

**Aus dem Institut für Virologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**

**Auswirkungen der Kombination von Reovirus plus Newcastle Disease Virus und Reovirus
plus Parvovirus auf die onkolytische Wirksamkeit in vitro und in vivo**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011**

**vorgelegt von: Muhannad Alkassar
geb. am: 02.11.2011 in Aachen**

MEINEN ELTERN
NASIR UND SAHAR

„Es irrt der Mensch, so lang er strebt“

Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| INHALTSVERZEICHNIS | 3 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 5 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 8 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| I EINLEITUNG | 11 |
| I.1 Das Glioblastom | 11 |
| I.1.1 Regelmechanismen der Proliferation | 13 |
| I.1.2 Ursachen der Glioblastomentstehung | 21 |
| I.1.3 Glioblastomzelllinien U373 und U87 | 23 |
| I.1.4 Konservative Glioblastomtherapie | 25 |
| I.2 Onkolytische Viren | 27 |
| I.2.1 Einsatz onkolytischer Viren zur Glioblastomtherapie | 27 |
| I.2.2 Das Reovirus | 31 |
| I.2.3 Newcastle Disease Virus | 36 |
| I.2.4 Parvovirus | 43 |
| I.3 Zielsetzung | 50 |
| I.4 Fragestellung | 54 |
| II MATERIAL/METHODEN | 55 |
| II.1 Material | 55 |
| II.1.1 Chemikalien/Materialien | 55 |
| II.1.2 Mäuse | 56 |
| II.1.3 Geräte | 57 |
| II.1.4 Puffer und Lösungen | 57 |
| II.1.5 Kulturmedien für Säugerzellen | 58 |
| II.1.6 Nährmedien für Bakterien | 58 |
| II.1.7 Bakterien | 58 |
| II.1.8 Zelllinien | 58 |
| II.1.9 Viren | 59 |
| II.1.10 Nukleinsäure-Extraktion | 59 |
| II.1.11 Reaktionsansätze (Kits) | 59 |
| II.1.12 Vektor pGEM TM -T | 60 |
| II.1.13 Standard-Sequenzen | 61 |
| II.1.14 DNA-Größenmarker | 61 |
| II.1.15 Oligonukleotide | 61 |
| II.1.16 Enzyme | 62 |
| II.1.17 Antikörper | 62 |
| II.1.18 Sequenzierung | 62 |
| II.1.19 Computersoftware | 63 |

| | |
|--|-----|
| II.2 Methoden | 64 |
| II.2.1 Messung des Zellsterbens | 64 |
| II.2.2 Real-Time-PCR (RT) | 65 |
| II.2.3 Extraktion des viralen Genoms aus Zellüberstand | 71 |
| II.2.4 Extraktion, Analyse und Modifikation von Nukleinsäure zur Herst. v. Standardsequenzen | 72 |
| II.2.5 Durchflusszytometrie | 78 |
| II.2.6 Immunhistologie | 80 |
| II.2.7 Konfokale Lasermikroskopie | 81 |
| II.2.8 Zellbiologische Methoden | 82 |
| II.2.9 Mikrobiologische Methoden | 83 |
| II.2.10 Tierexperimentelle Methoden | 84 |
| II.2.11 Virologische Methoden | 86 |
| II.2.12 Auswertung | 93 |
| III ERGEBNISSE | 96 |
| III.1 Auswirkungen einer Kombination onkolytischer Viren in vitro | 96 |
| III.1.1 Absterbekinetik nach Kombination onkolytischer Viren | 96 |
| III.1.2 Beeinflussung des Infektionsmusters nach Kombination | 108 |
| III.1.3 Veränderung der Replikationskinetik durch Kombination | 124 |
| III.2 Zytoskelett-Einfluss auf die Kombination Reovirus plus NDV | 132 |
| III.3 Auswirkungen der Kombination Reovirus plus NDV in vivo | 137 |
| IV DISKUSSION | 143 |
| IV.1 Folgen einer monoviralen Infektion mit Reovirus, NDV und Parvovirus | 143 |
| IV.2 Folgen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus NDV | 145 |
| IV.3 Folgen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus Parvovirus | 151 |
| IV.4 Folgen einer kombinierten Infektion mit Parvovirus plus NDV | 154 |
| IV.5 Zusammenfassung/Ausblick | 155 |
| REFERENZEN | 157 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1: Mitose | 15 |
| Abbildung 2: mTOR | 17 |
| Abbildung 3: p53 | 20 |
| Abbildung 4: Entwicklung primärer und sekundärer Glioblastome | 24 |
| Abbildung 5: Virusabwehr | 29 |
| Abbildung 6: Infektionszyklus von Reovirus | 35 |
| Abbildung 7: Infektionszyklus von NDV | 42 |
| Abbildung 8: Infektionszyklus von Parvovirus H1 | 49 |
| Abbildung 9: Resistenzentstehung in Glioblastomzellen | 53 |
| Abbildung 10: pGEM Vektorkarte | 60 |
| Abbildung 11: Real Time PCR | 69 |
| Abbildung 12: Beimpfung von Embryonen mit NDV | 88 |
| Abbildung 13: NDV-Aufreinigung | 90 |
| Abbildung 14: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U87-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus | 99 |
| Abbildung 15: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U373-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus | 100 |
| Abbildung 16: Vergleich des Anteils überlebender U87-Zellen 72 h nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus, Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1 | 103 |
| Abbildung 17: Vergleich des Anteils überlebender U373-Zellen 72 h nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus, Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1 | 104 |
| Abbildung 18: Unterschiede im Zellsterben zwischen den Zelllinien U87 und U373 nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus | 105 |
| Abbildung 19: Unterschiede im Zellsterben zwischen den Zelllinien U87 und U373 nach Infektion mit Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1 | 106 |
| Abbildung 20: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U87-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus | 107 |
| Abbildung 21: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U373-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus | 108 |
| Abbildung 22: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV | 110 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 23: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Parvovirus _____ | 111 |
| Abbildung 24: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus _____ | 112 |
| Abbildung 25: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV, Reovirus und Parvovirus _____ | 113 |
| Abbildung 26: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus plus NDV _____ | 115 |
| Abbildung 27: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus plus Parvovirus _____ | 116 |
| Abbildung 28: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV plus Reovirus und Reovirus plus Parvovirus _____ | 117 |
| Abbildung 29: FACS-Analyse infizierter U87-Zellen nach Behandlung mit Reovirus, NDV und Parvovirus _____ | 120 |
| Abbildung 30: FACS-Analyse infizierter U87-Zellen nach Behandlung mit Reovirus plus NDV, Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus _____ | 121 |
| Abbildung 31: Anteil infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit Reovirus, Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus durch FACS-Analyse _____ | 122 |
| Abbildung 32: Anteil infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit NDV, NDV plus Reovirus und NDV plus Parvovirus durch FACS-Analyse _____ | 122 |
| Abbildung 33: Anteil infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit Parvovirus, Parvovirus plus Reovirus und NDV plus Parvovirus durch FACS-Analyse _____ | 123 |
| Abbildung 34: Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV _____ | 125 |
| Abbildung 35: Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit NDV alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/Reovirus _____ | 126 |
| Abbildung 36: Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Parvovirus alleine oder in dualer Kombination mit Reovirus/NDV _____ | 127 |
| Abbildung 37: Unterschiede in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV _____ | 128 |
| Abbildung 38: Unterschiede in der Freisetzung von NDV ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV _____ | 129 |
| Abbildung 39: Unterschiede in der Freisetzung von Parvovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV _____ | 130 |
| Abbildung 40: Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus und Reovirus plus NDV _____ | 134 |
| Abbildung 41: Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus oder NDV ____ | 135 |
| Abbildung 42: Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus plus NDV ____ | 136 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 43: Tumorgröße nach intratumoralen Applikation von Reovirus, NDV und der Kombination Reovirus plus NDV _____ | 138 |
| Abbildung 44: Tumorgröße nach intratumoralen Applikation von Reovirus, NDV und der Kombination Reovirus plus NDV _____ | 139 |
| Abbildung 45: Anteil infizierter Tumorzellen nach Behandlung mit Reovirus, Reovirus plus NDV durch FACS-Analyse _____ | 140 |
| Abbildung 46: Anteil infizierter Zellen im Tumorgewebe mit Reovirus NDV oder Reovirus plus NDV behandelte Mäuse _____ | 141 |
| Abbildung 47: Beeinflussung der Apoptose durch kombinierte Infektion von Reovirus plus NDV _____ | 150 |
| Abbildung 48: Auswirkungen einer Kombination von Reovirus plus Parvovirus _____ | 153 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Neue Glioblastommedikamente | 26 |
| Tabelle 2: Natürlich onkolytische Viren. | 30 |
| Tabelle 3: Verwendete Zelllinien | 58 |
| Tabelle 4: Primer-Sequenzen | 61 |
| Tabelle 5: Restriktionsenzyme | 77 |
| Tabelle 6: Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 bei verschiedenen Konzentrationen | 101 |
| Tabelle 7: Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus NDV und einer Infektion mit Reovirus oder NDV alleine | 101 |
| Tabelle 8: Kombinationsindex (CI) | 101 |
| Tabelle 9: Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus Parvovirus und einer Infektion mit Reovirus oder Parvovirus alleine | 102 |
| Tabelle 10: Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit NDV plus Parvovirus und einer Infektion mit NDV oder Parvovirus alleine | 102 |
| Tabelle 11: Signifikanztestung der Unterschiede in der Infektionsrate zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 bei verschiedenen Konzentrationen | 123 |
| Tabelle 12: Signifikanztestung der Änderung der Infektionsrate nach Kombination von NDV, Reovirus und Parvovirus | 123 |
| Tabelle 13: Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen U87- und U373-Zellen nach Infektion mit Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und in dualer Kombination | 130 |
| Tabelle 14: Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelten Zellen. Reovirus und NDV | 131 |
| Tabelle 15: Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelten Zellen. Reovirus und Parvovirus | 131 |
| Tabelle 16: Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelten Zellen. NDV und Parvovirus | 131 |
| Tabelle 17: Virustiter von Reovirus und NDV in Tumor, Leber und Blut von SCID/NOD Mäusen nach Infektion mit Reovirus und NDV jeweils allein und in Kombination | 142 |

Zusammenfassung

Viren, die in der Lage sind, spezifisch in Tumorzellen zu replizieren und diese zu zerstören, werden als onkolytische Viren bezeichnet. Reovirus, Newcastle Disease Virus (NDV) und Parvovirus H1 besitzen ausgeprägte onkolytische Eigenschaften. Besonders ihre gute Wirksamkeit in höhergradigen astrozytären Malignomen konnte in verschiedenen Studien in vitro und in vivo hinreichend belegt werden. Dennoch war keines der Viren im klinischen Einsatz bei Glioblastompatienten annähernd so effektiv wie in den zuvor untersuchten Zellmodellen. Ähnlich wie beim alleinigen Einsatz eines Chemotherapeutikums oder der Strahlentherapie scheinen Tumorzellen nach Behandlung mit onkolytischen Viren Resistenzmechanismen zu entwickeln. Wir untersuchten die Auswirkungen einer Kombinationstherapie an den beiden Glioblastomzelllinien U87 und U373. Hierbei konnten wir nachweisen, dass die Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus zu einem synergistischen Absterben behandelter Zellen führt. Die Kombination von Reovirus plus NDV konnte -ohne mit einem Anstieg der Viruslast einherzugehender- einen äußerst ausgeprägten synergistischen Effekt erzielen. Der fluoreszenzimmunologische Nachweis der simultanen intrazellulären Replikation beider Viren lässt dabei den Schluss einer intrazellulären Beeinflussung als Ursache für ein gesteigertes Zellsterben zu. Dieser Effekt ließ sich auch in vivo an subkutanen Tumoren von Xenograft-SCID/NOD Mäusen bestätigen.

Die Kombination Reovirus plus Parvovirus hingegen führte zu einer Zunahme der Replikation von Parvovirus und des Anteils Parvovirus-infizierter Zellen. Allerdings konnte auch hier eine fast vollständige Infektion mit beiden Viren nachgewiesen werden, sodass der synergistische Effekt wahrscheinlich mehreren Einflussfaktoren unterliegt.

Interessanterweise bewirkte die Kombination Parvovirus plus NDV eine Verschlechterung des Absterbens infizierter U87- und U373-Zellen. Die Replikation von Parvovirus konnte hierdurch fast vollständig inhibiert werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Versuch einer Kombination unterschiedlicher onkolytischer Viren beschrieben. Die Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus stellen hierbei äußerst vielversprechende Ansätze nicht nur für die Therapie von Glioblastomen, sondern auch von anderen hochmalignen Tumoren dar.

Abstract

Oncolytic viruses are able to replicate very specifically in tumor cells and destroy them without harming healthy cells. Newcastle Disease Virus, Reovirus and Parvovirus H1 are very potent oncolytic viruses. Several in vitro and in vivo studies provide sufficient documentation of their high effectivity in higher grade astrocytoma. Nevertheless, when used in clinical studies none of the viruses was able to prove the good results seen in vitro. It seems that infected cells develop resistances similar to those developed to a therapy with chemotherapy or radiotherapy alone.

We investigated the effects of a combination therapy with two oncolytic viruses in the glioma cell lines U87 and U373. In doing so, we have proved that the combinations of Reovirus plus NDV and of Reovirus plus Parvovirus show synergistic effect on cell killing. While the infection of cells with Reovirus plus NDV caused no increase in virus titer there was a strong and noticeable synergistic effect on these cells.

Simultaneous intracellular replication of both viruses could be proved by immunofluorescence thus leading to the conclusion that the increased cell killing is caused by the interference of those viruses with intracellular processes. This effect is corroborated by in vivo studies of subcutaneous tumors in Xenograft-SCID/NOD mice resulting in the same effect. However, the combination Reovirus plus Parvovirus resulted in an increased parvovirus titer and also an increased proportion of cells infected with parvovirus. Admittedly, here also a nearly complete infection of all cells with both viruses could be seen which is why the synergism is likely to be the result of different influencing factors in this combination.

Interestingly, the combination of Parvovirus plus NDV resulted in a decrease in oncolytic capacity to kill infected U87- and U373-cells. Hereby the replication of parvovirus was nearly completely inhibited.

Our work is the first attempt ever to describe the effects of infecting tumor cells with a combination of two different oncolytic viruses simultaneously. It shows that the combinations Reovirus plus NDV and Reovirus plus Parvovirus represent a highly promising approach to the therapy of glioblastomas as well as other high malignant tumors.

I Einleitung

I.1 Das Glioblastom

Die Unterteilung des Nervensystems in Neurone und Gliazellen wurde bereits vor über 150 Jahren von Rudolph Virchow (1821-1902) vorgenommen. Damals erfolgte die Differenzierung anhand der lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Unterschiede zwischen beiden Zellpopulationen. Im Laufe der Zeit erkannte man, dass diese Unterschiede auch funktioneller Natur sind. Das komplexe Interaktionssystem von Neuronen miteinander erlaubt den Aufbau eines zentralen Steuerungs- und Weiterleitungsgefüges, welches die Entstehung höher organisierter Tierspezies erst möglich macht. Gliale Zellen werden zur Einbettung dieser Neurone in ein Struktur- und Gerüstsystem benötigt. Embryologisch entwickeln sich sowohl neuronale als auch gliale Zellen aus Neuroblastenvorläuferzellen des Neuroepithels, und bilden unterstützt durch gegenseitige Feedbackmechanismen ein System starker morphologischer und funktioneller Abhängigkeit aus.

Aus den glialen Zellen entstehen im Zuge der weiteren embryonalen Differenzierung Oligodendrozyten- bzw. Schwann-Zellen und Astrozytenzellen. Die Oligodendrozyten des Zentralnervensystems und deren peripheres Korrelat, die Schwann Zellen, sorgen durch Umhüllung der neuronalen Fortsätze für die notwendige Isolierung und somit Optimierung der Reizweiterleitung. Astrozyten hingegen sind die eigentlichen Steuermodule des Zentralen Nervensystems, ihnen kommt die komplexe Aufgabe der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns zu. Das heißt, die Koordinierung der Feinregulation von vielen Tausenden Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen wird durch sie bestimmt. Dementsprechend sind diese Zellen sehr anfällig für maligne Zelltransformationen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass über 65% aller menschlichen Hirntumore astrozytären Ursprungs sind. Bis vor wenigen Jahren wurden entdifferenzierte mature Astrozytenzellen als Vorläuferzellen für die Entstehung von astroglialen Tumoren angesehen. Seit der Entdeckung glialer Stammzellen mehren sich jedoch die Hinweise dafür, dass es sich bei den Vorläuferzellen um entartete astrogliale Stammzellen handelt¹.

Ausgehend von ihrer Malignität lassen sich die Astrozytome in 4 Grade einteilen. Grad I-Astrozytome gelten dabei als benigne umschriebene Neoplasien, die sich jedoch durch Erwerb neuer Gendefekte zu Grad II Astrozytomen weiterentwickeln können. Aus den

Einleitung

meisten Astrozytomen Grad II entstehen ohne Behandlung innerhalb von 5-10 Jahren anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und im weiteren Verlauf Glioblastome (Grad IV Astrozytome²; Abbildung 4). Als Glioblastome werden die aggressivsten Tumore astroglialen Ursprungs definiert. Sie weisen sowohl histologisch als auch molekularbiologisch eine ausgeprägte Heterogenität auf. Kennzeichnend für alle Glioblastome ist ihre hohe Proliferationsrate und ein hoher Anteil undifferenzierter Zellen mit ausgedehnten intratumoralen Nekroseherden. Eine ausgeprägte Angiogenese, welche oft eng in Nachbarschaft mit einem Nekroseareal gefunden wird, führt zu einer sehr multiformen Erscheinung, weshalb häufig von einem Glioblastoma multiforme gesprochen wird. Der immunhistologische Nachweis einer gesteigerten Proliferation erfolgt in der Regel durch Antikörper gegen das Zyklusprotein Ki67. Das Zytoskelettprotein GFAP (Intermediärprotein), welches Glioblastomzellen häufig stark überexprimieren, wird ebenfalls als immunhistologischer Marker für die Diagnostik herangezogen².

Schon sehr früh klassifizierte man Glioblastome entsprechend ihres Entstehungsmechanismus in primäre und sekundäre Glioblastome. Als primäre Glioblastome werden maligne Tumore, die de novo direkt aus astroglialen Tumorvorläuferzellen entstehen, bezeichnet. Bei sekundären Glioblastomen handelt es sich hingegen um Grad IV Astrozytome, die sich durch zunehmende Entartung niedermaligner Astrozytome bilden³. Auch molekularbiologisch zeigt sich das Glioblastom keinesfalls als einheitliche Tumorentität. Dennoch lassen sich bei genauer Betrachtung die molekularbiologischen Veränderungen der Glioblastome in Gruppen mit wesentlichen Gemeinsamkeiten zusammenfassen.

Die Prognose des Glioblastoms ist schlecht: Bei unselektierten Patienten liegt der Median der Überlebenszeit trotz Therapie unter 12 Monaten^{4,5}. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 45 und 60 Jahren, wobei auch Kinder betroffen sein können. Anders als bei Erwachsenen, bei denen das primäre Glioblastom dominiert, findet man bei Kindern meist einen sekundären Entstehungsmechanismus. Ein weiterer Unterschied besteht in der Auftretenshäufigkeit kindlicher und adulter Glioblastome. Obwohl auch bei Kindern Astrozytome mit Abstand die häufigste Hirntumorentität darstellen (> 60% aller Hirntumore), machen Glioblastome nur einen Bruchteil der kindlichen Hirntumore aus⁶.

Einleitung

Der stark infiltrierende Charakter des Glioblastoms macht eine vollständige Tumorresektion unmöglich. Durch neurochirurgische Tumorsanierung und anschließende lokale Strahlentherapie erreicht man im Schnitt eine Lebensverlängerung von weniger als 12 Monaten, d. h. bisher kann das Glioblastom lediglich palliativ behandelt werden. Die Heterogenität der Genmutationen und das schlechte Therapieansprechen machen diesen Tumor für viele Forscher äußerst interessant. Obwohl Glioblastome verschiedener Patienten sich bezüglich ihrer auslösenden Gendefekte stark unterscheiden können, gleichen sie sich in ihrer Histologie und in ihrem klinischen Verlauf. Durch Erforschung dieser scheinbar unabhängigen Defekte, die alle letzten Endes zur Entstehung von Zellverbänden mit starker Proliferation und Vaskularisation führen, konnten in den letzten Jahren viele Erkenntnisse bezüglich der zellulären Regulationsmechanismen gesunder Zellen gewonnen werden⁷. Eine weitere Eigenschaft ist die sehr rasche Resistenzentwicklung der Glioblastomzellen gegen herkömmliche Therapiestrategien. Durch das bessere Verständnis der molekularbiologischen Zusammenhänge konnten in den letzten 15 Jahren eine Reihe von maßgeschneiderten Medikamenten für das Glioblastom entwickelt werden¹ (Tabelle 1). Die bisher durchgeführten Versuche zeigen allerdings auch hier nur einen sehr begrenzten klinischen Erfolg.

I.1.1 Molekularbiologische Regelmechanismen der Proliferation

Wachstum und Differenzierung unterliegen verschiedenen zellulären Steuermechanismen. Im gesunden Gewebe erfolgt die Regulierung durch extra- und intrazelluläre Signale. Fehlfunktionen in Proliferation-assoziierten Genen können die Entstehung und das Wachstum von Neoplasien verursachen. Hierbei unterliegt das Tumorstadium nicht mehr den physiologischen Kontrollmechanismen, sondern erfolgt autonom. Es wird davon ausgegangen, dass die Tumorgenese ein mehrstufiger Prozess ist, in deren Verlauf ein initiales Mutationsereignis die folgenden begünstigt⁸. Anhand des Glioblastoms lässt sich die stufenweise Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Zelle besonders gut darstellen. Die Proliferation einer Zelle wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Regelsysteme beeinflusst. Im Wesentlichen lassen sich diese entsprechend der zu regelnden Zielgröße in drei Instanzen aufteilen:

Einleitung

1. Proliferationsinduktion mit separater Induktion von Mitose und Wachstum
2. Zellzyklusregulation und
3. p53-System zur Kontrolle des Zellzyklus und der Möglichkeit zur DNA-Reparatur und Apoptoseinduktion.

Allerdings hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass die einzelnen Regelsysteme nicht vollständig getrennt voneinander betrachtet werden können, sondern teilweise sehr komplexe Wechselwirkungen miteinander eingehen. Um zu verstehen, warum scheinbar völlig verschiedene Gendefekte zur Ausbildung von Glioblastomen führen, die sich weder morphologisch noch in ihrem klinischen Verlauf unterscheiden, müssen zunächst die Prinzipien der zellulären Proliferation beleuchtet werden.

