kleinzelligen Bronchialkarzinome und Nasopharynxkarzinome ermittelt wurden. Während die Zellen in Agar der SCLC Zelllinien durchschnittlich intensiver positiv gefärbt waren, schien CAR im Primärtumor herunter reguliert und in den Metastasen wieder reexprimiert zu werden. Auffällig war dabei auch, dass die Zelllinien, die das höchste Metastasierungspotential hatten (OH1 und H69) im Primärtumorgewebe auch das kräftigste Färberergebnis zeigten.

Auch das Expressionslevel der klinischen Fälle konnte mit der Immunhistochemie bestimmt werden. Die Beobachtungen decken sich mit denen voraus gegangener Ergebnisse. Die Nasopharynxkarzinome wurden nach ihrem Differenzierungsgrad beurteilt. Es fiel auf, dass der prozentuale Teil der Karzinome, die negativ waren, bei den G1-Tumoren am geringsten war, und der Anteil der Präparate, die eine ausgeprägte Färbung zeigten (50 % - 100 %, (+) \rightarrow +++) mit Zunahme der Entdifferenzierung abnahm. Die Beobachtungen, dass der Grad der Differenzierung von Bedeutung für die CAR Expression ist, deckt sich mit den Ergebnissen, die Anders et al. (2009) zu dem Verlust von CAR in Magenkarzinomen gefunden hat. Hierdurch könnten sich Schlüsse auf eine erhöhte Proliferation, Migration, Invasion und letztendlich auf die Prognose des Erkrankten ziehen lassen durch den CAR Verluste an der Zelloberfläche.

Seit 1990 werden vor allem in China klinische Phase I bis III Studien mit onkolytischen Viren wie dem H101 angefertigt, die zeigen, dass das Virus gut verträglich und effizient in Verbindung mit Chemotherapie ist (Yu und Fang 2007). Das Expressionslevel von CAR in Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (SCCHN) ist noch nicht klar bestimmt worden. Lee und seine Kollegen (2002) konnten eine gute Korrelation zwischen der Effizienz der Transfektion und dem CAR-Level in SCCHN-Zelllinien feststellen. Außerdem zeigten sie anhand von gefrorenen Biopsien, dass das gesunde Gewebe mehr CAR exprimierte als das Tumorgewebe. Mit den 41 Patientenfällen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, können diese Ergebnisse bestätigt und erweitert werden. So wurde gezeigt, dass das gesunde Gewebe eine starke Färbung mit typischer Lokalisation aufweist (Abbildung 14 f) und, dass das Präparat mit der Hyperplasie vollständig angefärbt war, woraus man schließen könnte, dass die dysplastischen Zellen den Rezeptor grundsätzlich exprimieren, diese Funktion aber während der weiteren Tumorprogression verlieren. CAR konnte in vielen Nasopharynxkarzinomen nachgewiesen werden, häufig allerdings nur schwach. Die CAR-Expression scheint auch bei diesen Tumoren mit dem Grad der Differenzierung zu korrelieren, auch wenn die Expression innerhalb der Tumorart und auch innerhalb des Tumors aus selbst einem Patienten heterogen ausfallen kann. Für eine Herunterregulierung im Primärtumor spricht außerdem, dass CAR in den Metastasen wieder nachweisbar war (Abbildung 14 e). Diese Ergebnisse decken sich auch mit denen von Jee et al. (2002), die außerdem eine deutlich stärkere Färbung in normalem SCCHN-, als in dem Tumorgewebe fanden. Auch dieses Expressionsverhalten von CAR könnte sich über die Regulierungsmechanismen während der EMT erklären lassen, wobei in diesem Zusammenhang von einer reversiblen EMT gesprochen werden muss, denn eine CAR Reexpression in den Metastasen müsste durch eine mesenchymale epitheliale Transition (MET) bedingt sein. Als Schlussfolgerung kann daraus gezogen werden, dass die Effizienz der Therapie mit Adenoviren für Nasopharynxkarzinome vom Grad der Differenzierung abhängt und diese Ergebnisse zur Selektion der Patienten, für die diese Therapie geeignet

scheint, herangezogen werden könnte, oder eine Evaluation des CAR-Levels vor der Behandlung stattfinden sollte.

Die Färbeergebnisse lassen auch weitere Schlüsse auf die Funktion und Regulation von CAR zu, über die bisher wenig bekannt sind. Ihm wird auf Grund seiner Lokalisation an basolateralen Zelladhäsionen und an tight junctions eine Funktion in der Formation und Stabilisierung der Zell zu Zell Kontakte zu geschrieben (Cohen et al., 2001). Brüning und Runnebaum (2004) erweitern diesen Aspekt, basierend auf ihren Forschungsergebnissen zu der CAR Expression in Ovarial- und Zervixkarzinomen und schreiben CAR eine wichtige Rolle im Invasions- und Metastasierungsprozess zu. Dabei konnten sie in einer humanen Ovarial- und einer Zervixkarzinomzelllinien feststellen, dass ein niedriger CAR-Level zu einem erhöhtem Migrationspotential führte. In den immunhistochemischen Färbungen fast aller Tumore konnte die Lokalisation auf der Zellmembran gezeigt werden. Dabei waren die Färbungen im Tumorgewebe meisten fleckenhaft oder inselartig verteilt und nicht homogen im gesamten Präparat vorhanden. Auch in dem gesunden Mausgewebe konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Zum einen im Pankreas an den Azini, bei denen die Zellpolarität durch tight junctions vermittelt wird, die den funktionellen Bereich der Zellmembran in einen apikalen und basolateralen Anteil teilen, zum anderen waren die enteroendokrinen Zellen des Darms angefärbt. Im humanen Gewebe fiel vor allem die Färbung der Glandula submandibularis auf. Die serösen Azini zeigten eine sehr intensive Färbung, deren Lokalisation auf Grund der Intensität nicht mehr erkennbar war. Hingegen konnte bei den Streifenstücken der membranöse Sitz des Rezeptors erkannt werden. All diese Anfärbungen lassen auf eine Verbindung mit tight junctions schließen. Auch die These zur Beteiligung von CAR am Invasions- und Migrationsprozess konnte durch die Färbungen bekräftigt werden, Färbungen der SCLC-Zelllinien, denn sowohl bei den als auch bei den Nasopharynxkarzinomen wurde eine Herunterregulierung im Tumor und eine Reexpression in den Metastasen gefunden. Besonders veranschaulicht werden kann dies durch die kleinzelligen Bronchialkarzinome, denn obwohl viele der Tumore ein gutes Färbeergebnis aufwiesen, waren die dazugehörigen Primärtumore, die als Ausgang der Metastasen angesehen werden, deutlich schwächer angefärbt als die spontan Metastasen. Dies unterstützt die These, dass ein niedriger CAR-Level zu einem erhöhtem Migrationspotential führt. Bemerkenswert ist außerdem, dass die Zellinien der SCLC, die das höchste Metastasierungspotential hatten (OH1 und H69) in den Zellen in Agar auch CAR am meisten exprimierten. Dies widerspricht den Ergebnissen von Brüning und Runnebaum (2004), würde aber die These unterstützen, dass nur Zelllinien, die den Rezeptor in der Zellkultur

exprimieren ihn während der Tumorprogression herunter regulieren können und somit in der Lage sind ihn bei invasivem Wachstum und dem hämatogenen oder lymphogenen Auswandern wieder zu reexprimieren. Bei einem Vergleich ist allerdings auch die Gewebeart zu berücksichtigen, da es sich hierbei nicht um die Beobachtung an Ovarial- oder Zervixkarzinomzellen handelt, sondern um Primärtumoren aus der Lunge, deren CAR Expression im folgenden Absatz diskutiert wird. Hinzu kommt, dass CAR mit Integrinen assoziiert ist, die bei der Metastasierungskaskade eine Rolle bei der Deadhäsion während der Streuung und Adhäsion in den Lymphgefäßen oder dem neuem Gewebe spielen. CAR zeigt damit Parallelen zu dem Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin auf, dem schon seit längerem eine bedeutende Rolle im Prozess der Metastasierung zugeschrieben wird. Es gilt als prognostischer Faktor, denn der Verlust des hauptsächlich in den Epithelien lokalisierten Proteins führt zur Metastasierung, da unter den Tumorzellen untereinander keine effektive Zelladhäsion mehr stattfindet. Zu den Funktionen der Cadherin-Superfamilie zählt neben der Stabilisation von Zell-Zell Kontakten auch die Erhaltung der Zellpolarität. Für das E-Cadherin wurde die Verbindung zwischen dem Verlust seiner Expression in Krebszellen und der EMT schon bestätigt (Cano et al., 2000) und ein Zusammenhang zwischen dem metastatischen Potential und der E-Cadherin Aktivität gefunden (Birchmeier und Behrens 1994). Außerdem wurde eine inverse Korrelation zwischen dem E-Cadherin Level und der Überlebensrate nachgewiesen (Zhou et al., 2002). Auch eine Beteiligung an der embryonalen Morphogenese wird Mitgliedern der Cadherin-Superfamilie zugeschrieben (Angst, 2001). Dies entspricht den Beobachtungen, die Noutsias et al. (2001) von CAR in neonatalen Kardiomyozyten gemacht hat. Anhand der Lokalisation an den Kontaktstellen zwischen Kardiomyozyten, als auch zu Zellen, die nicht zum Herzgewebe gehörten, schloss er auf eine biologische Funktion von CAR, die während der Embryogenese des Herzen seine Formierung unterstützt und stabilisiert. Die EMT ist ebenfalls Teil der Embryogenese und Organentwicklung und kann nach Kalluri und Weinberg (2009) als Typ 1 EMT bezeichnet werden. Das Fehlen des Rezeptors in adultem, gesundem Gewebe spräche dafür, dass CAR in diesem stabilen Zustand nicht benötigt wird, allerdings wieder hochreguliert werden kann, wenn z. B. bei einer Herzerkrankung die Wiederherstellung der Zell-Zell Kontakte notwendig ist. Auch hierfür wird der Prozess der Transition von epithelialen Zellen in mesenchymale benötigt und als Typ 2 EMT in Verbindung mit Wundheilung und Geweberegeneration gebracht (Kalluri und Weinberg, 2009). Nicht nur die Parallelen zu dem Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, sondern auch die Funktionen von CAR sprechen für einen