Grundvoraussetzung für den Eintritt einer Zelle aus der G₀-Phase in den Zellzyklus sind Proliferationsfaktoren. Hierbei handelt es sich um extrazelluläre Faktoren des umgebenden Gewebes, wie beispielsweise EGF, VEGF oder PDGF, die nach Anbinden an spezifische extrazelluläre Rezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen, RTK) eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade initiieren und schließlich zur Induktion von Zellzyklusproteinen und somit zur Einleitung der Gegenstrangsynthese (S-Phase des Zellzyklus) und im Anschluss zur Mitose (M-Phase des Zellzyklus) führen (Abbildung 1). Abhängig von Rezeptor und Zelltyp können dabei sehr verschiedene intrazelluläre Kaskaden aktiviert werden. Die GTPase RAS ist bei den meisten Kaskaden das Schlüsselenzym der Signalübermittlung. Aktiviertes RAS bewirkt durch Anschalten der MAP-Kinase die Induktion des Genregulatorproteins Myc⁹. Hierdurch wird die Expression einer ganzen Reihe weiterer Proteine getriggert, die schließlich die Kinaseaktivität der Cyclin-abhängigen Kinase G1-Cdk in Gang setzt¹⁰. Die Phosphorylierung des an E2F gebundenen Retinoblastom-Proteins (Rb) durch G1-Cdk führt zur Abspaltung des Transkriptionsfaktors E2F, der die S-Phase und somit den Zellzyklus initiiert¹¹. Im Normalfall liegt E2F am Retinoblastom (RB)-Protein gebunden vor. In diesem Zustand ist E2F nicht aktiv. Die Proteine p16 und p21 können die Freisetzung von E2F durch Inaktivierung des G1-Cdk-Komplexes inhibieren und sind die Endstrecke einiger Zellzyklus-hemmender Regulationsmechanismen.

Einleitung

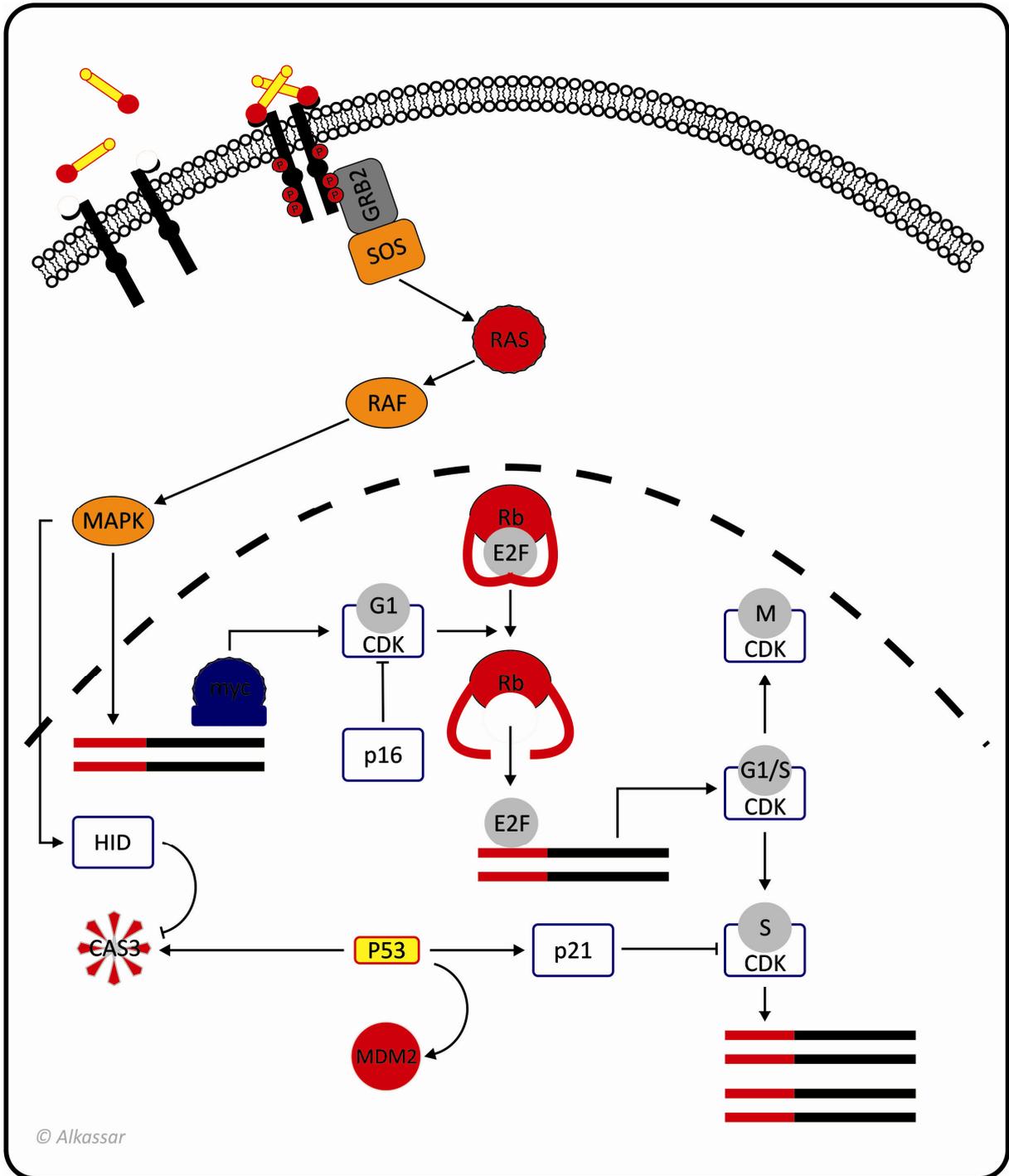


Abbildung 1: Signalkaskade zur Aktivierung der Mitose mittels Rezeptortyrosinkinasen

Einleitung

Bei Proliferation von Zellen kommt es in der Regel sowohl zu einer Zellteilung als auch zum Zellwachstum. Die Induktion durch Mitosefaktoren alleine reicht allerdings in der Regel nicht aus um den Zellzyklus aufrechtzuerhalten, eine Zellteilung ohne gleichzeitige Bereitstellung von zellulären Baustoffen würde unweigerlich zu immer kleiner werdenden Zellen führen. Eine gesunde Zelle kann nur durch ein vorheriges positives Feedback über die Nährstoffsituation in der Zelle die Freigabe für die Proliferation erteilen¹². Andererseits muss der gesteigerte Grundumsatz bei proliferierenden Zellen entsprechend angepasst werden. Es hat sich herausgestellt, dass der Proteinkinase mTOR eine zentrale Rolle bei der Wachstumsregulation zukommt. Die Hauptaufgabe von mTOR besteht in der Initiierung der zellulären Translationsmaschinerie (Abbildung 2). Durch Aktivierung des eukaryoten Initiationsfaktors eIF4E sowie der Steigerung der Synthese ribosomaler Proteine wird die Zelle in Synthesebereitschaft gestellt. Des Weiteren hemmt mTOR sehr effektiv die Apoptose durch Aktivierung des Caspase-3-Inhibitors XIAP. Zur Aktivierung von mTOR bei einer gesunden Zelle werden extrazelluläre Wachstumsfaktoren benötigt. Anders als die kinasevermittelte Signalweiterleitung, führt die Aktivierung der entsprechenden Wachstumsrezeptoren (beispielsweise Insulin-like Growth Factor Receptor (IGFR)) zu einer PIP3-vermittelten Signalweiterleitung und schließlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase AKT¹³. Zusammen mit dem Anstieg der intrazellulären Nährstoffkonzentration führt AKT zur Aktivierung von mTOR. Neben der aktiven Regulation durch extrazelluläre Reize wird das Zellwachstum maßgeblich durch das Protein PTEN beeinflusst. Durch Inhibierung von AKT kann das Wachstum auch unter Vorhandensein entsprechender Wachstumsfaktoren und Nährstoffen durch den Faktor PTEN blockiert werden¹⁴.

Einleitung

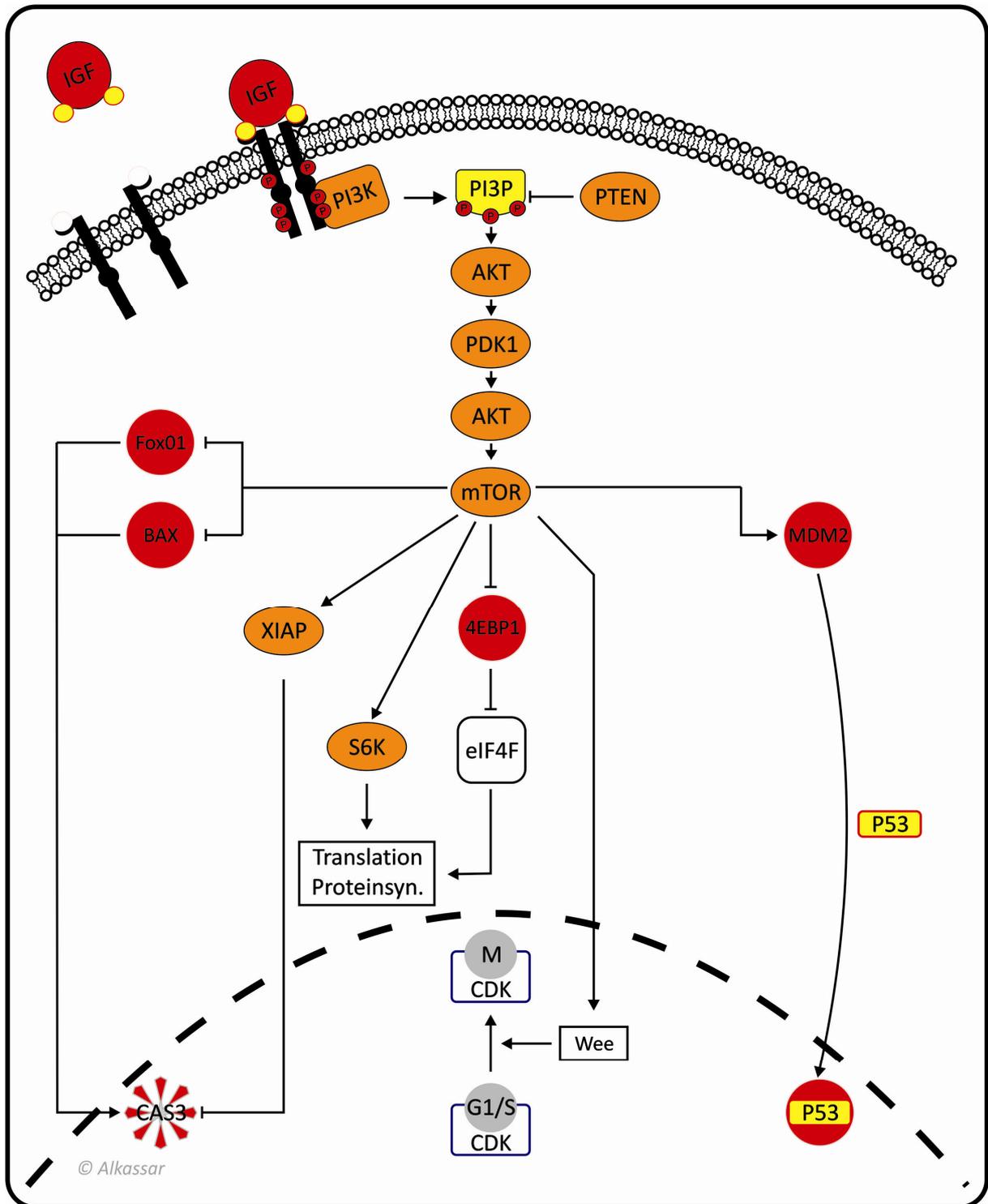


Abbildung 2: mTOR und dessen zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation

Einleitung

Zur Koordination von Mitose und Wachstum und zur adäquaten Reaktion auf Umweltreize besitzen Zellen ein komplexes Kontrollsystem, welches eine Proliferation erst nach genauer Prüfung der Ressourcen sowie Gesundheit der Zelle erlaubt. Dabei spielt das Protein p53 die Schlüsselrolle. An genau definierten Abschnitten des Zellzyklus, den sogenannten Checkpoints, erfolgt unter p53-Leitung ein Stopp und gegebenenfalls die Reparatur von DNA-Mutationen bzw. bei irreparablen Schäden die Einleitung der intrinsischen Apoptose¹⁵. Dabei vermag das Protein p53, ähnlich einem Dirigenten in einem Orchester, sehr verschiedene Zellsysteme mit teilweise gegensätzlicher Wirkung aufeinander abzustimmen. Hierfür werden afferente Signale, die den momentanen Zustand der Zelle wiedergeben, ausgewertet und anschließend durch Aktivierung oder Hemmung von p53 die Proliferation fortgesetzt oder gestoppt und die Apoptose eingeleitet¹⁶. Zu den wichtigsten afferenten Signalen zählt das Reparatursystem ATM/ATR, welches durch DNA-Brüche im Genom aktiviert wird¹⁷. Moleküle der Mitose- und Wachstums-Signalkaskade wie myc oder AKT beeinflussen ebenfalls entscheidend die Sensitivität der p53-Kontrollinstanz⁹. In inaktivem Zustand liegt p53 an das Protein MDM2 gebunden vor. Afferente Signale bewirken eine Phosphorylierung von p53 und durch die damit verbundene Konformationsänderung eine Trennung vom MDM2-Protein. Das nun freie p53-Protein wandert in den Zellkern ein und entfaltet seine Wirkung als Transkriptionsfaktor. Welche Gene im Einzelnen transkribiert werden hängt von vielen weiteren Faktoren ab, beispielsweise Zelltyp, Entwicklungsstadium, Grad des vorliegenden Zellschadens und vielem mehr. Durch die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von p53 über die afferenten Systeme können somit eine Zustandsmessung der genetischen Gesundheit eruiert und entsprechende Regulationsmechanismen angeschaltet werden. Im Wesentlichen vermag das p53-Protein drei Zellsysteme zu aktivieren (Abbildung 3):

1. DNA-Reparatur
2. Zellzyklusstopp und
3. Apoptose.

Werden beispielsweise vermehrte DNA-Brüche im Genom registriert, bewirkt aktiviertes p53 zunächst eine Arretierung der Zelle im G1/S-Checkpoint durch das Protein p21. Anschließend wird die Synthese von Proteinen induziert, die eine DNA-Reparatur vorantreiben. Bei

Einleitung

erfolgreicher Reparatur wird p53 inaktiviert und der Zellzyklus kann mit der Duplikation der DNA beginnen (Synthesephase). Bei irreparablen DNA-Schäden erfolgt die Promotoraktivierung des Bcl-Proteins Bax von der intrinsischen Apoptose, sowie der Expression des Transkriptionsfaktors FoxO1, der die extrinsische Apoptose durch FAS-Produktion induziert. Sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Apoptose enden in der Aktivierung von Caspase 3, welches den Zelltod einleitet. In gesunden Zellen kann aktives p53 allerdings auch durch Induktion des Proteins Bcl 2 eine Apoptose-hemmende Wirkung entfalten¹⁸. Schnell proliferierende Zellen hemmen aktiv die Phosphorylierung von p53 und unterstützen somit eine kontrollfreie schnellere Zellteilung, die sorgfältige Kontrolle steigert allerdings auch die Rate an Genom-Mutationen.

I.1.2 Molekularbiologische Ursachen der Glioblastomentstehung

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die drei wesentlichen Regelsysteme, die zur Proliferation gesunder Zellen notwendig sind, vorgestellt, um das Verständnis der Entstehung von Glioblastomen durch sehr verschiedene Gendefekte zu erleichtern. Die Entwicklung glialer Vorläuferzellen zu Glioblastomen wird Gliomatose genannt. Allen Glioblastomen gemeinsam sind Defekte in mindestens zwei der drei oben besprochenen Regulationsmechanismen, die in der Endstrecke die Proliferation regulieren. Am Anfang der Gliomatose stehen dabei stets Defekte, die eine Daueraktivierung der Mitose- oder der Wachstumskaskade zur Folge haben¹⁹. Allerdings führt erst der Ausfall einer der Zellzykluskontrollinstanzen p53/MDM2, p16 oder Rb/E2F im nächsten Schritt zur malignen Transformation²⁰. Hyperproliferation zusammen mit fehlender Kontrollmöglichkeit führt zur Anhäufung schwerer Genomdefekte in den malignen Tochterzellen. Häufig sind hiervon Schlüsselfaktoren der Zellzyklusregulation betroffen, sodass es im Rahmen der Gliomatose praktisch immer zu einer Anhäufung von Mitosefehlern kommt. Ein Verlust des Tumorsuppressor-Proteins Rb beispielsweise führt zu einer Daueraktivierung des Initiatorproteins der Synthesephase E2F. Dauerhaft aktiviertes E2F hemmt allerdings auch durch Inaktivierung des APC/C Komplexes die korrekte Einleitung der Mitose. Ohne aktives APC/C lassen sich die Schwesterchromatiden nicht mehr effektiv trennen, was zu Segregationsfehlern führt²¹. Bei gleichzeitigem Ausfall der Kontrollfunktion von p53 können Zellen mit solchen schweren Chromosomenaberrationen überleben und die Mutationen an die Tochterzellen weitergeben. Dies erklärt den häufig anzutreffenden polyploiden Karyotyp bei Glioblastomzellen.

Wie schon zuvor besprochen erfolgte bereits sehr früh durch klinische Beobachtung die Einteilung in Glioblastome primären und sekundären Ursprungs (Abbildung 4). Molekularbiologische Untersuchungen bestätigen diese Klassifizierung. Eine durch EGFR-Fehlfunktion getriggerte Mitoseinduktion findet sich in fast allen primären Glioblastomen. Hierbei dominieren vor allem eine amplifikationsbedingte Überexpression des EGFR-Rezeptors sowie Mutationen, die zu einer dauerhaften EGFR-Aktivierung führen wie beispielsweise die EGFRvIII-Mutation^{22, 23, 24}. Die Inaktivierung des Kontrollproteins p53 erfolgt meist durch MDM2-Überexpression²⁵. Weiterhin findet sich in ca. 80% der Glioblastomzellen eine Daueraktivierung des Wachstumssignalfaktors AKT²⁶. Hierbei handelt es sich meist um Defekte des auf AKT inhibierend wirkenden Proteins PTEN²⁷. Fast immer

Einleitung

kann dabei eine Loss of heterozygosity (LOH) von 10q23, dem Genabschnitt der für PTEN kodiert, gefunden werden²⁸. Mutationen in Genen mit direkter Zellzyklussteuerung, wie beispielsweise des Tumorsuppressorgens Rb oder p16 finden sich erst zu einem späten Zeitpunkt der Gliomatose. Auch bei sekundären Glioblastomen kommt es zunächst zu einer Überaktivierung des Mitosesignalweges und somit von RAS, hier allerdings meist durch Amplifikation des Tyrosinkinaserzeptors PDGF²⁹.

Anders als in primären Glioblastomen sind in sekundären Glioblastomen direkte Mutationen des Gens TP53 für die Funktionslosigkeit des Tumorsuppressorproteins p53 verantwortlich³⁰. Die restlichen anzutreffenden Defekte verteilen sich ähnlich wie bei primären Glioblastomen, hierbei findet man ebenfalls in ca. 50 % der Tumore LOH des Chromosoms 10q23 (PTEN) oder Mutationen der Gene der Tumorsuppressorproteine Rb bzw. p16.

Der multiforme Charakter des Glioblastoms entsteht infolge des schnellen Wachstums und der damit verbundenen Hypoxie, sowie Nekrose im Tumorgewebe und korreliert nicht mit seinem genetischen Ursprung. Die Unterversorgung mit Sauerstoff führt zu einer starken Überexpression von VEGF und VEGFR auf der Tumoroberfläche und infolgedessen zur Angiogenese der angrenzenden Gefäße³¹. Die VEGFR-Expression kann erst durch eine eingeschaltete Signalkaskade (RAS, mTOR) aktiviert werden. Ein Verlust von Tumorsuppressorgenen in malignen Glioblastomzellen ist nicht nur die Folge von Deletionen, sondern wird häufig auch durch Hypermethylierung von Tumorsuppressor-Promotorregionen verursacht. Hierdurch kommt es zu einer vollständigen Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens. Beispielsweise findet man bei vielen resistenten Glioblastomen eine Hypermethylierung der Region 9p21. In dieser Region befinden sich die Gene der Tumorsuppressorproteine p16 und ARF. Indem ARF an MDM2 bindet und p21 freisetzt, wirkt es einer übersteuerten Signalkaskade mit hoher myc-Expression entgegen. Eine starke Aktivierung von E2F durch fehlende p16-Hemmung bei eingeschalteter Signalkaskade, sowie der Verlust einer p21-Aktivierung durch ARF führen zu unkontrollierten Zellteilungen (Abbildung 3).

Gleichzeitig weisen die restlichen Bereiche des Tumorgenoms häufig eine Hypomethylierung auf. Hypomethylierte DNA ist insgesamt viel anfälliger für Mutationen, sodass es in diesen Abschnitten zur Anhäufung von Mutationen kommt.

I.1.3 Auswahl der Glioblastomzelllinien U373 und U87 für die onkolytischen Versuche

Um eine repräsentative Wirksamkeit einer neuen Therapie bei Glioblastomen zeigen zu können, ist es angesichts der Heterogenität der auslösenden Gendefekte wichtig, eine Reihe von Glioblastomen unterschiedlicher Herkunft für die Versuche zu verwenden. Wie die Studien von Piiper et al zeigten sind etablierte Glioblastomzelllinien durchaus in der Lage ihren Ursprungstumor zu repräsentieren³². Für unsere Versuche wählten wir jeweils stellvertretend für primäre und sekundäre Glioblastome die Zelllinien U87 und U373. Beide weisen typische Defekte in den oben beschriebenen Regulationsmechanismen der Proliferation auf. Bei beiden Zelllinien lässt sich eine Steigerung der RAS-Aktivität finden. Bei der Zelllinie U87 sorgt die gesteigerte EGFR-Amplifikation, bei U373 hingegen die gesteigerte PDGFR-Amplifikation für die entsprechende Aktivierung der Proliferation- und Wachstumskaskade^{33 34}. Auch die Expression der Zellkontrollinstanz p53 entspricht für beide Zelllinien der Unterteilung in primäre und sekundäre Glioblastome. Die einer primären Glioblastomzelllinie entstammenden U87-Zellen sind in der Lage ein Wildtyp-p53-Protein zu exprimieren, wohingegen die sekundäre Glioblastomzelllinie U373 ein mutiertes p53-Gen ausweist³⁵. Im Gegensatz zu U87 lässt sich bei den Zellen der U373-Zelllinie infolge eines Defektes FAS-Proteins keine extrinsische Apoptose induzieren^{36 37}.