engen Zusammenhang mit den Regulierungsmechanismen, denen die Zellen in der EMT zugrunde liegen.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum gerade in den kleinzelligen Bronchialkarzinomen die CAR-Expression höher ist, als in den anderen Geweben. Möglich als Erklärung wäre die Abstammung vom Epithel der Atemwege. Adenoviren verursachen 5-15 % aller Erkältungskrankheiten durch Interaktion mit CAR. Der Rezeptor ist dabei an der basolateralen Membran lokalisiert (Walters et al., 1999). Dem gegenüber stehen die Funktion des Rezeptors, bzw. die Folgen bei Verlust. Die Feststellung der hohen Expression in murinen SCLC aus humanen Zellinien wurde auch in humanem Gewebe bestätigt (Bao et al., 2009). In einigen Studien wurde beobachtet, dass bei einem hohen CAR-Level höhere Überlebensraten der Patienten vorlagen und eine Metastasierung in die Lunge vermindert war (Yamashita et al., 2007, Giaginis et al., 2008). Damit könnte CAR als prognostischer Faktor oder als Suppressor der Metastasierung gesehen werden. Widersprüchlich steht dem Ganzen nur gegenüber, dass die kleinzelligen Bronchialkarzinome sich durch ihre frühe systematische Streuung auszeichnen, die trotz ihres hohen CAR-Levels auftritt. Wobei hier eine Differenzierung getroffen werden könnte, denn ausgehend von der deutlich höheren Expression in der Zellkultur, scheint der Rezeptor im Primärtumor in der Maus schon herab reguliert zu sein. In Relation gesehen scheint also eine ebenso große Herabregulation von CAR statt zu finden, wie bei anderen Tumorentitäten beschrieben wurde. Die Überexpression von CAR in der Kultur gewachsener Zellen könnte damit eher für ein hohes Metastasierungspotential sprechen, da erst durch die Herunterregulierung von CAR im Xenograftumor ein Loslösen aus dem Tumorverband ermöglicht wird und eine Reexpression zu einer schnellen Vermittlung der Zell-Zell Kontakte bei der Invasion in das Gewebe führen könnte. Für eine Rolle als prognostischer Faktor würde auch die vermehrte Expression in den gut differenzierten Nasopharynxkarzinomen sprechen, die durch ihr solides Wachstum gekennzeichnet waren.

Als Konsequenz aus den Färbeergebnissen kann außerdem geschlossen werden, dass nur sehr wenige Tumore geeignet wären, um CAR als therapeutisches Target nutzen zu können. Zu diesen zählt der SCLC, welcher nach diesen Befunden CAR exprimiert. Für das SCLC eröffnet dies gerade wegen der geringen Überlebenszeiten nach der Diagnose eine neue Möglichkeit der Therapie. Um die Effektivität einer Infektion der SCLC-Zelllinien zu untersuchen, wurde der Versuch mit dem Ad-GFP Virus durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches lassen darauf schließen, dass die Infektion mit Ad-GFP funktioniert, allerdings ist eine hohe Viruskonzentration notwendig (verwendete moi = 20). Die Infizierbarkeit scheint

mit den Färbeergebnissen übereinzustimmen und reproduzierbar zu sein, denn in beiden Versuchen stellte sich OH1 als die Zelllinie mit der größten Anzahl an infizierten Zellen heraus. Für die Auswertung der Ergebnisse sind zwei Faktoren von großer Bedeutung. Zum einen, das unterschiedliche Wachstum der Zelllinien, zum anderen, das Verhalten der Zellen nach Virusinfektion. Wie man anhand der Gesamtzellzahl erkennen kann, liegt diese im zweiten Versuch bei allen Zelllinien durchschnittlich um den Faktor 4,02 höher als im ersten. Dies kann entweder auf die Wirkung des Virus zurück zu führen sein, oder aber auf das Medium, denn während im ersten Versuch 1 ml (bzw. 1,6 ml) Medium ohne FCS durch Vollmedium ergänzt wurden (66%), lag im zweiten Versuch 100 % Vollmedium vor, welches die Teilungsfähigkeit vermutlich positiv beeinflusst haben dürfte. Im zweiten Versuch wurden mit Ausnahme von OH1 auch weniger Zellen infiziert. Und auch hier gibt es mehrere Möglichkeiten der Erklärung. Das Belassen des Virus auf den Zellen kann zu einer Infektion auch nach der Inkubationszeit von 1,5 h geführt haben. Es ist nicht klar, wie stark der hemmende Einfluss das FCS auf das Virus ist, wobei dieser Versuchsansatz eher dem in vivo Modell gleicht, da im Tumor keine Möglichkeit besteht das Virus nach Injektion wieder zu entfernen. Andererseits kann auch das Wachstumsverhalten auf die Infizierbarkeit Einfluss genommen haben. Die Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome bilden in der Kultur als Suspensionszellen Zellgruppen, die sich mit Anstieg der Zellzahl vergrößern. Die Zellen, die sich im Inneren dieser Zellklumpen befinden haben also eine geringere Chance mit dem Virus infiziert zu werden, als die Zellen im äußeren Bereich. Zusätzlich besteht bei langsam wachsenden Zelllinien für alle Zellen eine höhere Wahrscheinlichkeit der Infektion, da durch das Wachstumsverhalten die Zellgruppen kleiner sind und sich damit mehr Zellen im äußeren Bereich befinden, die ihre Zellmembran als Angriffsfläche für eine Infektion dem Virus präsentieren. Umso bemerkenswerter ist es, dass die Zelllinie OH1 trotz der größten Wachstumsrate auch die höchste Zahl an infizierten Zellen besitzt. Damit lässt sich feststellen, dass trotz des unterschiedlichen Teilungsvermögens der einzelnen Zelllinien die Wachstumsrate keinen entscheidenden Einfluss auf die Infizierbarkeit nimmt. Vergleicht man beispielsweise die Zelllinie OH1 im Bezug auf das Zellwachstum und die Zellzahl der mit Ad-GFP Virus infizierten Zellen mit H82, kann man feststellen, dass beide Zelllinien eine hohe Wachstumsrate haben. Die von H82 liegt im ersten Versuch sogar höher als die von OH1 und trotzdem wurden von der Zelllinie OH1 um das 2,4-fache mehr Zellen infiziert. Als Erklärung lässt sich der Level der CAR Expression heranziehen, der, wie in der Immunhistochemie nachgewiesen wurde, bei OH1 am höchsten ausgeprägt ist. Hervorzuheben ist auch, dass bei den Zellen von OH1 mehr Zellen nach 72 h infiziert waren,