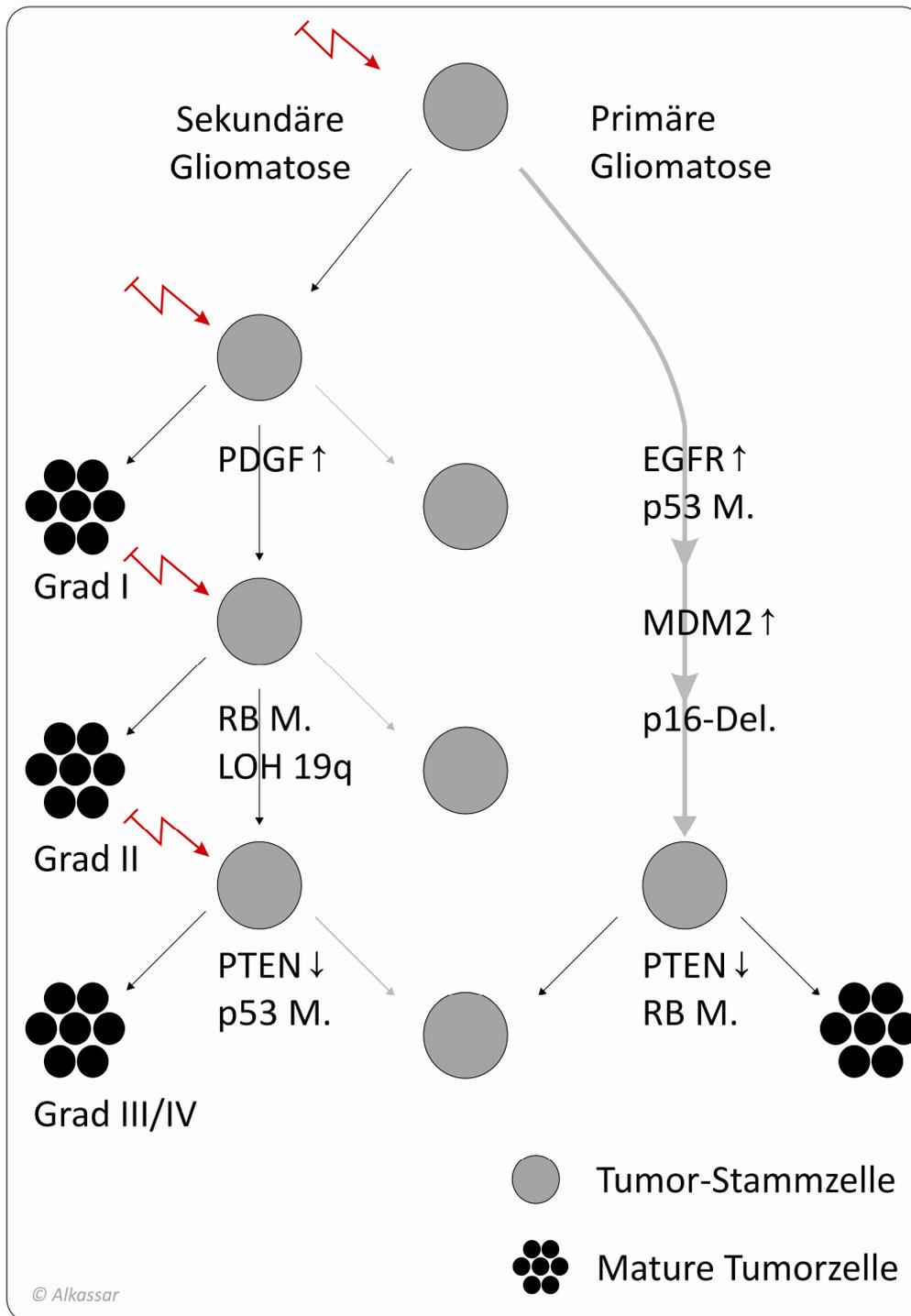


Abbildung 4: Modell der Entwicklung primärer und sekundärer Glioblastome aus glialen Stammzellen.

I.1.4 Konservative Glioblastomtherapie

Trotz tiefgreifender Erfolge in der Krebstherapie bei anderen Malignomen durch Einsatz von Therapieprotokollen, in denen Bestrahlung, chirurgische Therapie und Chemotherapie in jahrelangen Randomisationsstudien optimiert wurden, hat sich die durchschnittliche Überlebenswahrscheinlichkeit behandelter, an Glioblastom erkrankter Patienten in den letzten 50 Jahren nahezu nicht verändert³⁸. Weiterhin hängt die Überlebensprognose am stärksten vom Grad der chirurgischen Tumorsanierung ab. Alle verwendeten Chemotherapeutika wirken nicht speziell auf maligne Zellen, sondern entfalten ihre tumorspezifische Wirksamkeit erst durch die Ausnutzung der Anfälligkeit hoch proliferierender Zellen. Zu den häufigsten eingesetzten Substanzen gehören DNA-schädigende Substanzen wie N-Nitroseharnstoffderivate (BCNU, CCNU), Platinderivate (Cisplatin/Carboplatin), Camptothecine (Topotecan) und Temozolomid, sowie seit wenigen Jahren Taxane. Die Wirksamkeit dieser Substanzen liegt in der Störung der Replikation und Induktion von Doppelstrangbrüchen. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des AMT/ART Reparatursystem. Sind die Defekte stark genug, kann das aktivierte Reparatursystem auch unter Umgehung von p53 die Apoptose induzieren und so zum Untergang der malignen Zellen führen³⁹ (Abbildung 3). Dasselbe Prinzip liegt einem strahleninduzierten Zelltod zugrunde. Infolge der Strahlung kommt es auch hier zu Doppelstrangbrüchen im Tumor-Genom. Durch Kombination einiger Chemo- und Strahlen-Therapien lässt sich häufig eine additive oder sogar synergistische Wirkung erzielen⁴⁰. Anfangs greift die Therapie immer und es kommt zu einem ausgeprägten Zelluntergang der malignen Zellen. Eine ganze Reihe an Forschungsarbeiten haben sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten mit den Ursachen für die Entstehung von Resistenzmechanismen bei Glioblastomen beschäftigt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass allen Mechanismen die Umgehung der Apoptose gemeinsam ist. Dies kann zum einen durch Verbesserung der DNA-Reparatur erreicht werden (z.B. durch Erhöhung der Alkyl-Guanin-DNA Alkyltransferase (MGMT)) oder durch bessere Hemmung der Apoptose⁷. Obwohl die meisten Glioblastome bereits vor der ersten Chemotherapiegabe eine Störung in der p53-Kontrollinstanz haben, führt eine ausgeprägte DNA-Schädigung dennoch zur Induktion der Apoptose. Tumorzellen mit stark aktiviertem AKT/mTOR sind in der Lage, die intrinsische Apoptose direkt durch Induktion antiapoptotischer Faktoren, wie XIAP zu hemmen⁴¹ (Abbildung 3).

Einleitung

Die Entdeckung besonders resistenter Zellen in Tumoren mit starker Ähnlichkeit zu glialen Vorläuferzellen ließ in den letzten Jahren die Theorie der Entstehung von Glioblastomen aus mutierten glialen Stammzellen immer glaubwürdiger erscheinen. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass die große Masse an Tumorzellen nicht in der Lage ist eigenständig eine Tumorpheriferation zu induzieren⁴². Ähnlich wie bei gesundem maturem Gewebe einige wenige Stammzellen angetroffen werden, findet man auch im Tumorgewebe des Glioblastoms eine kleine Fraktion aus Zellen mit typischen Stammzellmerkmalen, wie beispielsweise dem Oberflächenmarker CD133. Diese Zellen besitzen ein hohes Potential an Regenerations- und Anpassungsfähigkeit und sind in der Lage nach Absterben der muren Tumorzellen eine erneute Tumorpheriferation mit entsprechenden Resistenzen auszdifferenzieren¹.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe maßgeschneiderter Medikamente entwickelt, die gezielt Schlüsselfaktoren einer gesteigerten Proliferation hemmen. So sind beispielsweise eine ganze Reihe verschiedener Antikörper gegen die Tyrosinkinaserzeptoren EGFR oder PDGFR hergestellt worden. Andere Medikamente sollten durch Hemmung der Faktoren mTOR oder RAS inhibierend auf Glioblastome wirken. Eine Übersicht der wichtigsten maßgeschneiderten Faktoren ist in Tab. 1 dargestellt.

Tabelle 1 : Neue Glioblastommedikamente. Faktoren, die beeinflusst werden

| Ziel-Faktor | Medikament |
|--------------------|-----------------------------|
| EGFR | Cetuximab, Erlotinib |
| PDGFR | Gleevec |
| VEGFR | Avastin |
| mTOR | Rapamycin |
| EGFR/Her2 | Lapatinib |
| Ras | Tiplfarnib |

I.2 Onkolytische Viren

„Ein Teil von jener Kraft die stets das Böse will und stets das Gute schafft“ Goethe

I.2.1 Einsatz onkolytischer Viren zur Glioblastomtherapie

Im Laufe ihrer evolutionären Entwicklung haben Viren unterschiedlichste Mechanismen entwickelt in Säugerzellen zu gelangen und zelluläre Faktoren für die eigene Vermehrung zu nutzen. Ein Nebeneffekt ist das Absterben der Zelle durch Apoptose oder durch lytische Virusausschleusung. Im Gegenzug reagierten die Zellen durch die Entwicklung von zellulären Abwehrmechanismen gegen Viren. Das Interferonsystem bildet dabei die Grundlage intrazellulärer Immunität^{43, 44}. Unterschiedliche Virenstrukturen werden dabei durch sogenannte Pattern-Recognition-Receptors (PRRs, v.a. RIG-I, MDA-5 und TLRs) der Zelle erkannt und führen zur Aktivierung von Interferon α und β ⁴⁵. Doppelsträngige RNA, die physiologisch nicht in der Zelle anzutreffen ist, zählt zu den stärksten Aktivatoren von Interferon^{46, 47, 48}. Durch Zellzyklusstopp und Expression antiviraler Faktoren (beispielsweise PKR, Mx, OAS) wird eine Virusreplikation in gesunden Zellen unterbunden⁴⁹ (Abbildung 5). Humanpathogene Viren haben wiederum vielfach Strategien entwickelt diese Zellabwehr zu umgehen und die Zellen trotzdem zu infizieren. Viele von ihnen haben eine spezifische Wirtsbindung, d.h. sie können sich nur in wenigen Zelltypen spezifischer Tierarten erfolgreich vermehren. Ob ein Virus eine Zelle als Wirt nutzen kann oder nicht, hängt von drei wichtigen Faktoren ab:

1. Vermögen eines Virus überhaupt in die Zelle einzudringen. Hierbei spielen zelluläre Oberflächenstrukturen eine große Rolle⁵⁰. Je nachdem, wie häufig diese Strukturen auf zellulären Oberflächen anzutreffen sind, können Viren eine breite Palette verschiedenster Zellen infizieren. NDV beispielsweise bindet an Sialinsäureresten an, die sich auf vielen Zelloberflächen befinden, und kann so eine breite Palette unterschiedlicher Zellen infizieren⁵¹. Auf der anderen Seite benötigt beispielsweise Parvovirus B19 das Blutgruppenantigen P, um in die Zelle gelangen zu können, und infiziert deshalb ausschließlich hämatopoetische Zellen⁵².

2. Die Fähigkeit des Virus sich in der Zelle auch tatsächlich zu vermehren. Diese ist abhängig von Enzymen und Faktoren, die die Zelle dem Virus für seine Replikation bereitstellt. Maligne Zellen haben häufig ein stark verändertes Expressionsmuster. Erhöht sich dabei der Anteil an Faktoren, die für ein bestimmtes Virus essentiell ist, so kann sich das Virus ganz spezifisch in

Einleitung

diesen Zellen vermehren. Nicht entartete Nachbarzellen bleiben wegen des unpassenden Expressionsmusters vom Virusbefall verschont.

3. Ausbildung von Mechanismen zur Umgehung des zellulären Immunsystems. Bei Malignomen ist das Interferonsystem häufig in seiner Wirksamkeit herabgesetzt, sodass Viren, die von gesunden Zellen erkannt und bekämpft werden, in malignen Zellen verschont bleiben⁵³.

In der Regel führt eine erfolgreiche virale Infektion zum Untergang der betroffenen Zelle. Abhängig von Virus und Gewebetyp kann jede der drei folgenden Mechanismen alleine oder in Kombination zum Zelltod der malignen Zellen führen:

1. Induktion der zelleigenen Apoptosemaschinerie, wobei sowohl die intrinsische als auch die extrinsische Apoptose eingeleitet werden kann.
2. Zytolyse der Zelle infolge des Virusaustritts.
3. Zerstörung infolge Erkennung maligner Zellen durch das Immunsystem nach Virusbefall.

Einleitung

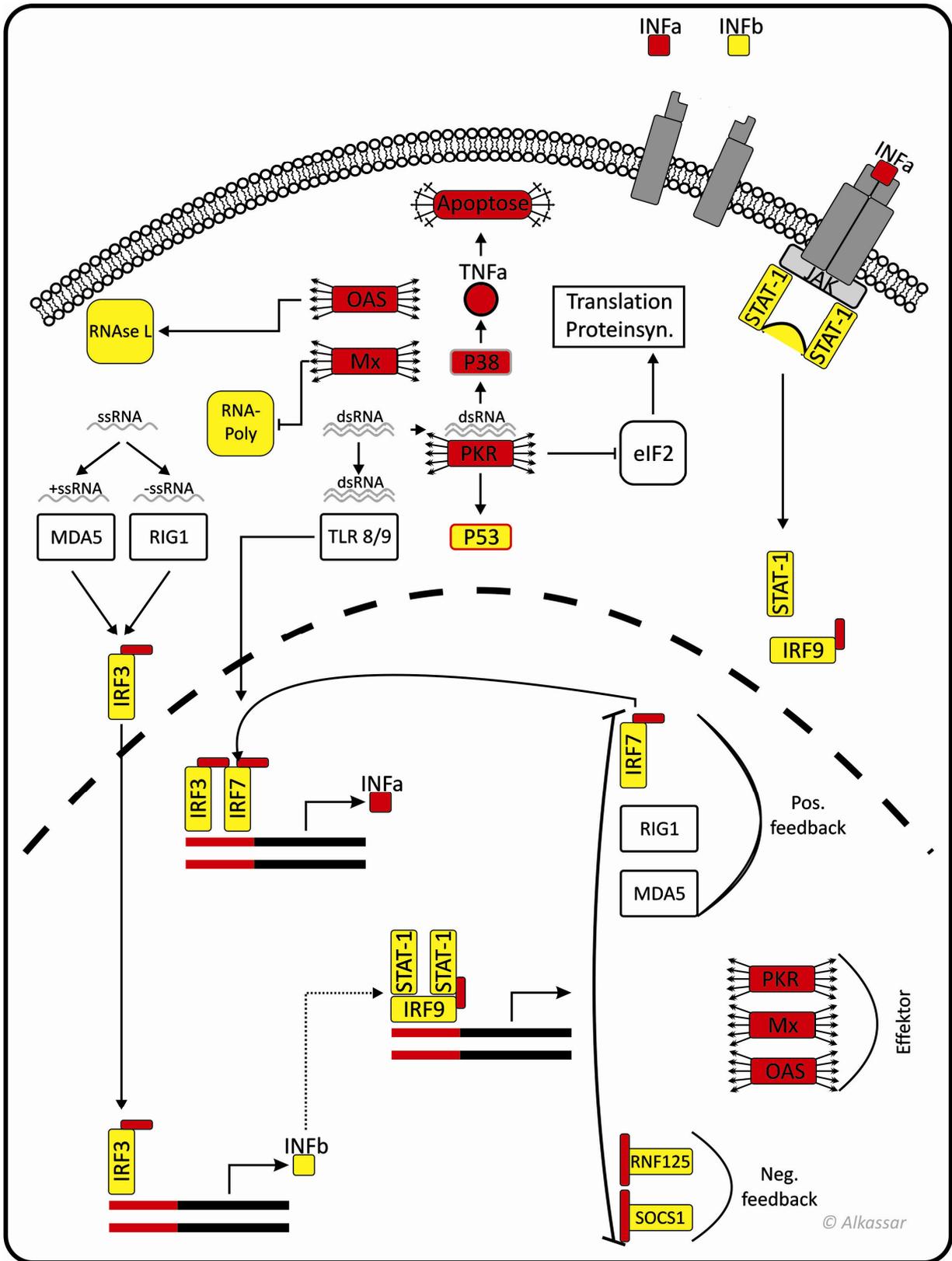


Abbildung 5: Abwehrmechanismen zur Verhinderung der Virusreplikation bei gesunden Zellen

Einleitung

Viren, die in der Lage sind spezifisch in Tumorzellen zu replizieren und diese zu zerstören, werden als onkolytisch bezeichnet. Durch gentechnische Manipulation lassen sich die meisten humanpathogenen Viren derart verändern, dass sie onkolytische Eigenschaften erlangen⁵⁴. Hierbei werden beispielsweise viruseigene Faktoren, die für eine Umgehung des zellulären Immunsystems wichtig sind, gentechnisch aus dem viralen Genom entfernt; eine Vermehrung dieser Viren gelingt dann nur noch in Zellen mit einem gestörten Interferonsystem und somit bevorzugt in Tumorzellen.

Daneben existieren auch in der freien Natur Viren, die den Menschen nicht als Wirt nutzen und dennoch in neoplastisch veränderten humanen Zellen wachsen können. Hierbei handelt es sich meist um tierpathogene Viren⁵⁵. Bei den in Tabelle 2 aufgeführten acht Viren ist eine natürliche, onkolytische Wirksamkeit auch für Glioblastome nachgewiesen. Diese Viren verwenden teilweise sehr unterschiedliche Techniken zur spezifischen Erkennung und Zerstörung maligner Zellen.

Für Parvovirus H1, Reovirus (Serotyp III) und Newcastle Disease Virus (NDV, Typ Hitchner B1) konnte eine ausgeprägte onkolytische Aktivität nachgewiesen werden. Diese Arbeit untersucht den Einfluss der Kombination aus jeweils zwei der obigen Viren auf die onkolytische Effektivität in Glioblastomzellen.

Tabelle 2: Natürlich onkolytische Viren. Voraussetzung für eine erfolgreiche Replikation.

| Virus | Tumorerkennung | Studien |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Reovirus | Ras-Positivität | Phase I/II |
| Newcastle Disease Virus | Zell-Immunität-Defekte | Phase I/II |
| Cosackie Virus | Rezeptor Überexpression | Phase I |
| Masern Virus | Rezeptor Überexpression | Phase I |
| Sindbis Virus | Rezeptor Überexpression | In Vitro-/Tiermodelle |
| Vesikular Stomatitis Virus | Zell-Immunität-Defekte | In Vitro-/Tiermodelle |
| Parvovirus | Zellzyklusfaktoren (v.a. E2F) | In Vitro-/Tiermodelle |
| Myxoma Virus | Zell-Immunität-Defekte | In Vitro-/Tiermodelle |

I.2.2 Das Reovirus

I.2.2.1 Taxonomie und Aufbau des Reovirus

Der Begriff Reovirus stammt aus dem Jahre 1959 und leitet sich von der Bezeichnung respiratory enteric orphan virus ab⁵⁶. Ursprünglich wurde das Virus aus Verdauungstrakt und Atemwegen gesunder Kinder isoliert. Das Erstaunliche war, dass es mit keiner Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte, was in der Namensgebung am dritten Buchstaben von REO deutlich wird (O für orphan, engl. verwaist).

Das Reovirus gehört zur Familie der Reoviridae, die sich durch ihre segmentierte dsRNA auszeichnen. Neben Orthoreoviren, zu dem auch das Reovirus zählt, gibt es eine ganze Reihe anderer Gattungen, allerdings mit überwiegender Spezifizierung auf Tiere oder Pflanzen⁵⁷.

Das Reovirus hat einen Durchmesser von 70-80 nm und stellt sich elektronenmikroskopisch in einer Radspeichen-ähnlichen Struktur dar. Das Kapsid ist aus mehreren Proteinschichten aufgebaut. In Abhängigkeit von ihrer Größe unterscheidet man zwischen σ - (σ 1- σ 4, Länge 0,7- 1 kb), μ - (μ 1- μ 3, Länge 2-4kb) und λ -Proteinen (4 kb) (λ 1- λ 4, Länge 4-5 kb)⁵⁸. Die äußere Kapsidschicht besteht aus den Proteinen σ 1, σ 3, λ 2 und μ 1c und umhüllt eine innere Kapsidschicht aus den Proteinen λ 1 und σ 2. Im inneren Kapsid befinden sich das virale Genom sowie die Nicht-Strukturproteine λ 3 (RNA-abhängige RNA-Polymerase) und μ 2 (Guanyltransferase). Abhängig vom immunologischen Verhalten ihrer Kapsidproteine unterteilt man die Orthoreoviren in 3 verschiedene Stämme: Typ 1 Lang, Typ 2 Jones und Typ 3 Dearing. Je nach Stamm werden unterschiedliche Zelltypen infiziert. Das Kapsidprotein σ 1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Wirtsspezifität der verschiedenen Stämme.

Das Genom der Reoviren besteht aus zehn Segmenten doppelsträngiger RNA die zusammen eine Länge von 18.000-19.000 Basenpaaren aufweist. An den 5`-Enden besitzen die RNA-Segmente sogenannte Cap-Strukturen. Jedes Segment kodiert für genau ein mRNA-Molekül und somit für ein Virusprotein. Die Unterteilung der dsRNA in L-, M- und S-Segmente orientiert sich an der Länge der kodierenden Sequenzen. L- Segmente kodieren demnach für λ -Proteine, M-Segmente für μ -Proteine und S-Segmente für σ -Proteine.

I.2.2.2 Reovirus-Infektionszyklus

Die Replikation beginnt mit dem Andocken von Reovirus über σ 1 an die Zelloberfläche.⁵⁹ Dabei bindet σ 1 am Transmembran-Protein Junction adhesion molecule 1 (JAM-1) sowie an Sialinsäureresten der Zellmembran an, wodurch der zelluläre Prozess der Endozytose induziert wird⁶⁰. Im Endosom kommt es durch die Wirkung unterschiedlicher Proteasen zum Abbau des äußeren Kapsidproteins sigma 3 und zu Konformationsänderungen der Kapsidproteine σ 1 und μ 1. Das derart modifizierte Virus wird auch Infectious Subvirion Particle (ISVP) genannt und wird mithilfe des modifizierten μ 1-Proteins aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zelle geschleust. Wie Alain zeigen konnte spielt die Zusammensetzung der endosomalen Proteasen eine entscheidende Rolle für die Anfälligkeit von Zellen für eine Reovirusinfektion⁶¹.

Noch im Kapsid wird die Transkription der dsRNA Genomsegmente eingeleitet und 5'-gecappte mRNA-Moleküle synthetisiert⁶². Diese sind in ihrer vollen Länge den Genomsegmenten komplementär. An den Ecken der Kapsidstrukturen erfolgt die Ausschleusung ins Zytoplasma. Dort bilden sich anschließend unter Verwendung zellulärer Translationsenzyme die entsprechenden Virusproteine. Die Proteine λ 1 und σ 2 aggregieren zu einem inneren Kapsidpartikel und schließen jeweils einen vollständigen Satz an viralem mRNA Genom ein^{63,64}. μ 1 und λ 2 erkennen die fertige innere Kapsidstruktur und lagern sich von außen daran an. Die Proteine σ 1 und σ 3 der äußeren Kapsidschicht umstülpen, nach Ausreifung im Endoplasmatischen Retikulum (ER), abschließend das so herangereifte Kapsid. Der Zusammenbau des Virus findet in speziellen Bereichen des Zytoplasmas, den so genannten „viral factories“, statt. Das Nichtstrukturprotein μ NS spielt bei der Koordination dieses Vorganges eine wesentliche Rolle.

Nach Fertigstellung des Kapsids werden durch Poren in der inneren Kapsidstruktur die Nichtstrukturproteine aufgenommen und dsRNA aus mRNA-Strängen synthetisiert. Durch Zelluntergang gelangt das Virus schließlich aus der Zelle und kann einen erneuten Infektionszyklus beginnen.

I.2.2.4 Reovirus - Pathogenität für den Menschen

Überwiegend verläuft eine Infektion mit Reovirus symptomfrei ab, selten kann eine milde Gastroenteritis oder ein Infekt der oberen Atemwege auftreten. Nahezu die gesamte erwachsene Bevölkerung ist seropositiv gegen Reoviren, was die hohe Durchseuchungsrate widerspiegelt. Bei genauerer Betrachtung lässt sich feststellen, dass weniger als 25 % der Kinder unter 5 Jahren Antikörper gegen Reoviren haben; d.h. der überwiegende Teil der Gesellschaft infiziert sich erst spät mit Reovirus und bildet Reovirus-spezifische Antikörper aus. Um mögliche Pathologien auf den Menschen festzustellen wurde bereits 1963 eine Studie mit freiwilligen gesunden Probanden durchgeführt, die sich mit Reovirus infizieren ließen. Bis auf leichte Infekte der oberen Atemwege nach Reovirusinhalation bei ca. einem Drittel der Patienten wurden keine klinischen Symptome beobachtet. Beim Menschen konnte trotz der hohen Durchseuchung bisher kein Nachweis für einen Zusammenhang eines pathologischen Geschehens mit einer Reovirusinfektion erbracht werden. Das Reovirus wird deshalb als äußerst sicher eingestuft.

I.2.2.5 Onkolytische Wirksamkeit von Reovirus (Abbildung 6)

Die Zellmembran stellt die erste Barriere jeder Zelle in ihrem Infektionszyklus dar. Für einen erfolgreichen Eintritt in das Zellinnere nutzt Reovirus den Mechanismus der Zellrezeptor-vermittelten Endozytose. Wegen der Verbreitung von Sialinsäureresten und JAM-1 Rezeptoren auf vielen Zelloberflächen spielt der Eintrittsmechanismus von Reovirus nur eine untergeordnete Rolle bei der Ausbildung eines Tropismus für maligne Zelle^{65,66}. Entscheidend für den weiteren Verlauf der Virusinfektion scheint hingegen die korrekte Herstellung des ISVP und Ausschleusung aus dem Endosom ins Zytoplasma zu sein. Die hierfür benötigten Proteosomen, wie beispielsweise Cathepsin L sind in malignen Zellen häufig stark überexprimiert⁶¹. Wie Marcato nachweisen konnte, beeinflusst aktiviertes RAS die Expression dieser Proteosomen entscheidend mit⁶⁷. Der Effekt von RAS auf die Reovirusreplikation wurde erstmals von Lee et al 1998 beschrieben. In den nachfolgenden Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass eine gesteigerte RAS-Aktivität über mindestens 3 unabhängige Mechanismen den Infektionszyklus von Reovirus beeinflusst. Neben der Steigerung der Cathepsinaktivität vermag aktiviertes RAS über Aktivierung von RAL/p38 die Proteinkinase R (PKR) zu hemmen⁶⁸. Wie in Abschnitt x beschrieben, ist PKR ein Teil des intrazellulären Abwehrsystems und dient der Erkennung virusspezifischer Strukturen, ähnlich

Einleitung

wie Toll-like-Rezeptoren, RIG-I und MDA-5. PKR wird durch Bindung an dsRNA aktiviert und bewirkt eine Hemmung von eIF und somit einen Translationsstopp. Die Bindung des Reovirusproteins σ 3 an dsRNA dämmt die Aktivierung von PKR zwar etwas ein, dies gelingt jedoch nur bei Zellen, bei denen die PKR-Aktivität ohnehin schon abgeschwächt ist,⁶⁹⁻⁷². Dies bedeutet, dass bei RAS-positiven Zellen die Vermehrung von Reovirus nicht durch Interferon gestoppt werden kann.

Des Weiteren konnten Marcato et al feststellen, dass RAS die Infektiosität hergestellter Viren über einen noch unbekanntem Mechanismus stark erhöht⁶⁷.

Zur erfolgreichen Virusvermehrung bedarf es einer Zerstörung der infizierten Zelle. Um dies zu erreichen macht sich das Reovirus die zelleigene Apoptose zu Nutzen. Hierbei wird durch Bindung von σ 1 an JAM-1 die Apoptosebereitschaft gesteigert. Gleichzeitig kommt es infolge der viralen Infektion zu einer Versetzung der Zelle in Stress und somit zu einer Erhöhung der Expression von TRAIL. Die Aktivierung von Caspase 3 und 8 erfolgt im Anschluss durch Andocken von TRAIL an den extrazellulären FAS-Rezeptor^{67, 70}. Smakmann et al konnten nachweisen, dass aktiviertes RAS die Schwelle zur Apoptoseeinleitung in Reovirus-replizierenden Zellen um ein Vielfaches steigern kann⁷³. Dies ist sehr eindrücklich, da in nicht infizierten malignen Zellen die gesteigerte RAS-Aktivität die Apoptoseschwelle senkt.

All diese Vorteile RAS-positiver Zellen bewirken eine Steigerung des reoviralen Infektionszyklus um den Faktor 100⁶⁷. Da die meisten Tumoren Defekte des RAS-Proteins oder von Faktoren der Signalkaskade stromaufwärts von RAS haben, sind Reoviren in der Lage, sich in einer ganzen Reihe von malignen Tumoren zu vermehren, ohne den umliegenden normalen Zellen Schaden zuzufügen. Wie in Abschnitt I.1.2 dargestellt liegt bei allen Glioblastomen eine Überaktivität der Tyrosinkinase-Rezeptoren und somit auch von RAS vor, was die gute onkolytische Wirksamkeit bei den meisten Glioblastomzelllinien erklärt.

Einleitung

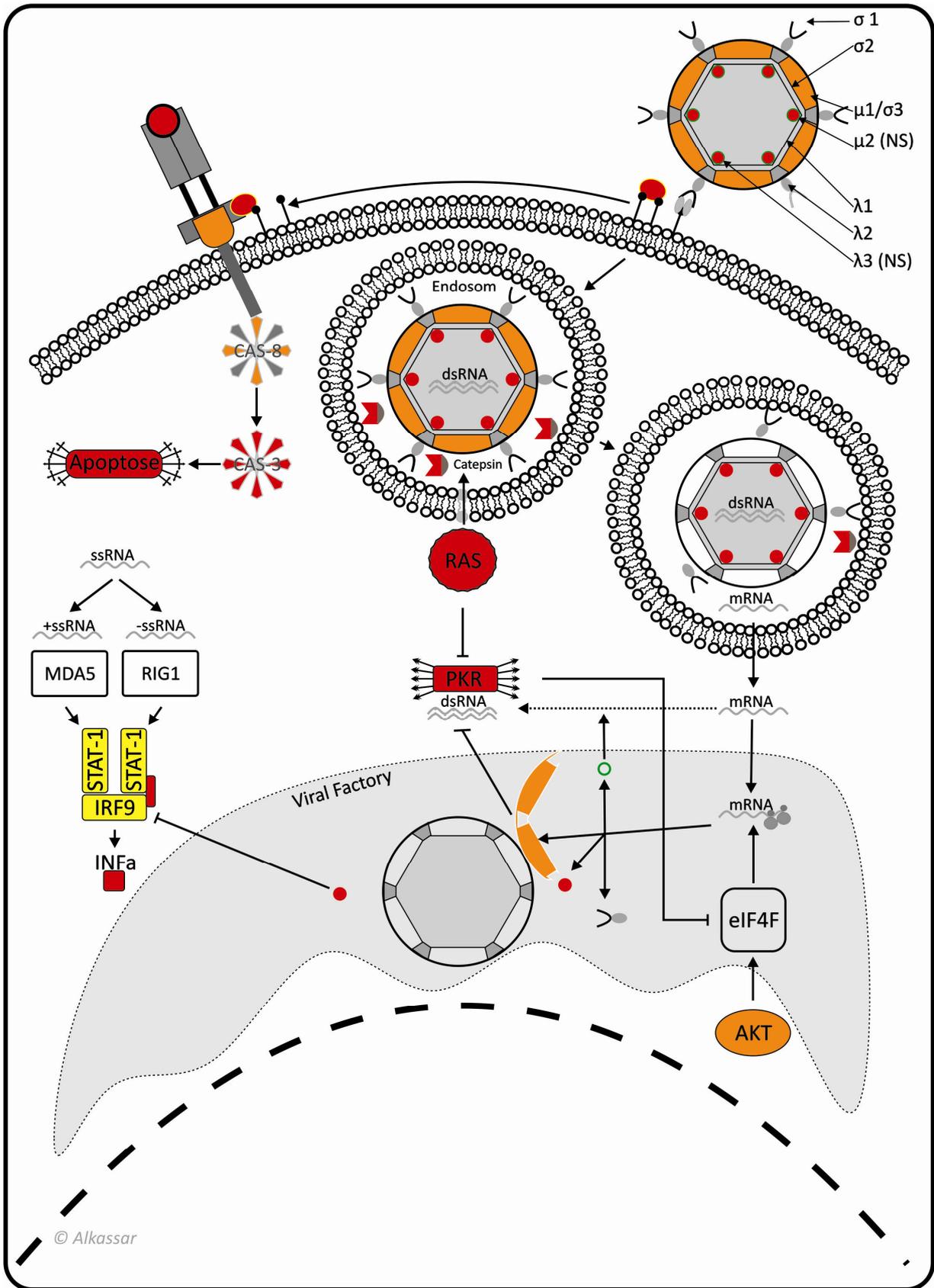


Abbildung 6: Infektionszyklus von Reovirus, Einflussnahme verschiedener zellulärer Faktoren (z.B. RAS und AKT) auf die Replikationsfähigkeit in Tumorzellen

I.2.3 Newcastle Disease Virus (NDV)

I.2.3.1 Taxonomie und Aufbau von NDV

Das nur bei Vögeln auftretende Virus führte bis vor 20 Jahren wegen seiner hohen Kontagiösität regelmäßig zu Epidemien in Geflügelfarmen ganzer Landstriche⁷⁴. Durch Impfkampagnen konnten diese in den letzten Jahrzehnten zwar eingeschränkt werden, allerdings ließen sich gelegentliche Ausbrüche des Virus nicht völlig verhindern⁷⁵.

Abhängig von der klinischen Symptomatik, die ein Stamm hervorruft, unterscheidet man zwischen lentogenen, mesogenen und neurotrophen Newcastle-Disease-Viren. Lentogene Stämme verursachen milde oder inapparente Erkrankungen der Atemwege, während mesogene Stämme zu schwereren Erkrankungen der Atemwege führen und oft mit dem Tod der Tiere enden. Bei neurotrophen NDV kommt es neben einem schweren Befall der Atemwege oft auch zu einer Beteiligung des Nervensystems. Dies führt so gut wie immer zum Tod der befallenen Tiere⁷⁶. Die Unterschiede in der Virulenz verschiedener Stämme beruhen auf der Fähigkeit in die Wirtszelle eindringen zu können. Hierbei spielen die Oberflächenproteine Hämagglutinin, Neuraminidase und F-Protein eine wichtige Rolle⁷⁷, wobei das F-Protein meist entscheidend ist⁵¹. Wenige Basenmutationen im Peptidase-Schnittstellenbereich reichen aus um einen Wechsel der Virulenz herbeizuführen. Zusätzlich zur Virulenz kann zwischen lytischen und nicht lytischen Stämmen unterschieden werden. Beide Stämme können zum Absterben infizierter Zellen führen, allerdings geschieht dies bei lytischen Stämmen schneller⁷⁸.

NDV gehört zur Familie der Paramyxoviren. Wegen seiner starken Ähnlichkeit mit dem Mumpsvirus wurde es früher in die Gattung der Rubulaviren, zu denen neben dem Mumpsvirus auch das Parainfluenzavirus Typ2 zählt, eingeordnet. Seit 2001 wurde jedoch eigens für das NDV der neue Genus der Avulaviren geschaffen⁷⁹.

Ebenfalls zur Familie der Paramyxoviren zählt die Gattungen der Respiroviren, der Morbilliviren und der Henipaviren.

Bis auf die Morbilliviren und die Henipaviren verfügen alle Paramyxoviren neben einer Hämagglutinationsaktivität auch über eine Neuraminidaseaktivität an ihrer Oberfläche, welche effektiv für die Wirtsbindung verwendet wird.

Einleitung

Das NDV hat einen Durchmesser von 150 bis 300 nm und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung. Das Nukleokapsid besteht aus P-, L-, und N-Proteinen, die mit der einzelsträngigen RNA (ssRNA) zu einem Nukleoproteinkomplex aggregiert vorliegen. Das L-Protein besitzt dabei die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Das N-Protein beschützt die RNA vor den Abbau durch Nukleasen und verleiht ihr die nötige Flexibilität für die Verpackung in die Viruspartikel. Umhüllt wird das Virus von einer Membran, an deren Innenseite sich ein Strukturprotein (M-Protein) anlagert. An der Außenseite ragen die Oberflächenproteine HN und F als Spikes hervor. Das HN-Protein (Hämagglutinin-Neuraminidase) ist für das Andocken der Viren an die Zellen verantwortlich, wobei das F-Protein die Induktion der Membranfusion und somit der Viruseinschleusung in die Zelle vermittelt⁸⁰.

Abhängig vom Stamm kann die Länge des Virengenoms zwischen 15.300 und 15.800 bp liegen. Das Genom wird von einer 52 bis 54 bp langen Leader-Sequenz am 3`-Ende und einer 40 bis 44 bp langen Trailer-Sequenz am 5`-Ende flankiert. An der Leader-Sequenz beginnt die Transkription, wobei cis-aktive Initiationssignale am Trailer-Ende für eine erfolgreiche Replikation sorgen. Im Bereich zwischen Leader- und Trailer-Sequenz befinden sich die kodierenden Sequenzen der Proteine N, P, M, F, und HN. Jeweils an beiden Enden und Zwischenräumen der kodierenden Sequenzen befinden sich die Kontrollsequenzen E, I und S. Die Aufgabe dieser Konsensussequenzen, die nicht transkribiert werden, besteht in der korrekten Koordinierung der Transkription. Die Konsensussequenz E führt zum Stopp, die Sequenz S zu einem erneuten Start der mRNA-Synthese.

1.2.3.2 Der NDV-Infektionszyklus

Das HN-Protein bindet an Sialinsäureresten der Zelle an und ist für die Oberflächenadsorption des Virus an Membranen der Wirtszellen verantwortlich^{81, 82}. Nach erfolgter Adsorption induziert das F-Protein die Fusion zwischen Virushülle und Wirtszellmembran⁵¹, sodass es zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma kommen kann. Im Zytoplasma erfolgt im nächsten Schritt die Translation der Virusproteine. Da die RNA des NDV als Minusstrang vorliegt und somit nichtkodierend ist, kann keine direkte Translation erfolgen. In einem Zwischenschritt wird deshalb zu jeder kodierenden RNA-Sequenz eine passende mRNA-Sequenz synthetisiert. Dies geschieht mithilfe der viruseigenen RNA-

Einleitung

abhängigen RNA-Polymerase (L-Protein) am 3'-Ende. Die RNA-Synthese kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden. Zunächst erfolgt lediglich die Transkription der kodierenden Sequenzen. Gegen Ende des Infektionszyklus wird die RNA-abhängige RNA-Polymerase zur Erstellung von Genom-Kopien genutzt. Beide Abschnitte sind durch ein einfaches Prinzip miteinander gekoppelt. Der Anstieg der zytoplasmatischen Konzentration an N-Proteinen bewirkt eine verstärkte Bindung dieser Proteine an die Genom-RNA. Dies führt bei Erreichen eines Schwellenwertes zu einer Veränderung des Transkriptionsverhaltens der RNA-Polymerase und zu einer Transkription des kompletten RNA-Moleküls in Plusstrangorientierung. Diese RNA wiederum dient im letzten Schritt als Matrize für die Produktion neuer Virusgenome. Durch Anlagerung der Proteine N, L und P an das Virusgenom entsteht ein neues Nukleokapsid, welches durch Ausstülpung (Budding) aus der Zelle ausgeschleust wird. Zuvor erfolgte die Verankerung der posttranslational modifizierten Proteine M, HN und F über Golgi-Vesikel in der Zellmembran. Für die Entstehung virulenter Viren ist es notwendig, das F-Protein durch eine trypsinähnliche Protease (Furin) zu spalten. Dabei entstehen zwei Proteinabschnitte: ein aminoterminaler freier Anteil F2 und ein membranverankerter Anteil F1, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. Erst diese gespaltene Konstellation des F-Proteins verleiht dem Virus die Fähigkeit zur erfolgreichen Virusinfektion. Abhängig von der Aminosäuresequenz an der das F-Protein von der Protease geschnitten wird, kann die Geschwindigkeit der Proteolyse sich stark unterscheiden. Diese ist maßgeblich für die Virulenz verschiedener NDV-Stämme⁵¹. Bei velogenen und mesogenen Stämmen kommt es direkt nach Ausschleusen des Virus durch Serumproteasen zu einer Spaltung des F-Proteins. Das Virus ist somit in der Lage in jedem Gewebe virulente Erreger zu produzieren, was die generalisierte Erkrankung der Tiere erklärt. Lentogene Viren hingegen können allenfalls von starken Proteasen in Verdauungstrakt und Lunge gespalten werden, sodass diese nur zu leichteren Infekten der Verdauungswege und der Lunge bei Vögeln führen.

Nur anhand der Klinik und des Nachweises des NDV bei erkrankten Tieren werden die unterschiedlichen NDV-Stämme definiert. Hierbei unterscheidet man abhängig vom Schweregrad der Erkrankung des befallenen Tieres zwischen:

Einleitung

1. **Viszerotrop velogenischen Stämmen**, die durch schwere intestinale hämorrhagische Blutungen ausgezeichnet sind und fast immer zum Tod der Tiere führen
2. **Neurotrop velogenischen Stämmen**, die v.a. zu neuronalen Ausfällen mit schwerer Beeinträchtigung des respiratorischen Systems der Tiere führen und ebenfalls mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet sind.
3. **Mesogenen Stämmen**, die ebenfalls mit respiratorischen und neurologischen Infekten vergesellschaftet sind, allerdings eine niedrigere Mortalität als neurotrophe Stämme aufweisen.
4. **Lentogenen Stämme**, die zu leichten Infekten des Verdauungssystems bzw. der Lunge führen und mit keiner erhöhten Mortalität assoziiert sind.

I.2.3.3 NDV - Pathogenität für den Menschen

Von großem Vorteil bei der Verwendung des NDV als Malignom-Therapeutikum ist die Tatsache, dass es human nicht pathogen ist, gute Zell-Bindungseigenschaften aufweist und selektiv in Tumorzellen replizieren kann. Diese selektive Replikation ist unabhängig von der Zellproliferation. Aufgrund der fehlenden Pathogenität und der hohen Selektivität bestehen daher kaum Bedenken gegen einen therapeutischen Einsatz des Virus. Auch das Risiko der Übertragung auf den Menschen ist bei einem Vogelvirus recht gering.

Klinische Studien mit diesem Ansatz fanden schon in den 50er Jahren statt, erbrachten aber keine signifikanten Anti-Tumor-Effekte, obwohl in einigen Fällen ein Rückgang der behandelten Tumoren zu verzeichnen war^{83, 84}. Deswegen verschwand diese Therapieform für lange Zeit. Erst die Enthüllung der grundlegenden Prinzipien der Virusbiologie, der Karzinogenese und der Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie ließ die Therapie mit NDV wieder aufleben. Heute gibt es wieder vermehrt in vitro und in vivo Studien mit Newcastle-Disease-Viren^{85, 86}.

I.2.3.4 Onkolytische Wirksamkeit von NDV (Abbildung 7)

Die meisten Säugerzellen verfügen über Sialinsäurereste an ihren Zellmembranen. Dadurch haben diese Viren prinzipiell die Möglichkeit in verschiedenste humane Zelltypen einzudringen^{87, 88}. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu dem in Abschnitt I.2.4

Einleitung

besprochenen Parvovirus H1, dessen Fähigkeit, an Zellen zu adsorbieren, wesentlich eingeschränkter ist.

Allerdings kann sich NDV in gesunden menschlichen Zellen nicht weiter replizieren, da starke intrazelluläre Abwehrmechanismen dies unterbinden. Die Aktivierung des Interferon-systems erfolgt über sogenannte Pattern Recognition Receptors (PRRs)⁸⁹. Zu den PRRs zählen sowohl membrangebundene Toll Like Rezeptoren (TLR) als auch im Zytoplasma gelöste PRRs, die sogenannten RIGs. Einzelsträngige RNA (ssRNA) wird hierbei von der RNA-Helikase RIG 1 gebunden und phosphoryliert anschließend RIG 3. Dieses wandert in den Nukleus und initiiert dort als Promotor die Synthese von Interferon- β . Durch Induktion von Interferon- α kommt es infolgedessen zu einer gesteigerten INF-Rezeptorexpression und zu der Aktivierung von Janus-Kinase-Rezeptoren, die durch Aktivierung von STAT zur Transkription von Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) führt. Erst durch IRFs kann eine begonnene Interferonsynthese aufrecht erhalten werden. Der IRF 7 spielt hierbei eine wesentliche Rolle. Nach initialer Aktivierung kann IRF 7 durch positive Rückkopplung eine hohe Interferonaktivität aufrecht erhalten. Interferon α und β , steigern die Expression von vielen Proteinen, die einer aktiven und passiven intrazellulären Virenabwehr dienen. Hierdurch kommt es in gesunden menschlichen Zellen zu keiner bleibenden NDV-Infektion.