als anfänglich eingesetzt wurden. Im ersten Versuch bestand die Möglichkeit der nachträglichen Infektion. Diese Möglichkeit wurde aber im zweiten Ansatz eliminiert und trotzdem lag ein vergleichbares Ergebnis vor. Es stellt sich daher die Frage, ob sich infizierte Zellen teilen können und so das GFP im Zytoplasma die Tochterzelle ebenfalls mit fluoresziert oder, ob Zellen, die sich in der Inkubationszeit von 1,5 h geteilt haben mit infiziert werden konnten. Prozentual, sowie absolut anhand der Zellzahlen gesehen gab es Zelllinien, die schwieriger zu infizieren waren, dazu gehörten H69, H82 und SW2. Mit Belassen des Virus auf den Zellen konnten bessere Infektionsraten erzielt werden. Rückschlüsse aus den Versuchen, die mit den Zelllinien in der Zellkultur stattgefunden haben, lassen sich auch auf die Aggressivität des Wachstums ziehen. Hervorzuheben ist dabei besonders OH1, bei der die Kombination aus einer sehr hohen Teilungsrate (10.000.000 Zellen nach 72 h im 2. Versuch) und dem hohen CAR-Level in der Zellkultur, auf eine erhöhte Malignität durch das besondere Metastasierungspotential geschlossen werden könnte. Als Fazit dieses Versuchs lassen sich die vorausgegangenen Fragestellungen aber eindeutig beantworten, denn eine Infektion der SCLC-Zelllinien mit einem Adenovirus ist möglich und die Infizierbarkeit korreliert mit der CAR-Expression. Ähnliche Beobachtungen machten bereits Yuan und seine Kollegen (2005) mit klinischem Material aus einer klinischen Studie mit einem genetisch modifiziertem Adenovirus (H101). Dabei bestand nicht nur ein positiver Zusammenhang zwischen der CAR-Expression in der Immunhistochemie und der Infektionsrate, sondern auch zu dem Krankheitsverlauf der Patienten. Ein höherer CAR-Level korrelierte mit mehr Fällen der kompletten oder teilweisen Remission des Tumors. Würden sich diese Ergebnisse auf die kleinzelligen Bronchialkarzinome übertragen lassen, würde dies einen erfolgsversprechenden Therapieansatz darstellen, denn wie auch in den Färbeversuchen, ließen sich alle Zelllinien infizieren, wenn auch mit deutlichen Unterschieden in der Ausprägung. Die FACS-Ergebnisse verliefen in ihrer Aussage parallel zu denen der Immunhistochemie, da OH3, H69, und H82 in etwa auf einem Infektionsniveau bzw. prozentualem Färbeverhalten lagen und OH1 von allen Zelllinien in den beiden Analysen am stärksten gefärbt war. Als Ausnahme dieser Beobachtung muss SW2 gelten, da nach den Ergebnissen zur CAR Expression in der Immunhistochemie eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien geringere Infektion zu erwarten gewesen wäre. Jedoch lag die Zahl der infizierten Zellen trotz der Färbeergebnisse von nur +/15 % im Durchschnitt der anderen genannten Zelllinien. Erklärt werden könnte dies durch den der Bindung nachgeschalteten Mechanismus, der zur Expression von dem GFP führt. Außerdem wies der Primärtumor in der

Immunhistochemie ein besseres Färbeergebnis auf (++/36 %), das vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Zellkultur ist.

Aus dem Zusammenspiel dieser drei Ergebnisse (FACS, Immunhistochemie, Infizierbarkeit) lässt sich schließen, dass die CAR Expression und die adenovirale Infizierbarkeit korrelieren, bei der die OH1 Zellen die besten Ergebnisse erzielten und eine Erhöhung des Expressionslevels der anderen Zelllinien wünschenswert wäre, um ähnlich gute Voraussetzungen für einen Therapieansatz zu schaffen. Kim et al. (2002) konnten an Ovarialkarzinomzellen zeigen, dass die CAR-Expression in enger Beziehung zur Empfindlichkeit der Infektion mit Adenoviren steht und, dass der Effekt durch ektope Expression des CAR-Gens durch transiente Transfektion zu einem deutlichen Anstieg der Sensitivität gegenüber der Viren kommen kann.

Dass eine geringe Hochregulierung der CAR-Expression die Effizienz von onkolytischer Gentherapie vermittelt durch Adenoviren vervielfachen kann, stellte auch Wang et al. (2007) fest. Aus diesem Grund sollte mit der Vorbehandlung der Zellen in Zellkultur versucht werden, den Rezeptor in den kleinzelligen Bronchialkarzinomen vermehrt zu exprimieren. Gelungen ist dies mit einem iHDAC, dem TSA, mit dem eindeutig eine Hochregulierung der CAR-Expression in allen fünf Zelllinien gezeigt werden konnte. Mit der FACS-Färbung wurde nicht nur die gesteigerte Expression veranschaulicht, sondern konnte auch das Grundlevel der CAR-Expression in den Zelllinien, vergleichend zu den Färbungen der Formalin-fixierten Zellpellets, bestimmt werden. Bemerkenswert ist dabei, dass die TSA-Vorbehandlung sowohl auf die Zelllinien mit einer geringen Expression als auch auf jene mit einem sowieso schon hohen CAR-Level einen positiven Effekt hatte. Ausgehend von der Feststellung, dass die SCLC-Zellen generell schon ein hohen Level an CAR Expression auf ihrer Zelloberfläche tragen, würde eine Steigerung von durchschnittlich 95,32 % nicht nur in allen Zelllinien eine Infektion erleichtern, sondern wahrscheinlich um ein Vielfaches verstärken. Desweiteren wird dem TSA als iHDAC ein großes therapeutisches Potential zu gesprochen (Elaut et al., 2007), denn die Acetylierung von Lysin-Resten der Histon-Proteine führt zu der offenen Konformation der Chromatinstruktur und erlaubt so den Transkriptionsfaktoren mit der Promoterregion zu interagieren, wodurch der Prozess der Genexpression, wie z. B. für CAR vereinfacht wird. Aber auch die Transkription proapoptotischer Gene wird, vor allem in Krebszellen, eingeleitet (Suzuki et al., 2000). Damit können iHDACs den Zellzyklus und Differenzierungsvorgänge beeinflussen, die Apoptose einleiten und die Angiogenese und Metastasierung hemmen (Papeleu et al., 2005). Das heißt, dass der Einsatz von TSA nicht nur zur Steigerung des Effekts der onkolytischen Therapie

herangezogen werden könnte, sondern auch primär als Zytostatikum fungiert und somit eine Kombinationstherapie zur Verfügung stehen könnte, deren Effekte sich gegenseitig positiv beeinflussen. Die proapoptotische Wirkung von TSA konnte auch bei den Versuchen der FACS-Färbung beobachtet werden. Es wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen gearbeitet, wobei jene im nanomolaren Bereich einen größeren Effekt hatte. Die CAR Expression wurde bei einer TSA Konzentration von 10 nM um durchschnittlich 95,32 % erhöht, bei einer Konzentration von 1 μ M nur um 66,63 %. Außerdem war der negative Einfluss auf die Vitalität bei der niedrigeren TSA Konzentration geringer als bei 1 μ M. In dieser Arbeit wurde somit zum ersten Mal gezeigt, dass die CAR Expression des SCLC durch den Einsatz von TSA hochregulieren lässt. Dies ausgehend von dem generell schon hohen Grundlevel der CAR Expression bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen, könnte ein vielversprechender Ansatz der Therapieoptimierung für diesen aggressiv wachsenden und früh metastasierenden Tumor sein.

Es wurde außerdem gezeigt, dass CAR sehr heterogen exprimiert wird. Die heterogene Expression zeigt sich nicht nur zwischen verschiedenen Tumorgeweben, sondern auch innerhalb einer Tumorart von unterschiedlichen Ausgangszelllinien. Und auch das Vorkommen innerhalb eines Tumors muss nicht homogen sein, sondern seine Verteilung erscheint häufig heterogen. Als Schlussfolgerung lässt sich also ziehen, dass zum einen das Ursprungsgewebe einen Einfluss auf die CAR Expression hat. Dies wurde vor allem an dem SCLC verdeutlicht und damit die These bestätigt, dass CAR in besonders hohem Maße in kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu finden ist. Zum anderen spielt auch die Tumorzelllinie eine Rolle. Eine Regelmäßigkeit ließ sich allerdings beim Verhalten des Rezeptors im Bezug auf die Tumorprogression feststellen, so dass die Zellen aus der Zellkultur eine hohe Expression von CAR aufwiesen, während CAR im Tumorgewebe herunter reguliert war und wiederum in den Metastasen reexprimiert wurde. Außerdem nimmt die Differenzierung der Zellen einen Einfluss auf die Expression. Mit den klinischen Fällen konnte gezeigt werden, dass je weiter sich die Zellen entdifferenzieren, desto geringer der Anteil der Tumore mit hoher CAR-Expression wird. Ein Regulationsmechanismus der CAR Expression könnte mit Transition der epithelialen Zellen zu mesenchymalen im Laufe der Tumorprogression zusammenhängen. Die reverse Phänotyp-Ausprägung in der MET würde wiederum den hohen CAR Expressionslevel in den Metastasen erklären. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Zelllinien des SCLC mit einem Adenovirus infizieren lassen. Dabei korreliert die Infektionsrate mit der CAR-Expression. In Aussicht auf eine einfachere und höhere Infektion mit einem onkolytischen Virus wurde zusätzlich nachgewiesen, dass sich der

CAR mit einem iHDAC deutlich hochregulieren lässt. In Anbetracht dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine Evaluation des CAR-Levels vor der Applikation des Virus sinnvoll zu sein scheint, dass insbesondere die kleinzelligen Bronchialkarzinome durch ihre hohe CAR-Expression für eine onkolytische Therapie geeignet sind und, dass die Kombination mit einem Zytostatikum den Effekt der Krebstherapie erhöhen könnte. Speziell iHDACs könnten die Effizienz einer Therapie mit Adenoviren deutlich verstärken. Diese Befunde sind für die systemische Therapie insbesondere für Tumore mit bisher wenig Therapieoptionen und geringen Heilungschancen wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom von Interesse.

VI. Zusammenfassung

Der Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR) steht auf Grund seiner wichtigen Rolle bei der Virusinternalisierung im Fokus vieler Forschungen für die onkolytische und die Adenovirusvermittelte Gentherapie. In dieser Arbeit wurde der CAR Expressionslevel mittels der Immunhistochemie für humane kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC), Neuroblastome, Ovarialkarzinome, Mammakarzinome, Pankreaskarzinome, Kolonkarzinome und Prostatakarzinome untersucht. Dabei wurde die Expression von humanen Tumorzellen, die in der Zellkultur gezüchtet wurden, mit denen, die in der Maus als Primärtumor gewachsen sind, verglichen. Zusätzlich wurde die CAR Expression in klinischem Material bei Nasopharynxkarzinomen bestimmt.

Die Expression erwies sich zwischen den verschiedenen Tumorarten und den verschiedenen Zelllinien als sehr heterogen. Während der Tumorprogression wird der CAR-Level am Rande des Primärtumors herab reguliert und in den Metastasen ist wiederum herauf reguliert. Diese Schlussfolgerungen konnten aus den Färbungen der Zellen in Agar, dem Primärtumor und den Metastasen der SCLC gezogen werden, die eine besonders hohe Expression von CAR zeigten. Die Beobachtung, dass die Zellen in Agar eine höhere CAR Expression aufweisen als das Primärtumorgewebe in der Maus, ließ sich bei allen Färbungen mit Ausnahme der Kolonkarzinome wiederfinden. Anhand der Färbung der klinischen Fälle wurde festgestellt, dass es auch einen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Tumors gibt. Je schlechter die Differenzierung eines Nasopharynxkarzinoms ist, desto geringer ist seine CAR Expression.

Mit den Versuchen in der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass eine Infektion der SCLC Zellen mit einem GFP-markierten Adenovirus möglich ist, wobei die Infektionsrate mit dem CAR Expressionslevel korreliert. Mit dem iHDAC (Histondeacetylase-Inhibitor) Trichostatin A konnte zum ersten Mal in den Zelllinien der kleinzelligen Bronchialkarzinome eine Hochregulierung von CAR erzielt werden. Diese lag bei einer TSA Konzentration von 10 nM durchschnittlich bei 95,32 %, einer Konzentration, bei der ein gutes Gleichgewicht aus zytotoxischen und positiven Einflüssen gefunden wurde. Vor einer onkolytischen Therapie sollte die Expression des CAR Levels bestimmt werden. Ist dieser zu niedrig für eine erfolgversprechende Infektion der Zellen, könnte seine Heraufregulation durch iHDAC erzielt werden, wodurch die Effizienz einer adenoviralen Therapie durch die Hochregulierung von CAR deutlich verbessert werden könnte.

VII. Literaturverzeichnis

Angst DB, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. J Cell Sci. 2001; 114: 629-641.

Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, Versmold B, Engel C, Meindl A, Arnold N, Hofmann W, Sutter C, Niederacher D, Deissler H, Caldes T, Kämpjärvi K, Nevanlinna H, Simard J, Beesley J, Chen X; Kathleen Cuningham Consortium for Research into Familial Breast Cancer, Neuhausen SL, Rebbeck TR, Wagner T, Lynch HT, Isaacs C, Weitzel J, Ganz PA, Daly MB, Tomlinson G, Olopade OI, Blum JL, Couch FJ, Peterlongo P, Manoukian S, Barile M, Radice P, Szabo CI, Pereira LH, Greene MH, Rennert G, Lejbkowicz F, Barnett-Griness O, Andrulis IL, Ozcelik H; OCGN, Gerdes AM, Caligo MA, Laitman Y, Kaufman B, Milgrom R, Friedman E; Swedish BRCA1 and BRCA2 study collaborators, Domchek SM, Nathanson KL, Osorio A, Llort G, Milne RL, Benítez J, Hamann U, Hogervorst FB, Manders P, Ligtenberg MJ, van den Ouweland AM; DNA-HEBON collaborators, Peock S, Cook M, Platte R, Evans DG, Eeles R, Pichert G, Chu C, Eccles D, Davidson R, Douglas F; EMBRACE, Godwin AK, Barjhoux L, Mazoyer S, Sobol H, Bourdon V, Eisinger F, Chompret A, Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lenoir GM, Gauthier-Villars M, Houdayer C, Stoppa-Lyonnet D; GEMO, Chenevix-Trench G, Easton DF; CIMBA. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Am J Hum Genet. 2008; 82: 937-948.

Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. Lab Invest. 1993; 68: 4-17.

Anders M, Vieth M, Röcken C, Ebert M, Pross M, Gretschel S, Schlag PM, Wiedenmann B, Kemmner W, Höcker M. Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. Br J Cancer. 2009; 100: 352-359.

Auer D, Reimer D, Porto V, Fleischer M, Roessler J, Wiedemair A, Marth C, Müller-Holzner E, Daxenbichler G, Zeimet AG. Expression of coxsackie-adenovirus receptor is related to estrogen sensitivity in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2009; 116: 103-111.

Bao Y, Wang Y, Ma L, Guan N, Cheng Y, Wang S, Fan X. Expression of coxsackie and adenovirus receptor in small cell lung cancer. Chin Ger J Clin Oncol. 2009; 8: 504-505.
Becker N., Wahrendorf J. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. Springer, Berlin Heidelberg New York 1998. Fortschreibung im Internet: www.krebsatlas.de; URL: http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/organe/162_tab.html; (Stand: 26.04.2011, 14:36 Uhr)

Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. J Cell Biol. 1989; 108: 2435-2447.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science. 1997; 275: 1320-1323.

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta. 1994; 1198: 11-26.

Blaheta, RA., Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies. Med Res Rev. 2005; 25: 383-397.

Brodeur GM. Meeting summary for Advances in Neuroblastoma Research-2000. Med Pediatr Oncol. 2000; 35: 727-728.

Brüning A, Runnebaum IB. CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. Gene Ther. 2003; 10: 198-205.

Brüning A, Runnebaum IB. The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration. Exp Cell Res. 2004; 298: 624-631.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol. 2000; 2: 76-83.

Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion J, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. Cancer Res.1985; 45: 2913-2923.

Carson SD, Chapman NN, Tracy SM. Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 233: 325-328.

Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. Ann Surg. 2002; 235: 759–766.

Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T, Bergelson JM. Multiple regions within the Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. J Biol Chem. 2001; 276: 25392–25398.

Cohen C, Shieh J, Pickles R, Okegawa T, Hsieh J, and Bergelson J. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 15191–15196.

Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. J Clin Oncol. 2009; 27: 289-297.

Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57: 869-882.

Digel W, Henke M, Stoelben E. Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, Atemwegs- und Lungenkrankheiten, Jahrgang 27, Atemw.-Lungenkrkh. 2001; 6: 279-284.

Dock G, Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma. Am J Med Sci 1904; 127: 563.

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott G, Benz CC. Cinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005; 45: 495-528.

Ekblad M, Halldén G. Adenovirus-based therapy for prostate cancer. Curr Opin Mol Ther. 2010; 12: 421-31.

Elaut G, Török G, Vinken M, Laus G, Papeleu P, Tourwe D, Rogiers V. Major phase I biotransformation pathways of Trichostatin a in rat hepatocytes and in rat and human liver microsomes. Drug Metab Dispos. 2002; 30: 1320-1328.

Elaut G, Rogiers V, Vanhaecke T. The pharmaceutical potential of histone deacetylase inhibitors. Curr Pharm Des. 2007; 13: 2584-2620.

Engel J, Schmidt M, Schubert-Fritschle G, Tretter W, Hölzel D. Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum. München – Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. Zuckerschwerdt, München, Bern, Wien, New York (2000): 45-76.

Escobar MA, Grosfeld JL, Powell RL, West KW, Scherer LR 3rd, Fallon RJ, Rescorla FJ. Long-term outcomes in patients with stage IV neuroblastoma. J Pediatr Surg. 2006; 41: 377-381.

Fidler IJ, Poste G. The heterogeneity of metastatic properties in malignant tumor cells and regulation of the metastatic phenotype. Tumor Cell Heterogeneity: Origins and Implications, A H Owens, Jr, D S Coffey, S B Baylin. Academic Press, New York 1982; 127–145.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. 2000. Principles of virology. ASM Press, Washington, D.C., USA.

Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA Jr, Raben D. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. Mol Cancer Ther. 2007; 6: 1683-1691.

Gennari A, Conte P, Rosso R, Orlandini C, Bruzzi P. Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year-period. Cancer 2005; 104: 1742-1750.

Giaginis CT, Zarros AC, Papaefthymiou MA, Papadopouli AE, Sfiniadakis IK, Theocharis SE. Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in human endometrial adenocarcinoma: possible clinical implications. World J Surg Oncol. 2008; 6: 59.

Gioncotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. Curr Opin Cell Biol. 1997; 9: 691–700.

Graat HC, Wuisman PI, van Beusechem VW, Carette JE, Gerritsen WR, Bras J, Schaap GR, Kaspers GJ, Ogose A, Gu W, Kawashima H, Hotta T. Coxsackievirus and adenovirus receptor expression on primary osteosarcoma specimens and implications for gene therapy with recombinant adenoviruses. Clin Cancer Res. 2005; 11: 2445-2447; author reply 2447-2448.

Gu W, Ogose A, Kawashima H, Ito M, Ito T, Matsuba A, Kitahara H, Hotta T, Tokunaga K, Hatano H, Morita T, Urakawa S, Yoshizawa T, Kawashima H, Kuwano R, Endo N. Highlevel expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor messenger RNA in osteosarcoma, Ewing's sarcoma, and benign neurogenic tumors among musculoskeletal tumors. Clin Cancer Res. 2004; 10: 3831-3838.

Häussinger K, Kohlhäufl M: Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms. In: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Tumore der Lunge und des Mediastinums, W Zuckschwerdt Verlag 2000, München, Bern, Wien, New York: 1-4.

Hoffman P, Mauer A, Vokes E. Lung cancer, The Lancet (2000); 355: 479-485.

Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S, Kuwano R. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. Brain Res Mol Mrain Res 2000; 77: 19-28.

Ikeda T, Masuno T, Ogura T, Watanabe M, Shirasaka T, Hara H, Tanio Y, Kawase I, Kishimoto S. Characterization and purification of an immunosuppressive factor produced by a small cell lung cancer cell line. Jpn J Cancer Res. 1991; 82: 332-338.

Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci. 2003; 116: 1959-1967.

Jee YS, Lee SG, Lee JC, Kim MJ, Lee JJ, Kim DY, Park SW, Sung MW, Heo DS. Reduced expression of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in tumor tissue compared to normal epithelium in head and neck squamous cell carcinoma patients. Anticancer Res. 2002; 22: 2629-2634.

Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest. 2003; 112: 1776-1784.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009; 119: 1420-1428.

Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, Drobnjak M, Cordon-Cordo C, Chiao JH, Rifkind R, Marks PA, Scher H. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. Clin Cancer Res. 2003; 9: 3578-3588.

Kim JS, Lee SH, Cho YS, Choi JJ, Kim YH, Lee JH. Enhancement of the adenoviral sensitivity of human ovarian cancer cells by transient expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). Gynecol Oncol. 2002; 85: 260-265.

Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA, Krasnykh V, Curiel DT, Douglas JT. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells. Eur J Cancer. 2002; 38: 1917-1926.

Kim E, Kim JH, Shin HY, Lee H, Yang JM, Kim J, Sohn JH, Kim H, Yun CO. Ad-mTERTdelta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. Hum Gene Ther. 2003; 14: 1415-1428.

Kitazono M., Goldsmith M.E., Aikou T., Bates S., Fojo T. Enhanced adenovirus transgene expression in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228. Cancer Res. 2001, 61: 6328-6330.

Kitazono M., Koneti R.V., Robey R., Aikou T., Bates S., Fojo T., Goldsmith M. Histone deacetyase inhibitor FR901228 enhances adenovirus infection of hematopoetic cells. Blood. 2002; 99: 2248-2251.

Li D, Duan L, Freimuth P, O'Malley BW Jr. Variability of adenovirus receptor densitiy influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. Clin Cancer Res. 1999; 5: 4175-4181.

Liotta LA, Clair T. Cancer. Checkpoint for invasion. Nature. 2000; 405: 287-288.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell. 1991; 64: 327-336.

Lu W, Zheng S, Li XF, Huang JJ, Zheng X, Li Z. Intra-tumor injection of H101, a recombinant adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with advanced cancers: a pilot phase II clinical trial. World J Gastroenterol. 2004; 10: 3634-3638.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. Lancet. 2007; 369: 2106-2120.

Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res. 2004; 91: 137-168.

Marsee DK, Vadysirisack DD, Morrison CD, Prasad ML, Eng C, Duh QY, Rauen KA, Kloos RT, Jhiang SM. Variable expression of coxsackie-adenovirus receptor in thyroid tumors: implications for adenoviral gene therapy. Thyroid. 2005; 15: 977-987.

Marshall JF, Hart IR. The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis. Semin Cancer Biol. 1996; 7: 129-138.

Matsumoto K, Shariat SF, Ayala GE, Rauen KA, Lerner SP. Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. Urology. 2005; 66: 441-446.

Menegola E, Di Renzo F, Broccia ML, Prudenziati M, Minucci S, Massa V, Giavini E. Inhibition of histone deacetylase activity on specific embryonic tissues as a new mechanism for teratogenicity. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2005; 74: 392-398.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer. 2006; 6: 38-51.

Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. Chest. 1997; 111: 1710-1717.

Nagano S, Yannis Perentes J, Jain RK, Boucher Y. Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. Cancer Res. 2008; 68: 3795-3802.

Nalbantoglu J, Pari G, Karpati G, Holland PC. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. Hum Gene Ther. 1999; 10: 1009-1019.

Nguyen TL, Wilson MG, Hiscott J. Oncolytic viruses and histone deacetylase inhibitors--a multi-pronged strategy to target tumor cells. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21: 153-159.

Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. Pathologe. 1998; 19: 337-344.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and

alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. Circulation. 2001; 104: 275-280.

Okegawa T, Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Zhou J, Hsieh JT. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on humane prostate cancer gene therapy. Cancer Res. 2000; 60: 5031-5063.

Onganer PU, Seckl MJ, Djamgoz MBA. Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. Br J Cancer. 2005; 93: 1197-1201.

Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. Science. 2005; 307: 1603-1609.

Pan JJ, Zhang SW, Chen CB, Xiao SW, Sun Y, Liu CQ, Su X, Li DM, Xu G, Xu B, Lu YY. Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long-term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. J Clin Oncol. 2009; 27: 799-804.

Pandit N, Gonen M, Krug L, Larson S. Prognostic value of [18F] FDG-PET imaging in small cell lung cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003; 30: 78-84.

Papeleu P, Vanhaecke T, Elaut G, Vinken M, Henkens T, Snykers S, Rogiers V. Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? Crit Rev Toxicol. 2005; 35: 363-378.

Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. Mol Pharm. 2011; 8: 12-28.

Pong RC, Lai YJ, Cehn H, Okegawa T, Frenkel E, Sagalowsky A, Hsieh JT. Epigenetic regulation of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) gene promoter in urogenital cancer cells. Cancer Res. 2003; 63: 8680-8686.

Rancourt C, Rogers BE, Sosnowski BA, Wang M, Piche A, Pierce GF, Alvarez RD, Siegal GP, Douglas JT, Curiel DT. Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirusmediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. Clin Cancer Res. 1998; 4: 2455-2461. Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V, Schmitt LD, McCormickF. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. Cancer Res. 2002; 62: 3812-3818.

Reimer D, Steppan I, WIedemair A, Concin N, Hofstetter G, Mrth C, Müller-Holzner E, Zeimet AG. Soluble isoforms but not the transmembrane form of coxsackie-adenovirus receptor are of clinical relevance in epithelial ovarian cancer. Int J Cancer. 2007; 120: 2568-2575.

Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL., François Y, Vignal J, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies. Results of the EVOCAPE 1 Multicentric Prospective Study. Cancer. 2000; 88: 358-363.

Segura-Pacheco B, Alvalos B, Rangel E, Velazquez D, Cabrera G. HDAC inhibitor valproic acid upregulates CAR in vitro and in vivo. Genet Vaccines Ther. 2007; 5: 10-18.

Sodeur S, Ullrich S, Gustke H, Zangemeister-Wittke U, Schumacher U. Increades numers of spontaneous SCLC metastasis in abscence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell Lines into pfp/rag2 double knock out mice. Cancer Lett. 2009; 282: 146-151.

Sterman DH, Treat J, Litzky LA, Amin KM, Coonrod L, Molnar-Kimber K, Recio A, Knox L, Wilson JM, Albelda SM, Kaiser LR. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. Hum Gene Ther. 1998; 9: 1083-1092.