Im folgenden Abschnitt wird der wesentliche Funktionsmechanismus, der zu Abwehr von NDV führt, dargestellt (Abbildung 1). Durch die doppelsträngige RNA, die im Verlauf der NDV-Replikation gebildet wird, kommt es zur Induktion des zytoplasmatischen PRR-Proteins RIG-I. Dieses führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF- κ B⁹⁰. Hierdurch kommt wiederum es zur Induktion von Interferon- β und infolgedessen auch zur Interferon- α Expression. Interferon- α und - β zählen nach heutigem Wissen zu den stärksten Auslösern zellulärer Immunität und führen zu einer kompletten Umstrukturierung von Zellmetabolismus und -zyklus. Dabei wird die Transkription mehrerer hundert Gene initiiert. Die wichtigsten Genprodukte, die einen direkten Einfluss auf das Virus nehmen sind

1. *Myxovirus Resistance Protein 1 (MX1)*,
2. *2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS)* und
3. *Proteinkinase R (PKR)*.

MX1 entfaltet seine virusspezifische Wirkung durch Inaktivierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die für die Synthese der viralen mRNA unerlässlich ist. Gleichzeitig führt RNase

Einleitung

L, welches durch 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS), aktiviert wird zu einem Abbau der viralen einzelsträngigen RNA. Zusätzlich zum Stopp der Virusreplikation und Zerstörung des viralen Genoms hemmt die Proteinkinase R durch Phosphorylierung des eukaryoten Initiationsfaktors (eIF-2a) die Translationsmaschinerie solange, bis das Virus beseitigt ist⁹¹. Eine Aktivierung der Apoptose erfolgt im Falle eines Scheiterns der Viruselimination.

Die Arbeitsgruppe Schirmacher et al konnte in vielen Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Tumorentitäten nachweisen, dass die tumorspezifische Replikation von NDV durch eine deutlich abgeschwächte zelluläre Immunantwort zustande kommt⁸⁰. Die Mechanismen, die bei malignen Zellen zu einer inadäquaten Interferonausschüttung führen, sind noch wenig erforscht. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass sowohl maligne als auch gesunde Zellen vergleichbar hohe intrazelluläre Interferonausschüttungen aufweisen. Allerdings besteht bei allen NDV-sensiblen Malignomen eine deutlich reduzierte Konzentrationserhöhung von Interferon- α nach NDV-Infektion⁹². Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Interferon- α Ausschüttung spielt IRF-7⁹³. Honda et al konnten zeigen, dass eine inadäquate Interferon- α Antwort in vielen Malignomen durch IRF-7-Inaktivierung zustande kommt⁹⁴. Methylierung der Promoterregion des IRF-7 Gens ist wahrscheinlich die häufigste Ursache für die mangelnde IRF-7-Synthese in den meisten Malignomen⁹⁴.

Das Absterben NDV-infizierter Zellen erfolgt über Initiierung der Apoptose⁹⁵. Hierbei scheint sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Aktivierung der Apoptose beteiligt zu sein⁹⁵. Allerdings beeinflusst die Infektion mit NDV den intrinsischen Apoptoseweg sehr viel ausgeprägter durch Bax-Aktivierung als den extrinsischen⁹⁶.

Einleitung

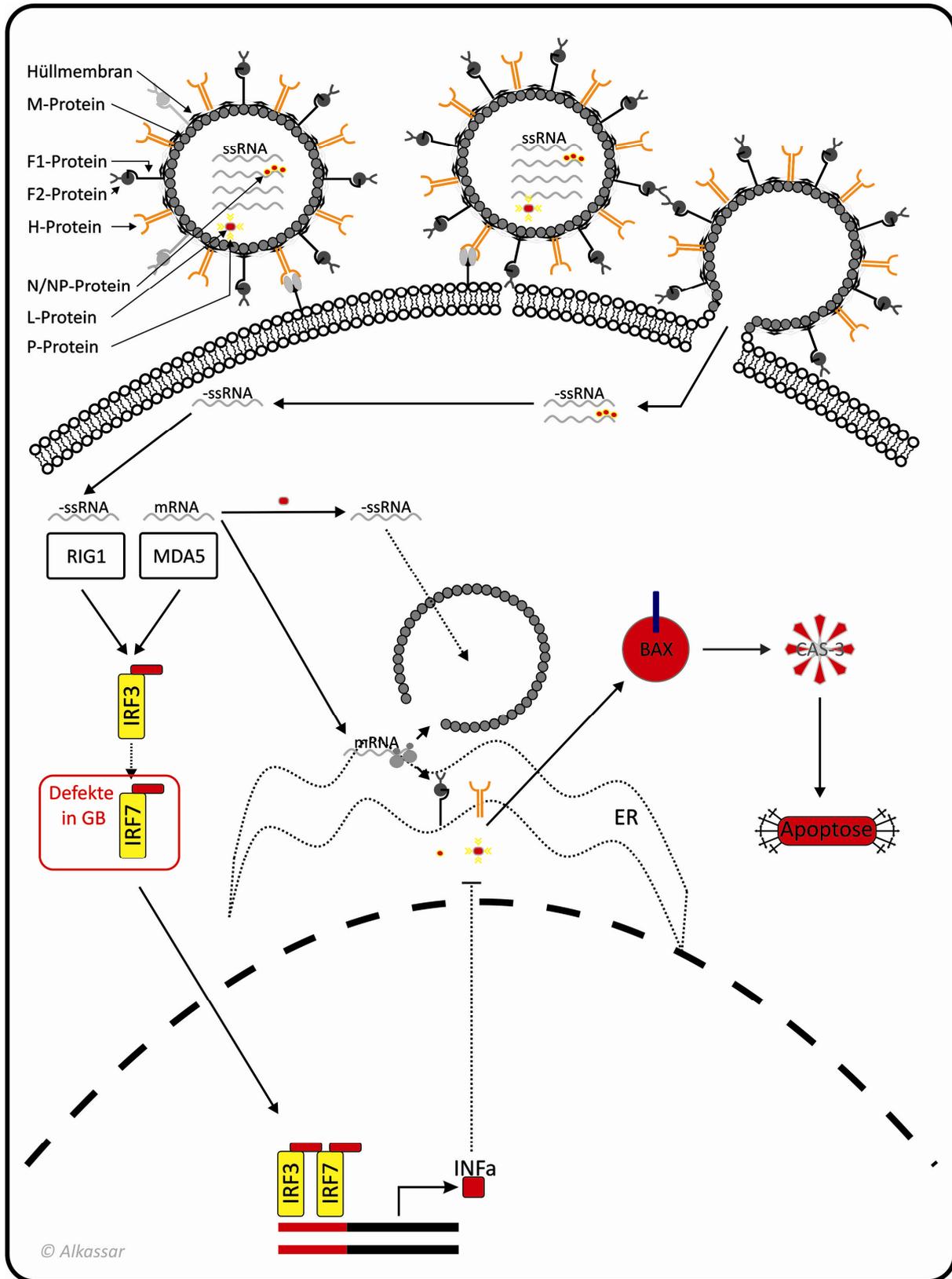


Abbildung 7: Infektionszyklus von NDV, Einfluss von Interferondefekten für eine erfolgreiche Virusreplikation in Tumorzellen

I.2.4 Parvovirus

I.2.4.1 Taxonomie des Parvovirus

Parvoviren lassen sich in zwei Unterfamilien gliedern: die der Vertebraten (Parvovirinae) und die der Insekten (Densoviridae)⁹⁷.

Die *Parvovirinae* wiederum unterteilen sich in drei Gattungen: (1) *Dependovirus*, (2) *Erythrovirus*, (3) *Parvovirus*.

Bei der Gattung der Dependoviren handelt es sich um eine Gruppe von Viren, die nur mit Hilfe anderer Viren (beispielsweise Herpes- oder Adenoviren) in einer Zelle replizieren können^{98,99}. Diese vermögen sich latent in das Genom einzubauen und bei Infektion eines entsprechenden Helfervirus in den aktiven Zustand überzugehen.

Autonome Parvoviren umfassen die Gattungen der *Erythroviren* und *Parvoviren*. Eine Integration dieser Viren in das Wirtszellgenom ist bisher nicht beobachtet worden. Autonome Parvoviren sind bei ihrer Replikation nicht auf Helferviren angewiesen, sie sind diesbezüglich allerdings stark vom Vorhandensein zellulärer Faktoren abhängig, deren Expression eng mit der Proliferation und Differenzierung der Zelle assoziiert ist¹⁰⁰. Bisher ist nur ein humanpathogenes Virus der Gattung *Erythrovirus* beschrieben, nämlich B19¹⁰¹. Es ist durch seinen Tropismus für erythroide Vorläuferzellen⁵² charakterisiert und verursacht verschiedene hämatologische Funktionsstörungen bei Immunsupprimierten, Kindern oder Schwangeren¹⁰².

Autonome Parvoviren der Gattung *Parvovirus* werden aufgrund ihrer Wirtsspezifität in mehrere Untergruppen unterteilt. Man unterscheidet zwischen dem Hundeparvovirus CPV (*Canine Parvovirus*), Katzenparvovirus FPV (*Feline Parvovirus*), Parvovirus des Schweins PPV (*Porcine Parvovirus*), Nerzparvovirus ADV (*Aleutian Mink Disease Virus*), Rinderparvovirus BPV (*Bovine Parvovirus*), Rattenparvoviren KRV (*Kilham Rat Parvovirus*), Parvovirus H-1 sowie den Mausparvoviren MPV (*Mouse Parvovirus*) und MVM (*Minute Virus of Mice*). Vor allem die autonomen Nagerparvoviren MVM und H-1 sind von großem Interesse, da sie nicht nur Zellen ihres natürlichen Wirtes infizieren, sondern auch verschiedene humane Zellen. Darüber hinaus sind sie im Menschen kaum pathogen und bieten sich somit für eine potentielle Applikation zu therapeutischen Zwecken an. Parvovirus H1 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden ausführlicher beschrieben.

I.2.4.2 Aufbau und Strukturproteine

Der Aufbau der Viruspartikel der verschiedenen Subfamilien ist generell gleich. Parvoviren gehören zu den kleinsten Viren, die in der Natur vorkommen (lat. parvus= klein).

Die ikosaedrischen Kapside haben einen Durchmesser von 20-25 nm und besitzen keine Hülle. Je nach Virus-Spezies gibt es zwei bis vier verschiedene Arten viraler Kapsidproteine (VP). Das Kapsid beim Parvovirus H1 setzt sich aus drei Proteinen zusammen: VP1 (83-86 kDa), VP2 (64-66 kDa) und VP3 (60-62 kDa).

Hauptbestandteil der aus 60 Untereinheiten bestehenden Kapside ist VP2, das in einem Verhältnis 5:1 zu VP1 vorliegt. VP1 und VP2 stellen primäre Translationsprodukte dar^{103,104}. Dagegen handelt es sich bei P3 um ein proteolytisches Spaltungsprodukt von VP2, das nur in geringen Mengen entsteht¹⁰⁵. Die proteolytische Spaltung findet im Spätstadium der Infektion statt und wird nur bei infektiösen Partikeln beobachtet.

I.2.4.3 Genom und Replikation

Das Parvovirus H1 besitzt eine ca. 5000 bp lange, einzelsträngige DNA (ssDNA) negativer Polarität. An beiden Enden der DNA befinden sich palindromische Strukturen, sogenannte inverted terminal repeats (ITP). Sie beinhalten cis-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der DNA benötigt werden¹⁰⁶ und zur Bildung von Haarnadelstrukturen führen.

Das Genom unterteilt sich in zwei überlappende Transkriptionseinheiten mit jeweils einem Promotor^{107,108}. Der „frühe“ Promotor P4 steuert die Synthese eines Transkripts, dessen Spleißvarianten R1 und R2 für die regulatorischen nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 kodieren. Unter der Kontrolle des „späten“ Promotors P38 wird das R3-Transkript abgelesen. Durch alternatives Spleißen entstehen hieraus die mRNAs für die Kapsidproteine VP1 und VP2^{109, 110}.

Die Replikation des Virusgenoms findet im Zellkern statt. Die einzelsträngig vorliegende DNA muss vor Beginn der eigentlichen Replikation zu einem Doppelstrang ergänzt werden. Hierbei dient die zurückgefaltete Haarnadelstruktur am 3`-OH-Ende der zellulären DNA-Polymerase als Primer. Dieser Vorgang, der auch Konversion genannt wird, ist ausschließlich

Einleitung

von zellulären Faktoren abhängig. Es handelt sich dabei um Faktoren, die hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus vorkommen (beispielsweise Cyclin A)^{111, 112, 113}.

Für die weiteren Schritte der Replikation werden viruseigene Proteine, v.a. das Strukturprotein NS1 benötigt. Diese können über den neusynthetisierten DNA-Strang, der als Transkriptions-Matrize dient, exprimiert werden.

Nach Abschluss der Gegenstrangsynthese liegt ein zur 3'-ITR-Seite hin geschlossenes DNA-Molekül vor, das bis auf einzelne Nukleotide im Bereich der T-förmigen ITR-Struktur eine vollständige Basenpaarung aufzeigt. Mithilfe der Endonukleaseaktivität des NS1-Proteins wird im nächsten Schritt an einer Erkennungsstelle der ITP-Struktur (trs = terminal resolution site) die DNA aufgeschnitten, und am freien 3'-Ende mittels zellulärer DNA-Polymerase elongiert. Die nun über alle Bereiche doppelsträngige DNA faltet sich wegen der Palindromstrukturen an den Enden erneut zu Haarnadelschleifen. Hier kann der Replikationszyklus von Neuem beginnen.

I.2.4.4 Der parvovirale Infektionszyklus (Abbildung 8)

Der erste Schritt der Zellinfektion besteht in der Adsorption. Hierbei erkennen Parvoviren verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die ihnen ein Eindringen in die Zelle möglich machen. Einige Parvoviren erkennen nur ganz spezifische Oberflächenrezeptoren, bei Parvovirus B19 ist es beispielsweise nur das Blutgruppenantigen P. Durch eher unspezifische Bindung an N-Acetyl-Neuraminsäurereste, welche Bestandteil vieler Rezeptoren sind, kann Parvovirus H1 an viele unterschiedliche Zelltypen binden. Die Rezeptorbindung induziert anschließend eine Dynamin-abhängige Endozytose, unabhängig von der Zellzyklus-Phase, in der sich die infizierte Zelle gerade befindet. Anschließend erfolgt über Endosomen der Transport in den Kernbereich, sodass mithilfe der Phospholipase-A Domäne des Kapsidproteins VP2 die virale DNA in den Nukleus geschleust werden kann. Die folgenden Schritte können erst bei Eintritt des Virus in den Zellzyklus stattfinden. Wie zuvor beschrieben benötigt das Virus Zellen, die sich gerade in der Synthesephase des Zellzyklus befinden, um die Replikation starten zu können. Das in der S-Phase gebildete Cyclin A wird hierbei für die Konversion (Herstellung einer doppelsträngigen DNA aus dem einzelsträngigen Virusgenom) benötigt. Erst jetzt kann die Genexpression beginnen und die Amplifikation und Synthese von ssDNA eingeleitet werden. Im ersten Schritt wird die

Einleitung

Transkription am Promotors P4 vorangetrieben. Die hierdurch induzierte Expression der Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 ist für den weiteren Replikationszyklus unabdingbar. Infolge der vielseitigen Eingriffe in zelluläre Regulationssysteme bereiten die beiden Proteine die Zelle auf die virale Replikation vor. Hierfür wird durch einen positiven Feedback-Mechanismus die Synthese von NS1 und NS2 stark gesteigert. Dies kann jedoch nur in Anwesenheit von E2F und anderen Faktoren der frühen Zellzyklusaktivierung erfolgen. Nach Transport der Proteine NS1 und NS2 in den Kern wird zunächst eine Arretierung des Zellzyklus in der frühen S-Phase induziert und somit die Grundvoraussetzung einer intrazellulären Virusreplikation sichergestellt. Gleichzeitig kommt es zu einem vollständigen Erliegen der zellulären DNA-Replikation^{114, 115}. Der Anstieg der NS1-Proteinkonzentration führt im Folgenden zur Transkription der P38-Promotor-abhängigen Sequenzen und zur Expression der Strukturproteine VP1 und VP.

Nach Verpackung der ssDNA in die Kapside werden bei einer produktiven Infektion die Virionen durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt. In nicht proliferierenden Zellen können autonome Parvoviren über längere Zeit latent vorliegen, ohne sich in das Wirtszellgenom zu integrieren¹¹⁶.

1.2.4.5 Parvoviraler Tropismus und Nutzung als onkolytisches Virus

Ein Parvovirus zeigt Tropismus für einen Zelltyp, wenn es verstärkt von diesen Zellen aufgenommen wird und dort repliziert. Zwei verschiedene, aber gleich bedeutsame Aspekte sind zu beachten:

1. Der Tropismus des Parvovirus für bestimmte Zellarten, also Speziespezifität, aber auch Gewebespezifität.
2. Die Abhängigkeit des Parvovirus von dem Zustand, in dem sich eine Zelle befindet, also Zellzyklusphase und Differenzierungsgrad.

Autonome Parvoviren zeigen ein breites Wirtsspektrum. Sie können viele Vertebraten infizieren. Dabei gibt es einige Parvoviren, die sehr spezifisch nur bestimmte Zellarten einer bestimmten Spezies infizieren, wie z.B. B19, das auf Grund seines Rezeptors P Antigen Globosid nur spezifisch humane Erythroblasten infiziert⁵². Andere Parvoviren, wie das in dieser Arbeit verwendete Nagerparvovirus Parvovirus H1, zeigen ein wesentlich breiteres

Einleitung

Wirtsspektrum. Sie können nicht nur in Zellen ihres natürlichen Wirts replizieren, sondern auch in verschiedenen humanen Tumorzelllinien; eine Eigenschaft, die sie für die Onkolysetherapie bedeutsam werden lässt^{117, 118, 119, 120}.

Dabei scheint der Tropismus für die Zellspezies und für die Zelldifferenzierung hauptsächlich von der Kapsidstruktur abzuhängen, die zum einen wichtig ist für die Rezeptorerkennung und die Adsorptionseinleitung und zum anderen für das Einschleusen der viralen DNA in den Nukleus.

Da das parvovirale Genom nur für vier Proteine kodiert, ist es in seinem Replikationszyklus stark auf zelluläre Faktoren angewiesen. Diese sind nur in der S-Phase des Zellzyklus in der Zelle anzutreffen, sodass selbst bei erfolgreichem Einbringen der viralen DNA in den Nukleus keine Replikation des Virus zustande kommt, solange sich die Zelle nicht in der Proliferationsphase befindet. Durch Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase stellt das Virus optimale Bedingungen für die eigene Replikation her. Einiges deutet darauf hin, dass dies durch die Kinaseaktivität von NS1 (Phosphorylierung wichtiger Zellkontrollfaktoren) verursacht wird¹²¹.

Die Gewebespezifität der Parvoviren spiegelt sich ihre Abhängigkeit von Zellen mit hoher Mitoserate wieder. So wird aus einem breiten Zellspektrum bei fetalen Geweben ein engeres Zellspektrum in adulten Tieren, die infiziert werden können. Felines wie auch canines Parvovirus findet sich bei einer Infektion adulter Tiere gehäuft in lymphoiden und intestinalen Geweben, also in Organen mit schnell replizierenden Zellen¹²² wieder.

Andererseits spielt auch der Differenzierungsgrad einer Zelle eine wesentliche Rolle. Bei der differenzierungsabhängigen Restriktion wird die parvovirale Replikation in den meisten Fällen durch die Schritte gehemmt, die der Absorption folgen.^{100, 123, 124} Die ersten Parvoviren wurden aus Tumoren und Tumorzelllinien isoliert¹²⁵. Nach anfänglichem Verdacht onkogen zu sein, stellte sich heraus, dass sie opportunistisch in den Tumoren vorliegen. In Zellkulturversuchen konnte für Menschen- und Nagerzellen gezeigt werden, dass eine maligne Transformation in vitro durch verschiedene Behandlungen (Bestrahlung, Chemikalien, Onkogene) sowohl die virale DNA-Replikation und die Genexpression als auch den zytopathischen Effekt der Parvoviren verstärkte. Die Menge der Virusaufnahme durch die Zelle blieb dabei unbeeinträchtigt^{118, 126}. Ähnliche Ergebnisse, wie für transformierte Zelllinien ließen sich auch für eine ganze Reihe von menschlichen Tumorzelllinien, die mit

Einleitung

Parvovirus H1 infiziert wurden, zeigen. Ein besonders intensive onkolytische Wirksamkeit konnte für Glioblastomzellen nachgewiesen werden¹²⁷

Dieser Tropismus für maligne Zellen, insbesondere von Glioblastomzellen, bei gleichzeitiger Apathogenität für alle übrigen humanen Zellen macht das Parvovirus zu einem optimalen Agens für eine Glioblastomtherapie.

Welche Mechanismen für den Zelluntergang nach Infektion mit Parvovirus H1 verantwortlich sind, ist noch nicht genau bekannt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass abhängig vom Zelltyp der Zelluntergang durch Apoptose, durch Zellyse oder durch eine Kombination aus beiden herbeigeführt wird. Sowohl für die Einleitung der Apoptose, als auch der Zellyse spielt das Protein NS1 hierbei eine entscheidende Rolle. In vivo wirkt Parvovirus H1 als starker Stimulator der Immunantwort. Eine Erkennung infizierter Tumorzellen durch dendritische Zellen bewirkt die spezifische Aktivierung von T-Killerzellen und infolgedessen den spezifischen Untergang von malignem Tumorgewebe.