Su C, Na M, Chen J, Wang X, Liu Y, Wang W, Zhang Q, Li L, Long J, Liu X, Wu M, Fan X, Qian Q. Gene-viral cancer therapy using dual-regulated oncolytic adenovirus with antiangiogenesis gene for increased efficacy. Mol Cancer Res. 2008; 6(4): 568-575.

Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. Int J Cancer. 2000; 88: 992-997.

Titcomb CP Jr. High incidence of nasopharyngeal carcinoma in Asia. J Insur Med. 2001; 33: 235-238.

Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 3352-3356.

Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer. Cancer. 1995; 75: 191-202.

Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al: World Health Organization. International Histological Classification of Tumors: Histological Typing of Lung and Plueral Histological Classification of Tumors: Histological Typing of Lung and Plueral Tumors. 3. Aufl. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1999.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC Press, Lyon, 2004.

UICC. Wittekind Ch, Greene FL, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, eds. TNM Supplement. A commentary on uniform use. 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, 2003

Vasef MA Ferlito A, Weiss LM. Nasopharyngeal carcinoma, with emphasis on its relationship to Epstein-Barr virus. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2007; 106: 348–356.

Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, Zabner J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. J Biol Chem. 1999; 274: 10219-10226.

Wang B, Chen G, Zhou J, Wu P, Luo D, Huang X, Zhu T, Han Z, Xu G, Wang S, Lu Y, Ma D. Deletion of the intracellular domain of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) enhances the expression of itself and boosts the efficiency of current adenovirus-mediated gene therapy in ovarian cancer cell lines in vitro. Cancer Lett. 2007; 248: 299-307.

Wong HH, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. Viruses. 2010; 2: 78-106.

Worden FP, Kalemkerian GP, Therapeutic advances in small cell lung cancer. Expert Opin Investig Drugs. 2000; 9: 565-579.

Xu Z, Wang Y, Mei Q, Chen J, Du J, Wei Y, Xu Y. Trichostatin a inhibits proliferation, induces apoptosis and cell cycle arrest in HeLa cells. Chin J Canc Res. 2006; 18: 188-192.

Yamashita M, Ino A, Kawabata K, Sakurai F, Mizuguchi H. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. Int J Cancer. 2007; 121: 1690-1696.

Yu W, Fang H: Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. Curr Cancer Drug Targets. 2007; 7: 141-148.

Yuan ZY, Guan ZZ, Zhang L, Xu RH. Effect of expression of coxsackie and adenovirus receptor on antitumor activity of genetically modified adenovirus. AIZheng. 2005; 24: 502-505.

Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. World J Gastroenterol. 2002; 8: 987-993.

Zhu WG, Lakshmanan RR, Beal MD, Otterson GA. DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. Cancer Res. 2001; 61: 1327-1333.

VIII. Appendix

Name	Prozent	Intensität	Nummer
OH3	0	-	112-1A-04
OH3	< 10	+	112-2A-04
OH3	< 5	+	112-3A-04
OH3	0	-	132-1A-04
OH3	20	+	104-1A-04
OH3	60	+	38-04
H82	30	+	107-1A-04
H82	30	+	107-2A-04
H82	40	+	107-6A-04
H82	20	+	115-1A-04
H82	30	+	116-1A-04
H82	70	$+ \rightarrow ++$	43-04
SW2	< 30	$+ \rightarrow ++$	113-1A-04
SW2	40	+	113-3A-04
SW2	60	++	113-4A-04
SW2	30	++	108-3A-04
SW2	30	+++	118-1A-04
SW2	20	(+)	46-04
H69	50	+	131-1A-04
H69	60	$++ \rightarrow +++$	144-1A-04
H69	30	+	154-1A-04
H69	80	$++ \rightarrow +++$	41-04
OH1	80	$++ \rightarrow +++$	135-1A-04
OH1	40	++	135-2A-04
OH1	60	++	135-3A-04
OH1	90	+++	45-04

Tabelle 5: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der kleinzelligen Bronchialkarzinome mit Anti-CxADR und AP-Entwicklung

Tabelle 6: Ergebnisse der Färbung der kleinzelligen Bronchialkarzinome mit Anti-CxADR und Glukoseoxidase

 Verstärkungsreaktion

Name	Prozent	Intensität	Nummer
OH3	60	(+)	132-2A-04
OH3	60	(+)	112-2A-04
OH3	10	+	112-1A-04
OH3	100	(+)	132-1A-04
OH3	70	(+)	104-1A-04
OH3	100	(+)	38-04
H82	40	(+)	107-3A-04
H82	30	(+)	107-2A-04
H82	70	(+)	107-6A-04
H82	10	(+)	115-1A-04
H82	40	+	116-1A-04
H82	70	$+ \rightarrow ++$	43-04
SW2	10	+	113-1A-04
SW2	50	+	103-1A-04
SW2	20	(+)	108-1A-04
SW2	0	-	108-3A-04
SW2	0	-	118-1A-04
SW2	20	(+)	46-04
H69	40	+	131-1A-04
H69	10	+	144-1A-04
H69	40	+	149-1A-04
H69	100	+	41-04
OH1	80	+	135-1A-04
OH1	30	+	135-3A-04
OH1	30	+	134-1A-04
OH1	100	+->++	45-04

Name	Prozent	Intensität	Nummer
Kelly	0	-	108-3A-03
Kelly	0	-	108-4A-03
Kelly	0	-	108-5A-03
Kelly	0	-	108-6A-03
Kelly Z.i.A.	0	-	189-04
SKNSH	0	-	9-2A-04
SKNSH	0	-	9-3A-04
SKNSH	0	-	9-5A-04
SKNSH	0	-	9-6A-04
SKNSH Z.i.A.	0	-	183-04
IMR32	0	-	3-2A-04
IMR32	0	-	3-3A-04
IMR32	0	-	3-4A-04
IMR32	0	-	3-6A-04
IMR32 Z.i.A.	85	++ - +++	187-04
LAN1	10	+	31-1A-04
LAN1	5	+	31-2A-04
LAN1	10	+	20-1A-04
LAN1	5	++	26-1A-04
LAN1 Z.i.A.	5	+	185-04

Tabelle 7: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Neuroblastome mit Anti-CxADR und AP-Entwicklung

Name	Prozent	Intensität	Nummer
Kelly	0	-	108-3A-03
Kelly	0	-	108-4A-03
Kelly	0	-	108-5A-03
Kelly	0	-	108-6A-03
Kelly Z.i.A.	0	-	189-04
SKNSH	2	-	9-2A-04
SKNSH	0	-	9-3A-04
SKNSH	0	-	9-5A-04
SKNSH	0	-	9-6A-04
SKNSH Z.i.A.	0	-	183-04
IMR32	0	-	3-2A-04
IMR32	0	-	3-3A-04
IMR32	0	-	3-4A-04
IMR32	0	-	3-6A-04
IMR32 Z.i.A.	90	++ - +++	187-04
LAN1	50	(+)	31-1A-04
LAN1	40	(+)	31-2A-04
LAN1	60	(+)	20-1A-04
LAN1	60	(+)	26-1A-04
LAN1 Z.i.A.	100	+->++	185-04

Tabelle 8: Ergebnisse der Färbung der Neuroblastome mit Anti-CxADR und Glukoseoxidase-Verstärkungsreaktion

Name	Vergleichsschnitt	Lunge	Prozent	Intensität	Metastase
H69	131-1A-04	131-1B-04	50	+	1. (+)
H69	154-1A-04	154-1B-04	0	-	1. (+)
					2. –
					3. –
					4. + 5 ++
					5. 11 6. (+)
					7. (+)
					8. +
					9. +
H69	41-04		80	+	
Z.i.A.	110.04.04	110.00.04			
OH3	112-2A-04	112-2B-04	0	-	1 (.)
OH3		1 <i>32-2</i> B-04	20	(+)	1. (+)
OH3	38-04		20	(+)	2. ++
Z.i.A.	50 04		20		
OH1	135- 1A-04		30	(+)	
OH1	135-2A-04	135-2B-04	10	(+)	1. ++
					2. ++
					3. –
					4. ++
					5. ++
					0. ++ 7 +
					8. (+)
OH1	135-3A-04		40	+	
OH1	134-1A-04	134-1B-04	60	(+)	I. (+)
					II. –
					III. (+)
0111	45.04		0.0		IV. (+)
	45-04		90	$++ \rightarrow +++$	-
Z.1.A.					

Tabelle 9: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Metastasen im Vergleich zur Färbung der Primärtumore mit Anti-CxADR und AP-Entwicklung

Name	Prozent	Intensität	Nummer
OC 2 (Z.i.A.)	10	(+)	151-04
OC 2	0	-	174-1A-04
OC 2	20	(+)	176-2A-04
OVCAR 3 (Z.i.A.)	60	+	170-04
OVCAR 3	50	$++ \rightarrow +++$	168-1A-04
OVCAR 3	50	$++ \rightarrow +++$	168-6A-04
MZ 10	80	(+)	107-2A-07
MZ 10	50	+	107-1A ₂ -07
MZ 10	40	(+)	22-2A-07
MZ 10 (Z.i.A.)	60	+	372-06

 Tabelle 10: Ergebnisse der immunhistochemischen F

 ärbung der Ovarialkarzinome mit Anti-CxADR und AP-

 Entwicklung

Tabelle 11:	Ergebnisse	der immur	nhistochemischen	Färbung	der	Mammakarzinome	mit A	Anti-CxADR	und AP-
Entwicklung	5								

Name	Prozent	Intensität	Nummer
MCF 7	0	-	345-05
MCF 7	0	-	120-1A-02
MCF 7	0	-	66-1A-08
T47D	60	+	193-3A-01
T47D	40	++	346-05
DU4475	30	+	303-05
DU4475	0	-	123-1A-00

Tabelle 12:	Ergebnisse	der immunhisto	chemischen	Färbung der	Pankreaskarz	zinome mit A	Anti-CxADR	und AP-
Entwicklung	3							

Name	Prozent	Intensität	Nummer
Ca 5061	80	(+)	193-08
Ca 5061	10	(+)	38-2A-08
Ca 5072	0	-	256-1A-08
Ca 5072	70	(+)	123-08
Ca 5156	-	0	37-1A-09
Ca 5156	20	+->++	90-08

Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Kolonkarzinome mit Anti-CxADR und AP-Entwicklung

Name	Prozent	Intensität	Nummer
SW480	40	(+)	36-1A-99
SW480	70	+++	181-01
CaCo	20	(+)	228-1A-01
CaCo	0	-	78-06
HT29	<5	+	182-1A-06
HT29	0	-	312-05

 Tabelle 14: Ergebnisse der immunhistochemischen F

 ärbung der Prostatakarzinome mit Anti-CxADR und AP-

 Entwicklung

Name	Prozent	Intensität	Nummer
DU145	10	(+)	123-1A-99
DU145	80	+++	139-09
LNCAP	10	(+)	5-4A-08
LNCAP	50	+	90-07
PC3	0	-	192-2A-08
PC3	0	-	233-08

Nummer	Diagnose	Entnahme-	Auswertung		Klassifikation
		datum		100	
822-85	Hyperplasie, kein	25.01.1985	(+)	100	Hyperplasie
10(01.00	malignes Wachstum	10.10.1002		0.0	01
10621-83	Solides Karzinom	10.10.1983	$+ \rightarrow ++$	80	GI
	(Mundhohle)	24.02.1007		0.0	<u>C1</u>
3555-87	solides Ca.	24.03.1987	++	80	GI
	(Schilddrüse)	24.02.4005		20	<u> </u>
3555-87	solides Ca.	24.03.1987	+	30	GI
	(Schilddrüse)			•	~ ~ ~
3555-87	solides Ca.	24.03.1987	(+)	30	Gl
A	(Schilddrüse)				
10778-84	verhornendes PEC,	Nicht bekannt	(+)	40	G1
	Mundhöhle				
3458-84	PE, Mundhöhle (PEC)	Nicht bekannt	(+)	100	G1
512-85	nanllär wachsendes	18 01 1985	(+)	70	G1
012 00	Ca. Nasopharynx	10.01.1700		10	01
9377-84 1	napillär wachsendes	23.06.1984	(+)	30	G1
<i>John</i> 041	Ca. $(zu 512.85)$	23.00.1701		50	01
9377-84 1	papillär wachsendes	23.06.1984	(+)	30	G1
	Ca. (zu 512.85)	2010011901	(.)	20	
9377-84 2	papillär wachsendes	23.06.1984	negativ		G1
	Ca. (zu 512.85)		0		_
1916-85	papilläres SD-Ca.,	20.02.1985	(+)	10	G1
	Hals-LK				
11028-85	solides Ca. mit	02.10.1985	(+)	30	G1
	Mikrokalzifikationen				
	(primäres Mamma-				
	Ca.)				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein Tu	imor	G1
(11)	laterale Halszyste"		angeschnitten		
	(zystisches Tonsillen-		_		
	Ca.)				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein Tumor		G1
(11)	laterale Halszyste"		angeschnitten		
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Streifenstücke		G1
(12)	laterale Halszyste"		stark positiv		
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein Tu	imor	G1
(13)	laterale Halszyste"		angeschnitten		
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein Tu	imor	G1
(13)	laterale Halszyste"		angeschnitten		

Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der klinischen Nasopharynxkarzinome mit Anti-CxADR und AP-Entwicklung

6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Lymphknoten		G1
(14)	laterale Halszyste"				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Lymphk	noten	G1
(14)	laterale Halszyste"				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein T	umor	G1
(21)	laterale Halszyste"		angesch	nitten	
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Lymphk	noten	G1
(3)	laterale Halszyste"				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Lymphk	noten	G1
(4)	laterale Halszyste"				
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	kein T	umor	G1
(5)	laterale Halszyste"		angesch	nitten	
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Streifen	stücke	G1
(6)	laterale Halszyste"		stark p	ositiv	
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	Streifen	stücke	G1
(6)	laterale Halszyste"		stark p	ositiv	
6043-83	"Maligne entartete	08.06.1983	(+)	70	G1
(7)	laterale Halszyste"				
1716-84	maligner Tumor	14.02.1984	nega	tiv	G1
	wahrsch. PEC,				
	Tonsille			_	~ .
4813-85	gut differenziertes	30.04.1985	negativ		G1
2c	PEC, Neck dissection				
4010.05	Präparat	20.04.1005			
4813-85	gut differenziertes	30.04.1985	+	80	GI
2c E	PEC, Neck dissection				
2222 94 1	Praparat	04.02.1004		4:	<u>C1</u>
3222-84 1	großzeing-sondes	04.03.1984	nega	t1V	GI
	Karzinom, v. a.				
3777 84 7	großzellig solides	04.03.1084	(1)	20	C1
3222-04 2	Karzinom V a	04.03.1904	(+)	20	UI
	sebazöses Karzinom				
7674-84	nolymorph-	11 07 1984	(+)	40	G1
/0/4-04	spindelzelliges	11.07.1901		10	01
	partiell klarzelliges				
	Ca., Hals LK				
8319-83	Solides Karzinom des	08.08.1983	+	50	G1
	Nasopharynx				_
4139-87	solides Ca.,	06.04.1987	(+)	40	G1
	Nasopharynx				
5688-87	solides Ca.,	06.04.1987	negativ		G1
	Nasopharynx		C		
5688-87	solides Ca.,	06.04.1987	(+)	80	G1
	Nasopharynx				
5688-87	solides Ca.,	06.04.1987	kein Präparat		G1
	Nasopharynx		•		
5158-85	mäßig differenziertes	08.05.1985	+	30	G1
Α	PEC Neck dissection		1		
	Präparat				81

5158-85	mäßig differenziertes	08 05 1085	negat	iv	G1
D	DEC Nock dissoction	08.03.1965	negativ		01
D	Pröparat				
5150.05	riapaiat	09 05 1095		100	<u>C1</u>
5158-85	DEC Neels dissection	08.03.1985	(+)	100	GI
CI	PEC Neck dissection				
5158-85	riapaiai mäßig differenziertes	08 05 1085	negat	iv	C1
3130-03	DEC Nock dispertion	08.03.1965	nega	.1 V	UI
C2	Pränarat				
5158-85	mäßig differenziertes	08 05 1085	negat	tiv	G1
3130-03	PEC Neck dissection	00.05.1905	nega	LI V	01
C	Pränarat				
5158-85	mäßig differenziertes	08 05 1985	(1) 70		G1
c5	PEC Neck dissection	00.05.1705		70	01
CS	Pränarat				
11405-84	nicht-verhorn Ca V	24 10 1984	negat	iv	G2
11405-04	a medull	21.10.1901	negu	.1 v	02
-	Schilddrüsen-Ca., LK				
9564-84	wenig verhornendes	30.08.1984	+	70	G2
	Plattenepithelkarzino				
	m, LK Hals				
10202-83	nicht verhornendes	1983	negativ		G2
	Plattenepithelkarzino		C		
	m				
6156-83	mäßig differenziertes,	1983	+	5	G2
	verhornendes				
	Plattenepithelkarzino				
	m				
7007-83	mäßig differenziertes,	1983	kein Tumor		G2
HS/SY	verhornendes		angesch	nitten	
	Plattenepithelkarzino				
	m (zu 6156.83)				
7007-83	mäßig differenziertes,	1983	kein Tumor		G2
HS/SY	verhornendes		angeschnitten		
	Plattenepithelkarzino				
	m (zu 6156.83)	1002	<u>C1</u>		C 2
7007-83	maßig differenziertes,	1983	GI. Submandibular		G 2
IIA	Vernornendes				
	Plattenepitnelkarzino		18		
7007.92	milia differenziertee	1002	lroin Tu		<u> </u>
7007-85 VA	mang unterenzientes,	1965	kein Tumor		62
V A	Plattenenithalkarzina		angeschnitten		
	m $(711 6156 83)$				
7007-	mäßig differenziertes	1083	(+) 70		G2
83E/IC	verhornendes	1705		10	02
	Plattenenithelkarzino				
	m (z) 6156 83)				
6914-85	zystisch-solides Ca	21.06.1985	negat	tiv	G2
	Hals ("Maligne	21.00.1705	nogai		32