Einleitung

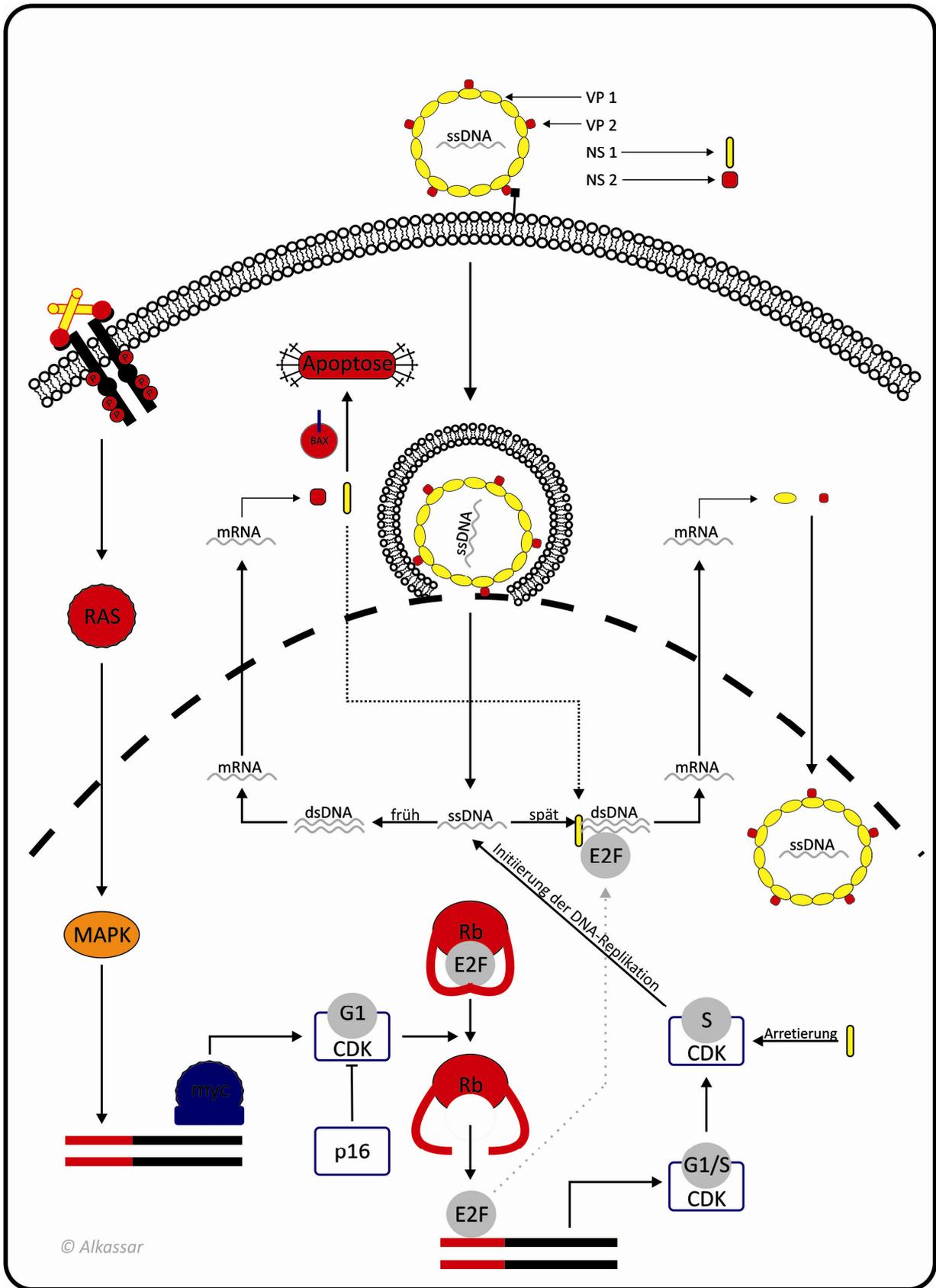


Abbildung 8: Infektionszyklus von Parvovirus H1, Einfluss der Zellzyklusphase S auf die Replikation

I.3 Zielsetzung

Dass Reovirus, NDV und Parvovirus ausgeprägte onkolytische Eigenschaften bei vielen etablierten Glioblastomzelllinien aufweisen, konnte in den letzten 3 Abschnitten dargelegt werden. Diese Eigenschaften bestätigten sich in verschiedenen Tiermodellen für jedes der drei Viren. Dennoch war keines der Viren im klinischen Einsatz bei Glioblastompatienten annähernd so effektiv wie in den zuvor untersuchten Zellmodellen. Ähnlich wie der alleinige Einsatz eines Chemotherapeutikums oder der Strahlentherapie scheinen Tumorzellen nach Behandlung mit onkolytischen Viren Resistenzmechanismen zu entwickeln. Bei Glioblastomen trägt v.a. die Resistenz einer kleinen Tumorphosphonpopulation, den sogenannten Tumorstammzellen, entscheidend zur Manifestierung therapieresistenter Tumorrezeidive bei¹²⁸. Hierbei spielt die Regenerationsfähigkeit der Tumorstammzellen sowie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung eine entscheidende Rolle⁷. Der Wirkmechanismus der bei Glioblastomen verwendeten Chemotherapeutika und Strahlentherapie basiert auf der Induktion von DNA-Doppelbrüchen während der Mitose. Nicht-resistente Tumorzellen reagieren hierauf durch einen aussichtslosen Reparaturversuch und anschließend durch Einleitung der Apoptose¹. Tumorstammzellen sind in der Lage durch Steigerung der DNA-Reparaturenzyme, insbesondere von 6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), den programmierten Zelltod zu umgehen (Abbildung 9). Daneben trägt die Fähigkeit zur aktiven Apoptosehemmung entscheidend zur Resistenz von Tumorstammzellen bei¹²⁹. Die erstmalige chemo- und strahlentherapeutische Behandlung eines Glioblastoms führt dementsprechend fast immer zu einem vollständigen Absterben des Tumors. Dabei sterben lediglich die ausdifferenzierten Tumorzellen ab, die infolge einer irreparabel hohen Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen die intrinsische Apoptose einleiten. Lediglich die kleine Fraktion der Tumorstammzellen entwickelt die oben beschriebenen Resistenzmechanismen und gibt sie an die nachfolgende Tochtergeneration weiter. Das aus den Tochterzellen entstehende Tumorrezeidiv zeigt nun ebenfalls Resistenz. Welche Mechanismen zur Resistenzentstehung nach dem Einsatz onkolytischer Viren in Tumorzellen beitragen, ist bisher nur für wenige Viren untersucht und nur bruchstückhaft verstanden. Die tumorspezifische Toxizitätswirkung onkolytischer Viren unterscheidet sich grundlegend von der herkömmlicher Therapien wie Chemo- und Strahlentherapie. Während die zytotoxische Wirkung der konservativen Therapien unselektiv alle Zellen betrifft und lediglich die gesteigerte Vulnerabilität proliferierender Zellen zu einer Tumorselektivität führt, nutzen

Einleitung

onkolytische Viren das veränderte Expressionsprofil maligner Tumore zum selektiven Wachstum aus. Der Mechanismus, der im Anschluss zum Zelluntergang infizierter Tumore führt, unterscheidet sich von Virus zu Virus und kann durchaus bei demselben Virus in unterschiedlichen Tumoren verschieden ausfallen. Hierbei wird die Zytolyse entweder durch Apoptose oder durch Zellnekrose herbeigeführt. Im Gegensatz zum Zelluntergang nach Chemo-/ Strahlentherapie, bei dem ein vollständig intaktes zelluläres Apoptosesystem benötigt wird, kommt es bei viraler Onkolyse oft zur direkten Intervention viraler Moleküle in der Apoptosekaskade, sodass eine zytotoxische Wirkung auch bei Defekten in einzelnen Apoptoseabschnitten weiterhin bestehen bleibt. Aktuelle Untersuchungen haben die gleiche onkolytische Effizienz von Reovirus bei Tumorstammzellen wie bei ausdifferenzierten Tumorzellen nachweisen können¹³⁰. In ähnlichen Studien konnte dies zuvor für Adenovirus und Herpesvirus nachgewiesen werden¹³¹. Insgesamt setzte man deshalb große Hoffnungen in eine rezidivfreie Heilung durch onkolytische Viren. Dennoch entwickeln auch Viren behandelte Tumorzellen Resistenzen. Wie erste Untersuchungen an verschiedenen onkolytischen Viren zeigen konnten, führt die reduzierte Expression von spezifischen Faktoren, die für eine erfolgreiche Virusreplikation benötigt werden, zur Entstehung resistenter Tumorzellen in den behandelten Tumorzellen. Burkitt Lymphom-Zellen mit starker RAS-Expression entwickeln nach mehrfacher Infektion mit Reovirus resistente Tumorzellen bei denen die RAS-Expression deutlich reduziert ist⁶¹.

Deshalb wurden in den letzten fünf Jahren große Anstrengungen unternommen, durch Kombination onkolytischer Viren mit klassischen Therapien, wie beispielsweise Strahlentherapie oder Chemotherapie, eine Optimierung der Behandlung zu erreichen. Die Kombination zielt dabei auf zwei wesentliche Aspekte:

1. Synergistische Verstärkung des zytotoxischen Effektes und dadurch Reduzierung der Zytostatika und deren Nebenwirkungen.
2. Vermeidung einer Resistenzentstehung.

Die synergistische Wirksamkeit onkolytischer Viren in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie konnte in den letzten Jahren für eine ganze Reihe von Viren nachgewiesen werden. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen für die meisten Kombinationen noch nicht vollständig geklärt sind, scheint ein gemeinsames Prinzip die Verstärkung der apoptotischen Wirksamkeit zu sein¹³². Inwieweit eine solche Kombination auch die

Einleitung

Entstehung von Rezidiven langfristig verhindern kann ist unklar. Ein verstärktes Absterben des Tumors ist einleuchtend, da die maturen Tumorzellen sowohl durch Chemotherapie als auch durch die Virentherapie zerstört werden. Dennoch wird eine Resistenzbildung nicht stärker unterbunden werden können als durch den alleinigen Einsatz einer onkolytischen Therapie, denn die resistenten Tumorstammzellen werden nur vom Virus erfolgreich erkannt und eliminiert.

Eine viel größere Aussicht auf Erfolg hingegen verspricht eine Therapie aus einer Kombination zweier onkolytischer Viren, die unterschiedliche Faktoren für die selektive Replikation in Tumoren benötigen. Anders als bei der Kombination mit einem Chemotherapeutikum muss nun eine Tumorstammzelle die Überexpression von zwei verschiedenen Faktoren drosseln um Therapieresistenz zu erwerben. Besitzen die in Kombination eingesetzten onkolytischen Viren auch gleichzeitig einen unterschiedlichen Mechanismus zur Induktion der Tumorlyse sollte eine vollständige Tumorelimination möglich sein. Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt zeichnen sich die Zelldefekte in Glioblastomen durch ihre starke Heterogenität aus. Astrozytome entwickeln sich aus glialen Stammzellen, die nach Erlangen von Mutationen in den Instanzen der Proliferationsinduktion sowie der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose unkontrolliert wachsen. Wegen der fehlenden Zellzykluskontrolle kommt es im weiteren Verlauf der astroglialen Tumorevolution zur Anhäufung von Mutationen, v.a. solchen, die eine Proliferation des Tumors weiter vorantreiben (Abbildung 4).

Die Auswahl der Viren, die für die Kombinationsversuche bei Glioblastomzellen eingesetzt wurden, orientierte sich an den Unterschieden ihrer Selektivität. Es sollten dabei unterschiedliche Viren zur Erkennung verschiedener Glioblastom-spezifischer Defekte eingesetzt werden. Diese Defekte sollten nach Möglichkeit eine Schlüsselstellung in verschiedenen Instanzen des Glioblastoms einnehmen. Wegen der zentralen Stellung von RAS in der Proliferationskaskade von Glioblastomen wurde Reovirus als erstes onkolytisches Virus für die Kombinationsversuche nominiert.

Glioblastome weisen eine sehr ausgeprägte Mitoserate auf und zeigen eine starke Sensibilität für Parvovirus H1. Die Aufnahme dieses Virus für die Kombinationsversuche zielte auf die Erkennung von Defekten im Bereich der Zellzykluskontrolle. Mit Newcastle

I.4 Fragestellung

Da die Wirkung einer gemeinsamen Zellinfektion mit verschiedenen Virenarten und insbesondere der drei von uns eingesetzten Viren nicht untersucht war, mussten die Auswirkungen der drei Kombinationsmöglichkeiten Reovirus plus NDV, Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus auf Glioblastome untersucht werden. Es galt hierbei folgende Punkte zu klären:

1. Wie ausgeprägt ist die onkolytische Fähigkeit von Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und bestehen hierbei Unterschiede zwischen den Zelllinien U87 und U373?
2. Wie verändert sich die Absterbekinetik durch die Kombinationen (1) Reovirus plus NDV, (2) Reovirus plus Parvovirus und (3) NDV plus Parvovirus im Vergleich zur Monoinfektion und bestehen hierbei Unterschiede zwischen den Zelllinien U87 und U373?
3. Falls ein additiver oder synergistischer Effekt durch eine Kombination der Viren festzustellen ist, muss die Frage des Zusammenwirkens näher beleuchtet werden.
4. Die Austestung einer Kombination von zwei Viren im Mausversuch sollte folgende Fragen beantworten:
 1. Zeigt sich dieselbe Effektivität in vivo wie in vitro?
 2. Treten durch die Kombination onkolytischer Viren neue unvorhergesehene Nebenwirkungen im lebenden Organismus auf?

II Material/Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien/Materialien

| | |
|---|-------------------------------|
| Agarose, low melting S | Appllichem, Darmstadt |
| Ampicillin | Invitrogen, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| DAPI | Appllichem, Darmstadt |
| Deckgläschen | Langenbrinck , Emmendingen |
| DePeX | Serva, Heidelberg |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, München |
| DMSO | Serva, Heidelberg |
| dNTP´s | Sigma-Aldrich, München |
| Erythrozyten | Merk , Ochsenhausen |
| Ethidiumbromid | Serva, Heidelberg |
| Falcon-Röhrchen | PW-Medizintechnik, Berlin |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Invitrogen, Darmstadt |
| Gentamycin (10 mg / ml) | Invitrogen, Darmstadt |
| Hyaluronidase | Appllichem, Darmstadt |
| Iodixanol (OptiPrep) | Progen Biotechnik, Heidelberg |
| Isopropanol | Serva, Heidelberg |
| Käfige aus Makrolon | Techniplast, Hohenpeißenberg |
| Kollagenase D | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| L-Glutamin (200 mM) | Invitrogen, Darmstadt |
| MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5diphenyl-formazan) | Sigma-Aldrich, München |
| Multiwellplatten 6-well, 96-well | Roth, Karlsruhe |
| Neubauerzählkammer | LaborOptik, Friedrichsdorf |
| Neutralrot | Serva, Heidelberg |
| Norleucin | Sigma-Aldrich, München |
| Nylonmembran (Hybond TM -N) | GE (Amersham), Freiburg |
| Objektträger, Teflon beschichtet (<i>Spot slides</i>) | Roth, Karlsruhe |

Material/Methoden

| | |
|---|-----------------------------|
| Penicillin-Streptomycin (10 000 U / ml) | Invitrogen, Darmstadt |
| Phenol Rot | Merck, Darmstadt |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Serva, Heidelberg |
| Pipettierspitzen 10, 100, 1000 µl | Eppendorf, Hamburg |
| Protease Inhibitor Cocktail | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Random Hexamers | Promega, Mannheim |
| Saccharose | Merck, Darmstadt |
| Serologische Pipetten | NeoLab, Heidelberg |
| Tissue Tec | Sakura, Staufen |
| Triton X | Merck, Darmstadt |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Trypanblau | Serva, Heidelberg |
| Trypsin-EDTA | Invitrogen, Darmstadt |
| Ultrazentrifugationsröhrchen (Quick Seal) | Beckman-Coulter, Krefeld |
| Valo SPF-Eier | Lohmann Tierzucht, Cuxhaven |
| Vivaspin | Sartorius, Göttingen |
| X-GAL- IPTG | Serva, Heidelberg |
| Zellhomogenisator (Douncer) | B. Braun, Melsungen |
| Zellkulturflaschen 250 ml, 650 ml | Roth, Karlsruhe |
| Zellkulturschalen | Sigma-Aldrich, München |
| Zellschaber Costar® | VWR, Darmstadt |

Alle weiteren Chemikalien, die verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in Reinstform bezogen.

II.1.2 Mäuse (SCID/NOD)

Charles River, Sulzfeld

II.1.3 Geräte

| | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| CasyTon | Schärfe System GmbH, Reutlingen |
| CO2-Brutschrank CB150 | WTB Binder, Tuttlingen |
| Cryostat Microtome | Leica, Solms |
| Durchflusszytometer (FACSan TM) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Lasermikroskop | Nicon |
| Light Cycler | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Pipettierhilfe Sarpet, | Sarstedt, Nümbrecht |
| Reinraumwerkbank Clean Air | Köttermann, Uetze |
| Heraeus Megafuge 1.0 RF | Thermo Scientific, Karlsruhe |

II.1.4 Puffer und Lösungen

Virus-TE (VTE):

50 mM Tris/HCl (pH 8,7)
0,5 mM EDTA

Blaumarker

Bromphenolblau 0,25% (w/v)
Glycerol 50% (v/v)
EDTA 50 mM

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

140 mM NaCl
25 mM KCl
0,5 MgCl₂
1 mM CaCl₂
10 mM Na-K-Phosphat
3,6 mM K₂HPO₄

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid 10 mg/ml

TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat
1 mM EDTA
Ad pH 7,8 mit Essigsäure

Ligationspuffer (10 x)

ATP 10 mmol
MgCl₂ 50 mmol
DTT 10 mmol
Tris/HCl (pH 7,5)

II.1.5 Kulturmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen (DMEM)

Modified Eagle's Medium, Invitrogen (MEM)

Alle Komplettmedien enthielten 5 oder 10 % fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen)

2 mM-L-Glutamin (Invitrogen) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen).

II.1.6 Nährmedien für Bakterien

Luria Roth Base (Invitrogen): Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5% (w/v) LB-Medium angesetzt und autoklaviert.

Luria's Agar (Invitrogen): Zum Ausstrich der Bakterien auf Platten wurden Petrischalen mit 3,75% (w/v) hergestellt und autoklaviert.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde, abhängig von den jeweiligen Resistenzgenen, Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30mg/ml) zu den Nährmedien zugegeben.

II.1.7 Bakterien

E.colipMosBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMosBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham. Sie wurden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA, als auch im Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

II.1.8 Zelllinien

In Tabelle 3 sind sämtliche verwendete Zellen aufgelistet.

Tabelle 3 Verwendete Zelllinien

| | Ursprung | Kultur | Verwendung | Firma | Referenz |
|--------------------|-------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| Verozellen | Nierenzellen Meerkatze | MEM, 10% FKS | Reovirus- Produktion | ATCC, Wesel | Kawakita, 1963 |
| NBK-Zellen | Fötale, humane Nierenzelle | DMEM, 10 % FKS | Parvovirus- Produktion | DKFZ, Heidelberg | Lin, Ling et al. 1999 |
| U373-Zellen | Humanes Glioblastom | DMEM, 10 % FKS | Onkolyse | ATCC, Wesel | de Ridder et al. 1987 |
| U87 | Humanes Glioblastom | DMEM, 10 % FKS | Onkolyse | ATCC, Wesel | Strojnjk, et al, 2006 |

II.1.9 Viren

Reovirus Typ III, Stamm Dearing: Das Virus stammt ursprünglich aus der Fäzes eines Kindes. Das Virus wurde von ATCC, Wesel bezogen (Ramos-Alvarez and Sabin 1958).

Newcastle Disease Virus, Stamm Hitchner B1: Wildtypisolat aus dem Huhn. Es handelt sich hierbei um einen lentogenen NDV-Stamm. Die Vermehrung erfolgte im Tierseuchenzentrum in embryonierten Hühnereiern. (Hitchner, Reising et al, 1951).

Parvovirus, Stamm Toolan (H1), Ratten-Parvovirus. Es handelt sich um einen aus der Ratte isolierten Virusstamm, der in NBK-Zellen vermehrt wurde (Green, Lebovitz et al, 1979). Das Virus wurde von der Arbeitsgruppe Roemmelaere aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

II.1.10 Nukleinsäure-Extraktion

Die Extraktion der Virus-RNA erfolgte mit dem **RNeasy Mini Kit** nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Solingen).

Die Extraktion der Virus-DNA erfolgte mit dem **DNeasy Blood & Tissue Kit** ebenfalls nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Solingen)

Die gemeinsame Extraktion von viraler DNA und RNA erfolgte mit dem **ViralXpress-Kit** nach Angaben des Herstellers (Millipore, Schwalbach).

II.1.11 Reaktionsansätze (Kits)

| | |
|--|-------------------|
| Qiagen Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Solingen |
| Qiagen Plasmid Mini Kit | Qiagen, Solingen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Solingen |
| In Vitro Transkription: RiboMAX™ Large | |
| Scale RNA Production Systems –SP6 and T7 | Promega, Mannheim |

II.1.12 Vektor pGEM™-T

Der pGEM™-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Alle PCR-Amplifikate enthalten am 3'-Ende ein Desoxyadenosin und können somit ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden erfolgt über die Multiple Cloning Site (MCS). Diese enthält Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme. Der erfolgreiche Einbau des Inserts wird durch die Zerstörung des lacZ-Markergens in einem Blue-White-Screening (Siehe Abschnitt II.2.4.5) angezeigt. Der pGEM™-T Vektor besitzt neben den T7- und SP6-spezifischen Promotoren auch zwei „ori's“ (Origin of Replication). Der Bakterien-„ori“ verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht ihm die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion transformierter Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die Vektorkarte ist in Abbildung 10 dargestellt.

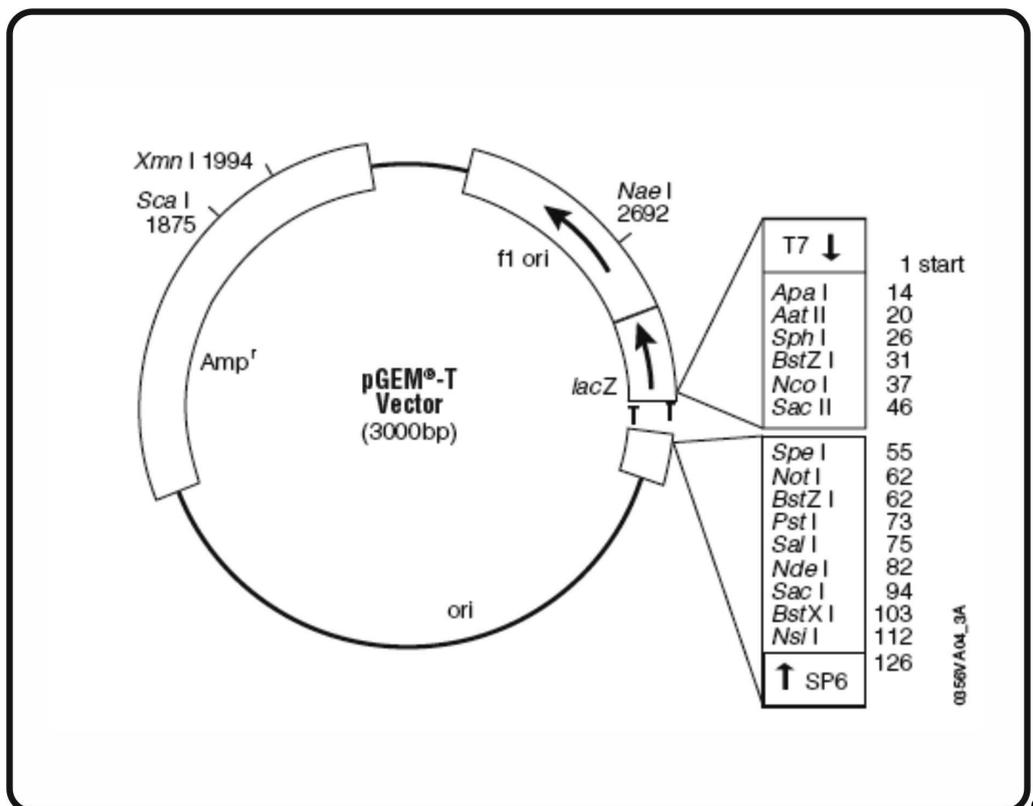


Abbildung 10: pGEM Vektorkarte

II.1.13 Standard-Sequenzen

In Abschnitt I.2.2 wird eine RT-PCR zur Bestimmung der Viruslast von Reo-, ND- und Parvovirus etabliert. Hierfür wurden folgende Plasmide als Standard verwendet:

F-pGEM: Dieses Plasmid wurde aus dem pGEM-Vektor generiert. Einbau einer 254 bp langen kodierenden Sequenz des Newcastle Disease Virus.-spezifischen F-Peptids.

NS1-pGEM: Dieses Plasmid wurde aus dem pGEM-Vektor generiert. Einbau einer 516 bp langen kodierenden Sequenz des Parvovirus H1-spezifischen NS1- Peptids.

L1-pGEM: Dieses Plasmid wurde aus dem pGEM-Vektor generiert. Einbau einer 153bp langen kodierenden Sequenz des Reovirus -spezifischen L1- Peptids.

II.1.14 DNA-Größenmarker

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde als Längenstandard zur Größenbestimmung doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle die 1Kb-Plus Ladder (New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Der Marker enthält folgende Fragmentgrößen: 12.000,11.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.650, 1.000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

II.1.15 Oligonukleotid-Synthese (Primer für RT-PCR)

Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die einzelnen Primerpaare sind in **Tabelle 4** angegeben.

Tabelle 4 Primer-Sequenzen für RTPCR-Standard:

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| NDV | F1 |
| <i>Sense</i> | 5'- CCTTGGTGACTCTATCCGTAGG – 3' |
| <i>Antisense</i> | 5' – CTGCCACTGCTAGTTGGGATATACC – 3' |
| Parvovirus | NS1 |
| <i>Sense</i> | 5'-TCA ATG CGC TCA CCA TCT CTG-3' |
| <i>Antisense</i> | 5'-TCG TAG GCT TCG TCG TGT TCT-3' |
| Reovirus | L1 |
| <i>Sense</i> | 5`-GAATGCAGAACATGATTTCAGCAT-3` |
| <i>Antisense</i> | 5`-TAGCAGTATGCTCAGTAGAGGTGG-3` |

II.1.16 Enzyme

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| RNase A | Sigma-Aldrich, München |
| DNase | Invitrogen, Darmstadt |
| Proteinase K | Böhringer, Ingelheim |
| T4 DNA Ligase | New England Biolabs, Frankfurt |
| Reverse Transkriptase | Promega, Mannheim |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs, Frankfurt |
| Taq-Polymerase | Pharmacia Biotech |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | Promega, Mannheim |
| M-MLV Reverse Transcriptase | Promega, Mannheim |

II.1.17 Antikörper:

Primär-Antikörper:

| | |
|----------------|--|
| Reovirus: | Ziege Anti-Reovirus, FITC-konjugiert, polyklonal (VMRD, Pullman) |
| NDV: | Kaninchen Anti-NDV, polyklonal (Tierseuchenzentrum, Insel Riems) |
| Parvovirus H1: | Ratte Anti-Parvovirus, polyklonal (Charles River, Sulzfeld) |
| Mikrotubuli : | Maus Anti-alpha-Tubulin, monoklonal aus Maus (Invitrogen) |

Sekundär-Antikörper:

| | |
|-------------------------------------|------------------------|
| Anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert | Abcam, Cambridge |
| Anti-Ratte IgG, FITC-konjugiert | Sigma-Aldrich, München |
| Anti-Ratte IgG, TRITC-konjugiert | Sigma-Aldrich, München |
| Anti-Maus IgG, Alexa-Fluor 555 | Sigma-Aldrich, München |
| Anti-Kaninchen IgG, PE-konjugiert | Sigma-Aldrich, München |

II.1.18 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden 1 µg Plasmid-DNA zur Sequenzierung der GATC Biotech AG (Konstanz) übergeben.

II.1.19 Computersoftware

Für die Textverarbeitung wurde MicrosoftWord 2000 verwendet. Graphiken wurden mit CorelDraw 12 erstellt. Zur Erstellung von Tabellen und einfachen Graphiken wurde Microsoft Excel verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 14 (IBM) und CalcuSyn (Biosoft). Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit LightCycler Software (Version 3.5. Roche). Die Bearbeitung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit ImageJ (Wayne Rasband).

II.2 Methoden

II.2.1 Messung des Zellsterbens

II.2.1.1 MTT-Assay

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Messung des zytopathischen Effektes von Viren. Um die Quantität der Zelllyse nach Virus-Behandlung in den Zellpopulationen miteinander vergleichen zu können musste ein geeignetes Verfahren mit einer geringen Fehlerquote etabliert werden.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), ist ebenso wie Alamar-Blue ein Indikator für metabolische Prozesse vitaler Zellen. Nur lebende Zellen mit normaler mitochondrialer Funktion können MTT zu einem unlöslichen, blau gefärbten Formazan-Präzipitat umwandeln.

Alle hier beschriebenen Tests zur Analyse der Zelllyse nach Virusinfektion wurden mittels MTT-Assay durchgeführt.

Hierfür erfolgte 24 h vor Infektion die Aussaat der Glioblastomzellen in 96-well Platten, sodass pro well eine adhärente Zellkultur anwuchs. Bei den beiden verwendeten Zelllinien U87 und U373 mussten hierfür 10.000-15.000 Zellen pro well ausgesät werden. Die Zellen wurden mit 150 µl DMEM Medium/well überschichtet. Für jedes Virus oder jede Viruskombination erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe. Folgende Verdünnungsstufen wurden angesetzt: 1:2, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵. Die Anfangskonzentration für jedes Virus betrug MOI=5 PFU/Zelle in 150 µl DMEM-Medium. Pro well erfolgte anschließend nach Abzug des alten Mediums die Überschichtung mit 150 µl der jeweiligen Virussuspension unterschiedlicher Verdünnungsstufen.

72 h später konnte die Messung der lytischen Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurde pro well 10µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zugegeben und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Überschichtung der Zellen mit 100 µl Isopropanol. Hierbei löste sich der Formazan-Farbstoff auf und die Absorption konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden. Als Referenz diente eine Wellenlänge von 690 nm. Durch Vergleich der Absorptionen infizierter Zellen mit denen unbehandelter Zellen (Kontrollgruppe) konnte der Anteil abgestorbener Zellen eruiert werden. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{X_{550} - H_{690}}{K_{550} - H_{690}} \times 100 = \% \text{ überlebender Zellen}$$

Formel 1 Berechnung des Anteils lebender Zellen mittels MTT-Methode.

Hierfür wird die Absorption der Probe (X_{550}) durch die Adsorption der Positivkontrolle (K_{550}) bei Wellenlänge 550 nm dividiert. Unspezifische Absorptionen wurden jeweils durch Subtraktion der Wellenlänge 690 nm von der gemessenen Proben- und Kontrollabsorption subtrahiert, H_{690}

II.2.1.2 Färbung mit Neutralrot

Der schwach kationische Farbstoff Neutralrot bindet an anionische Vakuolen oder Granula in der Zelle, es erfolgt eine Akkumulation in den Lysosomen. Sobald die Zelle stirbt, kann der Farbstoff nicht mehr in der Zelle gehalten werden, sodass nur lebende Zellen sich rot färben. Die Färbung mit Neutralrot-Lösung wurde zur besseren Darstellung der Plaque bei der Bestimmung der Plaque forming units (PFU) der verschiedenen Viren verwendet.

II.2.1.3 Färbung mit Trypanblau

Ein Aliquot der zu zählenden Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 0,4 % Trypanblau-Lösung vermischt und nach kurzer Inkubation in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Lebende Zellen mit intakter Membran werden im Gegensatz zu absterbenden oder toten Zellen nicht blau angefärbt. Die Zellkonzentration pro ml ergibt sich aus der mittleren Anzahl der Zellen der vier Großquadrate $\times 10^4$, die Verdünnung mit Trypanblau muss zudem berücksichtigt werden.

II.2.2 Real-Time-PCR (RT) mittels LightCycler

II.2.2.1 Prinzip der Real-Time-PCR

Wie aus dem Namen ersichtlich wird in der Real Time PCR kontinuierlich die Menge an PCR-Amplifikat gemessen. Hierfür können verschiedene photometrische Techniken eingesetzt werden.

Die Detektion der PCR-Produkte im LightCycler erfolgte in dieser Arbeit über Hybridisierungssonden. Hierfür macht man sich das FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) Phänomen zunutze. Das Prinzip liegt darin zwei Fluorochrome, bei dem das eine das andere anregen kann, in eine enge räumliche Anordnung zu einander zu bringen.

Material/Methoden

Hierdurch kommt es nach Anregung des ersten Fluorochroms (Akzeptor) zu einer Emission von Licht, welches -erleichtert durch die räumliche Nähe- das zweite Fluorochrom (Donor) anregt. Es wird somit durch die optische Einheit Licht einer Frequenz zur Anregung des Akzeptor-Fluorochroms ausgesendet, gemessen wird das emittierte Licht der Wellenlänge des Donor- Fluorochroms. Die gemessene Lichtintensität hängt somit direkt von der Anzahl der in räumlicher Nähe zueinander stehenden Fluorochrome ab. Indem Oligonukleotide mit angekoppelten Akzeptor- und Donor-Fluorochromen im Rahmen der PCR-Amplifikation eng nebeneinander an die Ziel-DNA hybridisieren, kann in einer Anordnung mit fortlaufender Fluoreszenzmessung die Zunahme der Emission des Donor-Fluorochroms und somit des PCR-Produktes gemessen werden. In allen hier durchgeführten Versuchen wurden die beiden Fluorochrome Fluorescein und LightCycler 640 zur Kennzeichnung entsprechender Hybridisierungs-Sonden verwendet.

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein wird durch blaues Licht der Wellenlänge 470 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 530 nm. Dies ist genau die Wellenlänge, die der Donor-Fluoreszenzfarbstoff LightCycler Red 640 benötigt, um angeregt zu werden. Hierbei emittiert dieser Farbstoff Licht der Wellenlänge 640 nm. Fluorescein-Sonden werden durch Kopplung des Farbstoffs am 3'-Ende des Oligonukleotids angebracht. Der Farbstoff LightCycler 640 wird hingegen am 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids verankert. Nach Hybridisierung an der Ziel-DNA sollten die beiden Sonden nicht mehr als 5 Nukleotide auseinander liegen um eine Anregung zu erzeugen.

Zusammenfassend benötigt man somit zur Durchführung einer Messung ähnlich wie bei einer herkömmlichen PCR-Reaktion passende Primer-Sonden, DNA-Polymerase sowie Nukleotide. Anders als bei einer herkömmlichen PCR werden hier zusätzlich die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Donor- und Akzeptor-Sonden (Fluorescein- und LightCycler 640) zur Darstellung des PCR-Amplifikats benötigt.

Im Rahmen eigener Vorarbeiten (Diplomarbeit Alkassar) erfolgte für jedes Virus die Etablierung entsprechender Primer und Sonden für charakteristische Sequenzen. In Tabelle 4 wurde eine Zusammenfassung der verwendeten Primer-Sequenzen aufgelistet.

II.2.2.2 Aufbau des LightCycler:

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte im LightCycler. Dieser besteht im Wesentlichen aus einem Thermocycler¹³³ und einer optischen Einheit. Im Thermocycler wird die Temperatur während der einzelnen Schritte der PCR reguliert. Die PCR läuft in einer Glaskapillare ab, deren Temperatur durch die umgebende Luft verändert werden kann. Hierfür wird die Luft innerhalb sehr kurzer Zeit erwärmt oder abgekühlt (20°C/s). Insgesamt bietet der LightCycler Platz für 32 Glaskapillaren in der jeweils eine PCR-Reaktion abläuft. Die Anordnung in einem Karussell ermöglicht die regelmäßige Orientierung jeder Kapillare vor der optischen Einheit zur Fluoreszenz-Messung und somit zur Beurteilung des Verlaufs der PCR. Die Messdauer beträgt hierbei 20 ms, sodass jede Kapillare mit einer Frequenz von maximal 25 x /min gemessen werden kann. Gemessen wird jeweils in der Annealing-Phase, zum Zeitpunkt, an dem die Hybridisierung der Fluoreszenz-Sonden an die Ziel-DNA abgeschlossen ist. Dies erlaubt eine Echtzeitanalyse der PCR-Entwicklung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der LightCycler Software .

II.2.2.3 Quantitative PCR im LightCycler

Zur quantitativen Messung macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die gemessene Fluoreszenzintensität am Ende jeder Hybridisierung direkt proportional zum PCR-Produkt ist. Über die Software wird die Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl dargestellt. Der Verlauf der PCR lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase) und eine Plateau-Phase (Abbildung 11). In der frühen Phase kann noch keine Unterscheidung zwischen Hintergrundsignalen und Hybridisierungssignalen gemacht werden. Abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert und der sogenannte Umschlagspunkt (oder auch: Crossing Point (Cp)) definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet. Über die Crossing Points lassen sich rückwirkend vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA anstellen.

Wird ein externer Standard als Verdünnungsreihe mit bekannten Ausgangskonzentrationen in die PCR eingesetzt, bestimmt die Software ebenfalls die Crossing Points der einzelnen Verdünnungen. Über die Darstellung der ermittelten Umschlagspunkte (Cp) gegen den

Logarithmus [DNA-Konzentration (T_0) in $\text{g}/\mu\text{l}$] bei verschiedenen Verdünnungsstufen erhält man eine Regressionsgerade (Standardkurve) mit der folgenden Gleichung:

$$C_p = m \times \log T_0 + b$$

Formel 2: Berechnung der eingesetzten Kopienzahl an DNA unter Verwendung von Standardverdünnungen bekannter Konzentration

Hierbei beschreibt m die Steigung und b den Schnittpunkt mit der y -Achse. Durch Einsatz eines gemessenen Umschlagpunkt (C_p) in die Gleichung kann die Konzentration T_0 einer Probe unbekannter Konzentration eruiert werden.

Die Quantifizierung von unbekanntem Proben erfolgt nun durch Messen der Umschlagpunkte (**Cp**). Über die Gleichung unserer Kurve lässt sich daraus die Ausgangskonzentration **T₀** berechnen. **T₀** ist dabei nicht die tatsächliche Konzentration der Probe, sondern entspricht der Anzahl der DNA-Kopien in der Standardverdünnung **T₀**. Bei Anwendung dieser Gleichung ist entscheidend, dass die Amplifikationseffizienz des Standards und die der Proben zumindest ähnlich sein müssen. Durch Verwendung eines Standards mit derselben Sequenz wie des zu amplifizierenden DNA-Fragments kann eine Gleichheit der Amplifikationseffizienz erreicht werden. Im Rahmen einer zuvor durchgeführten Arbeit¹³⁴ wurde die Herstellung einer entsprechenden Standard-Sequenz für jedes Virus etabliert (Siehe Abschnitt II.1.15).

Es wurden jeweils Sequenzen mit hoher Spezifität für die untersuchten Viren verwendet, die genau einmal in jedem Virusgenom vorkamen. Ausgehend hiervon entsprach die Anzahl der DNA Kopien der Anzahl der Viren in einer Virus-Suspension. Unter Verwendung der Standard-Regressionsgeraden lässt sich durch Messung des Cp der unbekanntem Probe der Viruslösung die Konzentration der Virus-DNA berechnen. Da lediglich die Massenkonzentration (ρ) der Standards bekannt waren, musste im nächsten Schritt eine Umrechnung in Stoffmengenkonzentration (c) durchgeführt werden. Hierfür wurde die Anzahl der Basenpaare der Standardsequenzen in folgender Gleichung eingesetzt:

$$x = \frac{Na \times T_0}{MW}$$

Formel 3: Umrechnung Massenkonzentration in Stoffmengenkonzentration zur Darstellung der viralen Kopienzahl

T_0 =Standardkonzentration in g/ μ l, Na = Avogadro-Zahl = 6×10^{23} /mol,; MW = molare Masse des DNA-Fragmentes in g/mol, x = Anzahl der DNA-Fragmente

Unter Berücksichtigung der Avogadro Konstante lässt sich die genaue Kopienzahl der Viren in der Ausgangslösung angeben. In Abschnitt II.1.13 sind die Basenpaarlängen der drei Standardsequenzen dargestellt. Wegen der unterschiedlichen Basenpaarlängen sowie des Einzelstrang-Charakters der RNA-Standardsequenzen ergibt sich für jedes Virus eine eigene Standardkurve für die Umrechnung der Zyklenzahl in Kopienzahlen.

Zur Analyse der RNA Viren erfolgt vor Start der RT-PCR eine Reverse Transkription, sodass eine der RNA identischen Menge cDNA für die Analyse zur Verfügung steht (Siehe Abschnitt II.2.4.2).

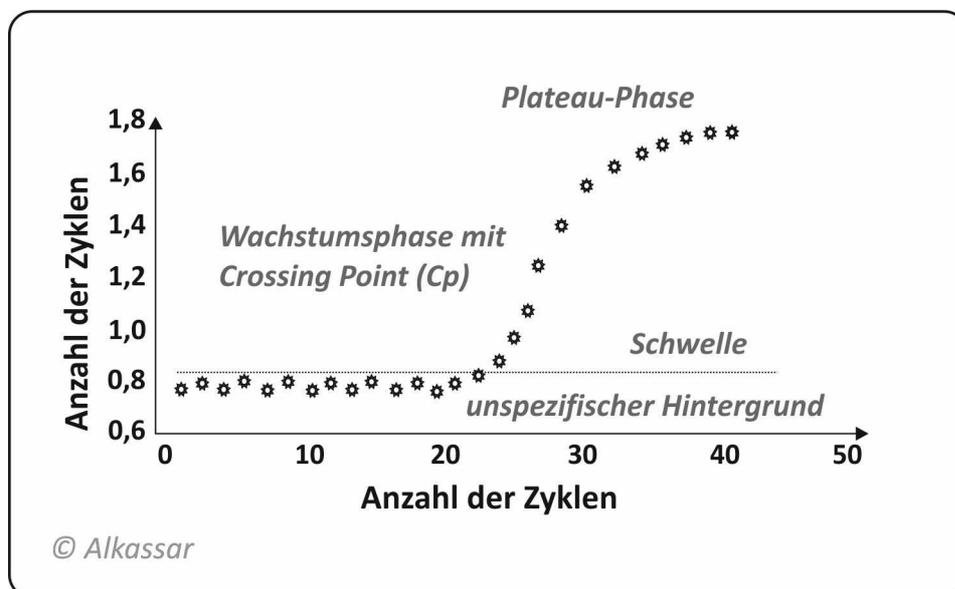


Abbildung 11: Verlauf der Real Time PCR

In den ersten Zyklen ist nur eine schwache Fluoreszenz messbar. Abhängig von der Ausgangsmenge an DNA beginnt bei einer bestimmten Zyklenzahl der exponentielle Anstieg an Amplifikat bis ein Plateau erreicht ist. Der Übergang in die exponentielle Phase wird als Crossing point (Cp) bezeichnet.

II.2.2.4 LightCycler PCR Protokoll

Die PCR im LightCycler wurde unter Verwendung des *FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit* durchgeführt. Die enthaltene FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot Start“-Technologie und minimiert die Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten ¹³⁵
¹³⁶.

Es wurde für jeden Parvovirus-Ansatz folgendes in eine LightCycler Glaskapillare pipettiert:

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| <i>4 µl MgCl</i> | <i>(10 mmol/l)</i> |
| <i>1 µl Forward-Primer</i> | <i>(0,5 µM)</i> |
| <i>1 µl Reward-Primer</i> | <i>(0,5 µM)</i> |
| <i>2 µl Sonde 1, Flurescein</i> | <i>(0,2 µM)</i> |
| <i>2 µl Sonde 2 LC Red640</i> | <i>(0,2 µM)</i> |
| <i>2 µl LightCycler Mastermix</i> | <i>(10x)</i> |
| <i>8 µl Virus-DNA</i> | |

Im Falle der RNA-Viren Reovirus und NDV musste ein veränderter Reaktionsansatz verwendet werden. Da eine Reverse Transkription der PCR zur cDNA-Synthese vorangestellt ist, musste das Gemisch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase beinhalten. In diesem Falle wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

| | |
|--|--------------------|
| <i>2,6 µl MgCl</i> | <i>(10 mmol/l)</i> |
| <i>1 µl Forward-Primer</i> | <i>(0,5 µM)</i> |
| <i>1 µl Reward-Primer</i> | <i>(0,5 µM)</i> |
| <i>2 µl Sonde 1 Flurescein</i> | <i>(0,2 µM)</i> |
| <i>2 µl Sonde 2 LC Red640</i> | <i>(0,2 µM)</i> |
| <i>0,4 µl LightCycler RT-PCR Enzym</i> | |
| <i>4 µl LightCycler R-PCR Master-Mix</i> | <i>(5x)</i> |
| <i>6 µl Virus-DNA</i> | |

Die Reaktionsansätze wurden in den Kapillaren kurz durchmischt und in den LightCycler zur Messung eingebracht.

Material/Methoden

Für Parvovirus wurden folgende Amplifikationseinstellungen verwendet:

| | | |
|--|----------------------|-----------------------------------|
| <i>Initialdenaturierung (1 Zyklus)</i> | | <i>10 min bei 95°C (20°C/s)</i> |
| <i>Amplifikation (45 Zyklen)</i> | <i>Denaturierung</i> | <i>3 s bei 95°C (20°C/s)</i> |
| | <i>Annealing</i> | <i>15 s bei 54°C (20°C/s)</i> |
| | <i>Extension</i> | <i>25 s bei 72°C (20°C/s)</i> |
| <i>Cooling</i> | | <i>3 min bei 40°C (20°C/s)</i> |

Bei Reovirus und NDV war ein Reverse Transkriptase-Schritt der eigentlichen PCR-Reaktion vorangestellt, sodass folgende Amplifikationseinstellungen gewählt wurden:

| | | |
|--|----------------------|-----------------------------------|
| <i>Reverse Transkription</i> | | <i>10 min bei 55°C</i> |
| <i>Initialdenaturierung (1 Zyklus)</i> | | <i>10 min bei 95°C (20°C/s)</i> |
| <i>Amplifikation (45 Zyklen)</i> | <i>Denaturierung</i> | <i>3 s bei 95°C (20°C/s)</i> |
| | <i>Annealing</i> | <i>15 s bei 54°C (20°C/s)</i> |
| | <i>Extension</i> | <i>25 s bei 72°C (20°C/s)</i> |
| <i>Cooling</i> | | <i>3 min bei 40°C (20°C/s)</i> |

II.2.3 Extraktion des viralen Genoms aus Zellüberstand:

Zur Messung der Viruslast mittels RT-PCR war es notwendig die RNA bzw. DNA der Viren aus der zu analysierenden Lösung zu extrahieren. In allen Versuchen wurde hierfür das ViralXpress KIT verwendet, welches sowohl virale DNA als auch virale RNA aufreinigt. Für die Untersuchung der Viruslast im Zellüberstand wurden zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h nach Infektion jeweils 25 µl des Mediums/well abgenommen und das Virus-Genom entsprechend der Anleitung des Herstellers mittels ViralXpress aufbereitet. Jeweils 3 Verdünnungsstufen 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 wurden anschließend aus der hergestellten RNA bzw. DNA für die RT-PCR Analyse eingesetzt.