	entartete laterale				
	Halszyste)				
10170-86	Kieferwinkelmetastase	01.09.1986	(+)	80	G2
1	solides Ca.	0110711700			02
10170-86	Kieferwinkelmetastase	01.09.1986	(+)	80	G2
1J	solides Ca.				
10170-86	Kieferwinkelmetastase	01.09.1986	Lymphl	cnoten	G2
2	solides Ca.				
10170-86	Kieferwinkelmetastase	01.09.1986	Lymphl	knoten	G2
2	solides Ca.				
7622-86 1	gehört zu 10170.86,	30.06.1986	nega	tiv	G2
	LK, Hals				
1175-84	niedrig-diff. Ca.,	01.02.1984	(+)	30	G3
	überwiegend				
	klarzellig, LK				
	(Bronchialkarzinom-				
2(21.94	Met.)	00 02 1004	(1)	10	<u>C2</u>
2031-84	plattenepith. Ca.,	08.03.1984	(+)	10	63
	2685.84				
2631-84	nlattenenith Ca	08 03 108/	nagativ		G3
2031-04 SS	basaloid I K (zu	00.03.1904	negativ		05
66	2685 85)				
2685-84	plattenepith Ca.	09.03.1984	(+)	30	G3
2000 01	basaloid. LK (zu	0,10011,01		00	
	2631.84)				
3267-87	(zu 2685.84): Neck	27.03.1984	Lymphknoten		G3
	dissection Präparat,				
	Lymphangiosis				
	carcinomatosa				
3267-87	(zu 2685.84): Neck	27.03.1984	Lymphknoten		G3
	dissection Präparat,				
	Lymphangiosis				
	carcinomatosa				
9470-85	schlecht	21.08.1985	(+)	90	G3
	differenziertes PEC,				
	Hals-LK				~~~
9584-87	Hypopharynx-Ca.	07.08.1987	++	70	G3
10(50.04	PEC	20.11.1004	(.)	(0)	
12659-84	schlecht	28.11.1984	(+)	60	63
	Karzinom Hala I K				
6720.82	invosivos PEC	26.01.1082	Strotum	basala	C 2
0137-03	Tonsille	20.01.1903	des Enithels		03
10619-86	nolymornhzelliges	12 09 1986			G3
10017-00	partiell solides Ca	12.07.1700	nege	111 Y	05
	Hals LK				
10619-86	polymorphzelliges	12.09.1986	nega	tiv	G3
1001/00	partiell solides Ca.		nege		~~~
	Hals LK				

3713-85	Schmincke-Tumor	08.11.1983	nega	tiv	G4
	(lymphoepitheliales		0		
	Ca.), Nasopharynx, zu				
	11170.85				
2716-87	Nasopharynx	05.03.1987	nega	tiv	G4
	(Schmincke-Tumor)		C C		
2342-87	(zu 2716.87)	05.03.1987	kein Prä	iparat	G4
	(Schmincke-Tumor):				
	ND Präparat				
8273-83	Lymphoepitheliales	09.08.1983	(+)	10	G4
	Karzinom				
	(Tonsillenregion)				
8273-83	Lymphoepitheliales	09.08.1983	(+)	10	G4
	Karzinom				
14450-86	solides anaplast. Ca.	29.12.1986	(+)	70	G4
	V. a. Schmincke-Tu.				
2552-84	Lymphoepitheliales	1984	(+)	80	G4
Α	Karzinom				
2552-84 2	Lymphoepitheliales	1984	(+)	70	G4
	Karzinom				
12935-84	undifferenziertes	27.11.1984	++	80	G4
	Karzinom, Lok.				
	Nasopharynx				
9171-83	kleinzelliges	30.08.1983	+	20	G4
ZN/E	Karzinom				
7606-86 1	mittel-groß-zelliges	17.07.1986	Lymphk	noten	G4
	anaplastisches				
	Karzinom, Hals-LK	1- 0- 1001			~ ~ ~
7606-86 2	mittel-groß-zelliges	17.07.1986	nega	tiv	G4
	anaplastisches				
1002.04	Karzinom, Hals-LK	00.00.1004			<u> </u>
1203-84	Schmincke-Tumor	02.03.1984	nega	tiv	G4
	(lymphoepitheliales				
2104.94	Ca.)	20.02.1094			<u>C</u> 4
2194-84	Kleinzeilig-	29.02.1984	nur Dia da como ha		G4
	Vorzinom		Dilidegewebe		
10185 85	mittal groß zalligas	00.00.1085	nogo	tix	C4
10105-05	anonlastisches	09.09.1965	nega	uv	04
	Karzinom Hals-I K				
3871-87	Sinus niriformis	02 04 1987	nega	tiv	GA
30/1-0/	undiff Ca	02.04.1907	negativ		04
	(Schmincke-Tumor)				
11945-86	Schmincke-Tumor	14,10,1986	++	20	G4
11745-00	(lymphoen Ca)	11.10,1700		20	UT
	Nasonharvnx				
12487-86	Schmincke-Tumor	27.10.1986	nega	tiv	G4
	(lymphoep. Ca.).		negu		
	Nasopharvnx				
L			1		

8518-85	Schmincke-Tumor	1986	nega	tiv	G4
	(lymphoep. Ca.),		8		
	Nasopharynx				
1023-85	Schmincke-Tumor	30.01.1985	kein Tumor		G4
	(lymphoep. Ca.)		angeschnitten		
9970-85	Schmincke-Tumor	05.09.1985	negativ,		G4
	(lymphoep. Ca.),		(Epithel +)		
	Nasopharynx				
3311-87	anaplastisches	18.03.1987	(+)	20	G4
	Karzinom, SD-				
	Resektat (Primäres				
	Gewebe nicht mehr zu				
	differenzieren)				
3311-87	anaplastisches	18.03.1987	(+)	40	G4
	Karzinom, SD-				
	Resektat (Primäres				
	Gewebe nicht mehr zu				
	differenzieren)				
3311-87	anaplastisches	18.03.1987	(+)	70	G4
	Karzinom, SD-				
	Resektat (Primäres				
	Gewebe nicht mehr zu				
	differenzieren)				
3399-87	anaplastisches	19.03.1987	nega	tiv	G4
	Karzinom, Hals-LK				
3399-87	anaplastisches	19.03.1987	+	40	G4
	Karzinom, Hals-LK				
3399-87	anaplastisches	19.03.1987	(+)	80	G4
	Karzinom, Hals-LK				
3311-87	anaplastisches	18.03.1987	(+)	30	G4
	Karzinom				

IX. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mir geholfen haben diese Arbeit fertigzustellen.

Als allererstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. U. Schumacher bedanken für die Überlassung des Themas und vor allem für seine stetige Präsenz, um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und seine Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. T. Dobner, wissenschaftlicher Direktor der Abteilung für molekulare Virologie am Heinrich-Pette-Institut, für die Arbeit in seiner Abteilung und bei Herrn P. Groitl für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit bei den Infektions-Versuchen mit Ad-GFP.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. E. Friedrich aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Universitätsklinikum Eppendorf für die Unterstützung durch die Zurverfügungstellung der klinischen Fälle.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Experimentelle Morphologie für die freundliche Aufnahme in ihre Abteilung, Beantwortung jeglicher Fragen und Lösung von Problemen. Ich bitte um Verständnis, dass ich nicht alle an dieser Stelle namentlich nennen kann, auch wenn ich das Gefühl hatte in ein Team zu kommen, dass einen mit offenen Armen empfängt und jeder einem hilfsbereit gegenübersteht. Danken möchte ich Herrn Dr. rar. nat. D. Wicklein für die Hilfe und Unterstützung bei den FACS-Analysen. Außerdem gilt mein Dank insbesondere den technischen Mitarbeitern Frau T. Cöllen, Frau S. Feldhaus, Frau R. Gercke, Frau C. Knies, Frau D. Köhler, Herrn C. Köpke und Herrn K. Siebert für deren Hilfe im Rahmen der praktischen Laborarbeit und dafür, dass ich mich willkommen gefühlt habe.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich auch mal abgelenkt und aufgemuntert haben. Dabei stehen an der aller ersten Stelle meine Eltern, ohne die ich nicht wäre was ich bin, die mich immer unterstützt und gefördert haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

X. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tina Wunder