Die in vivo Untersuchung sollte die Viruslast innerhalb unterschiedlicher Mausegewebe nach intratumoraler Virusapplikation aufzeigen. Hierfür wurde das Gewebe durch einen Zelldouncer aufgeschlossen und anschließend 25 µl des Homogenisats zur Extraktion des viralen Genoms verwendet. Es erfolgte auch hier der Gebrauch des ViralXpress Kits zur Aufreinigung des viralen Genoms. Abhängig von der zu erwartenden Viruslast erfolgte die Erstellung von Verdünnungsstufen 1:100 – 1:10⁷ zum Einsatz in der RT-PCR.

II.2.4 Extraktion, Analyse und Modifikation von Nukleinsäure zur Herstellung von Standardsequenzen für die quantitative RT-PCR:

Die Auswahl virusspezifischer Sequenzen sowie die Prozedur zur Vermehrung und Quantifizierung dieser Sequenzen wurde bereits in eigener Vorarbeit etabliert¹³⁴. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Herstellung neuer Standardsequenzen entsprechend dieser Prozeduren. Für die Erstellung der Standardsequenzen wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Amplifikation der spezifischen Virus Sequenzen mittels PCR.
2. Herstellung einer cDNA vor PCR-Amplifikation bei RNA-Viren.
3. Einbau der Virussequenzen in das Plasmid pGEM durch Ligation.
4. Vermehrung und Aufreinigung der hergestellten Plasmid-DNA.
5. Generierung von RNA Standards aus DNA Standard für Reovirus und NDV .
6. Quantifizierung des Standards und Aliquot Erstellung.

II.2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) – Funktionsprinzip und Einsatz zur Amplifikation gesuchter Virussequenzen:

Die PCR ist ein temperaturreguliertes Verfahren zur Amplifikation gewünschter DNA-Fragmente. Hierzu werden die doppelsträngige Template-DNA durch Erhitzen auf 94°C in einzelsträngige DNA denaturiert. Als Template wird diejenige DNA bezeichnet, aus der die gewünschte Sequenz amplifiziert werden soll. Kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 7-20 bp, sogenannte Primer, hybridisieren im nächsten Schritt an den 3'- und 5'-Enden des zu amplifizierenden Sequenzbereichs. Dies geschieht bei einer Temperatur zwischen 55-65°C, die genaue Temperatur ist hierbei abhängig von der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und sollte ca. 5° unterhalb der Primer-Schmelztemperatur liegen. Es wird jeweils ein Primerpaar eingesetzt. Der Forward-Primer bindet hierbei an den kodierenden DNA-Strang, der Reward-Primer an den nicht kodierenden Strang am gegenüberliegenden Ende der Sequenz. In der anschließenden Elongationsphase erfolgt die Polymerisierungsreaktion (bei 74°C) durch hitzetolerante DNA-Polymerasen. Durch zyklische Wiederholung dieser Reaktion lässt sich die gewünschte Sequenz sehr spezifisch vermehren. Die Endmenge der PCR-DNA nimmt hierbei exponentiell mit der Anzahl der Zyklen zu.

Material/Methoden

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus: 100 ng *template*-DNA, 0.2 mM dNTPs, je 100 pmol *Primer*, 5 µl 10x PCR-Puffer und 1 U *taq*-DNA-Polymerase in einem Endvolumen von 50 µl.

Die Cyclereinstellungen orientierten sich an folgendem Cycler Standard-Programm:

| | | |
|--|----------------------|--------------------|
| <i>Initialdenaturierung (1 Zyklus)</i> | | <i>15 min 94°C</i> |
| <i>Amplifikation (45 Zyklen)</i> | <i>Denaturierung</i> | <i>45 sec 94°C</i> |
| | <i>Annealing:</i> | <i>45 sec 52°C</i> |
| | <i>Extension:</i> | <i>45 sec 72°C</i> |
| <i>Cooling</i> | | <i>10 min 72°C</i> |

II.2.4.2 Reverse Transkription – cDNA-Herstellung Falle zur RT-PCR Analyse von RNA-Viren

Um auch RNA mittels PCR nachweisen zu können, muss diese zunächst in eine komplementäre cDNA umgeschrieben werden. cDNA kann anschließend wie oben beschrieben mittels PCR analysiert werden. Es erfolgte die Verwendung des *Reverse Transcription Systems* von Promega. Hierfür wurde die aufgereinigte RNA (Reovirus und NDV, Siehe Abschnitt II.1.11) nach den Angaben des Herstellers mit 1 µl 10 x DNase I-Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl bei Raumtemperatur 15 min vorbehandelt, um eventuelle DNA-Kontaminationen zu entfernen. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65°C. Das Volumen der RNA-Proben wurde durch Hinzufügen von H₂O auf 15 µl erhöht und zum Vereinzeln von RNA-Doppelsträngen sukzessive jeweils 5 min einer Temperatur von 70°C, 4°C und 25°C ausgesetzt. Diese RNA wurde anschließend für die Reverse Transkription verwendet. Es wurde entsprechend folgendem Protokoll pipettiert:

Reverse Transkription-Mastermixes (10 µl)

1 µl Reverse Transkriptase (1 IU / µl)

5 µl Reverse Transkription-Puffer (5x)

1 µl Zufallsoligomere (500 µg / ml)

0.5 µl RNase-Inhibitoren (40I U / µl)

2.5 µl dNTP's (2.5 mM).

15 µl aufgereinigte Virus-RNA

Das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches für die Reverse Transkription betrug 25 µl. Die Proben wurden nacheinander zunächst für 60 min bei 37°C, dann 5 min bei 90°C und abschließend 15 min bei 4°C inkubiert. Das cDNA Produkt wurde nach Bedarf in H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

II.2.4.3 Agarosegelelektrophorese- Auftrennung der DNA aus der PCR

Zur Auftrennung der gesuchten PCR-Sequenz bzw. der cDNA von anderen nicht erwünschten Nebenprodukten erfolgte die Nutzung der Agarosegelelektrophorese. Hierbei macht man sich die negative Polarität der DNA zur Auftrennung innerhalb eines geladenen Feldes zunutze. Agarosegel dient dabei als Molekularsieb. Die Polarität bewirkt, dass kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern als Große. Wegen des konstanten Massen-Ladungs-Verhältnisses besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen der DNA-Fragmentlänge und der DNA-Laufgeschwindigkeit. Zusätzlich spielt die gewählte Agarosekonzentration eine entscheidende Rolle. Bei niedriger Agarosekonzentration entstehen große Poren in der Gelmatrix, sodass die DNA schneller wandern kann. Einfluss auf das Laufverhalten hat daneben auch die Konformation der DNA-Moleküle. Supercoiled DNA wandert am schnellsten, während die offene lineare Form ein etwas langsames Laufverhalten aufweist. Die Auftrennung erfolgte in 1%-igem Agarosegel (w/v) in Tris-Acetat-Puffer, der mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt ist. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und ermöglicht damit eine Darstellung der getrennten DNA-Banden unter UV-Licht.

Die aufgetrennten DNA-Banden im Gel wurden unter der UV-Lampe bei 366 nm dargestellt und die gesuchte Bande für die weitere Bearbeitung ausgeschnitten.

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Extraktion und Aufreinigung dieser Sequenzen erfolgte mit dem *QIAquick-Extraktionskit* nach Angaben des Herstellers.

II.2.4.4 Ligation der spezifischen Sequenzen in das Plasmid pGEM:

Die Vermehrung der virusspezifischen Sequenzen erfolgte in einem Bakterien-Plasmid-System. Der Vektor pGEMTM-T der Firma Promega wurde hierfür verwendet (Abbildung 10). Hierzu mussten die entsprechenden Sequenzen zunächst in den Vektor inkloniert werden. Der Vektor liegt vor der Ligation in linearisierter Form vor, die Enden liegen hierbei im Bereich des Multiple Cloning Site (MCS) und trennen das lacZ-Gen. Wegen der Thymidinenden des offenen Plasmids können PCR-Produkte, die immer Adenosin-reiche Enden aufweisen, direkt ohne vorherigen Restriktionsverdau eingebaut werden. Hierfür wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese Ligase lässt sich aus Bakterien isolieren, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind, und gehört zu den DNA-Reparaturenzymen. Durch Verknüpfung der Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden wird eine Ligation zweier DNA-Fragmente ermöglicht. Die Effektivität der Ligation hängt von der eingesetzten Konzentration an Vektor und Insert ab. Deshalb wurde die 5-fache Menge an Insert eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl 10-fach Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase [1 U/µl] wurde der Reaktionsansatz mit H₂O bidest auf 20 µl aufgefüllt und 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ligation erfolgte der Einsatz von 10 µl zur Transformation kompetenter Bakterien. Die Transformationskontrolle erfolgte mittels einer Antibiotika-Resistenz, die nur bei pGEM-Vektoren in zirkulärer Form gegeben ist.

II.2.4.5 Blue/White Screening

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Überprüfung des Erfolges der Ligation eines Vektors mit einem Insert. Mit dem erfolgreichen Einbau des Inserts kommt es gleichzeitig zu einer Zerstörung des lacZ-Markergens. Nach Transformation eines zirkulären pGEM-Vektors ohne eingebaute Sequenz in kompetente E.coli-Bakterien ist die lacZ-Region noch aktiv und stellt die Fragmente a- und b-Galaktosidase her. Zur vollständigen Aktivierung des Enzyms bedarf es noch des Fragments w-Galaktosidase, welches in Bakterienstämmen, die für das Gen lacZdM15 kodieren, vorhanden ist. Wird somit ein lacZdM15-Gen-tragender E.coli Stamm, wie beispielsweise pMOS, mit dem Vektor pGEM transformiert, ist dieser in der Lage aktive Galaktosidase herzustellen. Zur Induktion der Transkription des lacZ-Gens wird IPTG (Isopropylthiogalactosid), ein nicht metabolisierbares Glucose-Analogon, verwendet.

Im Folgenden wird der zuvor dem Bakterien-Nährmedium hinzugefügte Farbstoff X-GAL

gespalten. Hierdurch kommt es zur Abspaltung des an Galaktose gebundenen Farbstoffs Indol, was zu einer Blaufärbung der betroffenen Bakterienkolonie führt. Im Falle eines erfolgreichen Einbaus kann lacZ nicht transkribiert werden, sodass keine Galaktosidase gebildet wird und die entsprechenden Kolonien weiß bleiben. Diese werden zur weiteren Verwendung vermehrt und weiter untersucht. Der Vektor pGEMTM besitzt neben den T7- und SP6-spezifischen Promotoren auch zwei „ori's“ (Origin of Replication). Der Bakterien-„ori“ verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht ihm die Erzeugung von Einzelstrang-DNA (ssDNA). Für die Selektion transformierter Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen (Abbildung 10).

Es erfolgte jeweils eine Ligation der Sequenzen L1, NS und F in den Vektor pGEM sowie die anschließende Transformation in E.coli-Kulturen entsprechend den Angaben des Herstellers (Siehe Abschnitt II.2.4.2).

Für die Vermehrung und Aufreinigung der Plasmide wurde eine Maxipräparation (Siehe Abschnitt II.2.4.6.2) durchgeführt.

II.2.4.6 Vermehrung und Aufreinigung der hergestellten Plasmide

II.2.4.6.1 Minipräparation

1 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium wurden jeweils mit einer weißen Bakterienkolonie aus dem Blue/White Screening angeimpft und über Nacht unter Schütteln kultiviert. Die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem Plasmid Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Durch Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese erfolgte die Überprüfung des korrekten Einbaus in den Vektor.

II.2.4.6.2 Maxipräparation

In unseren Versuchen wurden Standardsequenzen für die Genome von Reovirus, NDV und Parvovirus hergestellt. Es wurden hierfür die Sequenzen L1 (Reovirus), NS1 (Parvovirus) und F (NDV) in pGEM inkloniert und durch Maxipräparation vermehrt. Hierzu erfolgte die Beimpfung von 250 ml LB-Medium mit jeweils einer weißen Kolonie. Nach einer 16-stündigen Inkubation unter Schütteln erfolgte die Extraktion der Plasmid-DNA, basierend auf

dem Prinzip der alkalischen Lyse, mit dem Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Das Plasmid NS1-pGEM wurde in Aliquots der Konzentration 1 µg/ml bei -70°C aufbewahrt. Für jeden RT-PCR-Durchlauf wurde im Folgenden genau ein Aliquot zur Erstellung einer Standardverdünnungsreihe eingesetzt. Die Vektoren L-pGEM und F-pGEM dienten als Matrizen zur Erstellung entsprechender RNA-Sequenzen.

Als Endkontrolle wurde jedes Plasmid einer spezifischen Restriktionshydrolyse unterzogen und die Länge des DNA-Inserts in Agarosegel überprüft.

II.2.4.7 Restriktionsverdau – Ausschneiden der Standardsequenzen aus pGEM

Für die DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen wurden die Restriktionsbedingungen nach Angaben der Enzym-Hersteller gewählt. In der Regel wurden pro 0,5 µg DNA 5 Enzymeinheiten eingesetzt, für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und durch anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

Der Restriktionsverdau wurde zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation in Plasmiden verwendet. Tabelle 5 zeigt, welche Enzyme zum Schneiden der Plasmide L1-pGEM, F-pGEM und NS1-pGEM verwendet wurden, sowie die Längen der sich daraus ergebenden Spaltfragmente.

Tabelle 5 Verwendete Restriktionsenzyme zum Herausschneiden der virusspezifischen Sequenzen L1, F und NS aus dem Plasmid pGEM. Die Fragmentlängen der Spaltprodukte sind in Anzahl Basenpaaren (bp) angegeben.

| Plasmid | Enzyme | Fragmentlängen (bp) |
|-----------------|---------------|----------------------------|
| <i>L1-pGEM</i> | SAC I/SAC II | 2952; 303 |
| <i>F-pGEM</i> | SAC I/SAC II | 2952; 201 |
| <i>NS1-pGEM</i> | SAC I/SAC II | 2952; 564 |

II.2.4.8 Photometrische Messung - Quantifizierung der Standardsequenzen

Nukleinsäuren zeigen aufgrund der in ihnen enthaltenen Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm im ultravioletten Bereich, Proteine dagegen absorbieren hauptsächlich bei 280 nm. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von eins bei einer Schichtdicke von 1 cm jeweils einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 33 µg/ml ssDNA und 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis zwischen den gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über eine eventuelle Verunreinigung der DNA- oder RNA-Probe mit Proteinen. Bei reinen Nukleinsäure-Lösungen liegt der Quotient beider Werte (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,8 und 2,0.

II.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Messung von optischen Eigenschaften einzelner Zellen in möglichst großer Zahl, sodass die untersuchte Zellpopulation quantitativ nach bestimmten Kriterien aufgetrennt werden kann. Hierzu passiert jede Zelle einzeln eine Apparatur, in der sie von einem Laserstrahl getroffen wird. Durch die Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften jeder einzelnen Zelle können Rückschlüsse auf ihre Größe und ihre intrazelluläre Struktur gezogen werden. Hierzu erfolgt die Messung der Vorwärtstreuung mit dem Forward Scatter (FSC) sowie der Seitwärtstreuung mit dem Sidewards Scatter (SSC). Im rechten Winkel gebrochenes Licht wird überwiegend vom Sidewards Scatter registriert, die gemessene Lichtintensität korreliert hierbei mit dem intrazellulären Membrananteil (z.B. Verwendung zur Unterscheidung verschieden granulierter neutrophiler Zellen). Das im Forward Scatter gebeugte Licht liefert eine direkte Aussage über das Zellvolumen. In einer solchen Anordnung können durch Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen und deren Messung im Forward Scatter ganz spezifisch fluoreszenzmarkierte Zellen in Anzahl sowie Intensität ihrer Fluoreszenzfärbung gemessen werden.

Der Aufbau des von uns verwendeten Durchflusszytometers FACScan™ setzt sich aus 5 Komponenten zusammen:

1. Durchflusszelle: Die Zellfokussierung der Zellen geschieht hydrodynamisch. Hierbei passieren die Zellen mittels Überdruck einzeln eine enge Glaskapillare, an der ein Laserstrahl die Zellen in einem definierten Messbereich trifft.

Material/Methoden

2. Lichtquelle: Zur Anregung der Zellen dient ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm.
3. Lichtfilter: Fluoreszenzfarbstoffe, die durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden, können für Fluoreszenzmessungen der Zellen eingesetzt werden. Zur Auftrennung der verschiedenen Emissionsspektren werden dichromatische Filter mit einer unterschiedlichen Wellenlängendurchlässigkeit verwendet. FACSan verwendet zur Unterteilung des emittierten Lichts 3 Filter, sodass eine gleichzeitige Messung in folgenden Wellenlängenbereichen möglich ist: L1-Kanal 515 – 545 nm, L2-Kanal 543 – 627 nm und L3-Kanal > 650 nm.
4. Lichtdetektor: Messung des emittierten Lichts in einem optischen System über Photomultiplier. Die Auflösung der eintreffenden Lichtintensität wird innerhalb einer Bandbreite von 1024 Intensitätsstufen in Form von Punktdiagrammen, Histogramm oder Intensitätskurven dargestellt.
5. Datenanalyse: Die Auswertung der Rohdaten erfolgt über einen Computer. Es wurde die Software CellQuest verwendet.

Der Einsatz der Durchflusszytometrie erfolgte in unserer Arbeit zur Quantifizierung des Anteils virusinfizierter Zellen. Hierfür erfolgte eine Markierung der intrazellulären Virusproteine von Reovirus, NDV und Parvovirus mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Es wurden Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und PE verwendet. Die Verschiedenheit der Emissionsspektren von FITC und PE ermöglicht die simultane Messung beider Farbstoffe und somit den Nachweis von zwei Viren in einer Zelle.

Hierfür wurden jeweils 10^6 Zellen (U87 oder U373) in 6-well Platten mit einem oder zwei Viren der Konzentration von jeweils 5 PFU/Zelle 24 Stunden nach Ausplattieren infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mittels Trypsinverdau (0,25%) von der Zellschale abgelöst und zusammen mit dem Überstand für eine Minute bei 1000 g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in PBS erfolgte die Aufnahme der Zellen in 100 µl PBS-Medium. Im Rahmen der in vivo Versuche wurden Leber und Tumor behandelte Mäuse für die durchflusszytometrische Analyse verwendet. Zur Aufbereitung von Leber und Tumor erfolgte der Verdau von jeweils 0,1-0,2 g Gewebe für 1 h mit Kollagenase (0,25%) bei 37°C. Die aus dem Gewebeverband gelösten Zellen wurden durch

ein 170 µm Nylonfilter vom restlichen Gewebe getrennt, dreimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen.

Die weitere Aufbereitung der Zellen aus Zellkultur und Mausgewebe war identisch. Nach Fixierung mit 70%-igem Ethanol für eine Stunde wurden die Zellen zur Förderung der Membrandurchlässigkeit für 10 Minuten mit Triton-X (0,25% in PBS) behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Zwischen jedem dieser Schritte erfolgte das dreimalige Waschen der Zellen mit PBS. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt II.1.17 dargestellt.

Die derart aufbereiteten Zellen wurden für durchflusszytometrisch analysiert. Für jeden Versuch wurden jeweils 20 000 Zellen gemessen.

II.2.6 Immunhistologie

Hierfür erfolgte die Aussaat von jeweils ca. 500 000 Zellen auf Deckgläschen in 6-well Kulturschalen unter Hinzugabe von jeweils 1 ml DMEM-Medium (+ 5%FCS). Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt und Reovirus, Parvovirus oder NDV der Konzentration von jeweils MOI = 5 PFU/Zelle einzeln oder in Kombination hinzugegeben. Die Zellen wurden 48 Stunden später in Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert und mit Triton X (0,25% in PBS) permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Zwischen jedem dieser Schritte erfolgte das dreimalige Waschen der Zellen mit PBS. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt II.1.17 dargestellt. Zur Gegenfärbung des Kerns erfolgte die Inkubation mit DAPI (1µg/ml in Methanol) für 2 min. Die Deckgläschen mit den Antikörper-behandelten Zellen wurden im letzten Schritt durch das Kunstharz DEPEX auf Objektträgern fixiert und mittels Lasermikroskopie begutachtet.

II.2.7 Konfokale Lasermikroskopie

Es wurde ein Nikon E600 Mikroskop mit einer Nipkow-Scheibe zur konfokalen Abtastung verwendet (CSU10, Yokogawa Japan). Folgende Laserdioden wurden zur Erzeugung der Anregungsstrahlung eingesetzt: Compass 405 (Coherent, USA) für Licht der Wellenlänge von 405 nm, Sapphire 488-30 (Coherent, USA) für Licht der Wellenlänge 488 nm und LDM 635 (Oicron, Deutschland) für Licht der Wellenlänge 635 nm.

Um FITC-markierte Antikörper darzustellen wurde der Wellenlängenbereich von > 519 gemessen. Zur Darstellung TRITC-markierter Antikörper erfolgte die Auswahl eines Messbereichs > 576 nm. Die Detektion erfolgte über einen Photomultiplier mit anschließender Digitalisierung und Darstellung mittels der Software ImageJ. An einem Negativansatz wurden Laserleistung und Signalamplifikation justiert. Die Anregungsenergie wurde mit ca. 30% der maximalen Laserleistung so gewählt, dass die Negativkontrollen eine geringe, unspezifische Hintergrundfluoreszenz zeigten. Dabei wurden die Zellen fokussiert und gescannt. Die untersuchte Ebene in der vertikalen Achse wurde so eingestellt, dass der Zellkern durchschnitten wurde. Hierfür wurde die Messblende des Mikroskops (pinhole) so justiert, dass die DAPI-markierte Kernmembran als scharfer Ring erschien. Unter den gleichen Einstellungen erfolgte die Untersuchung der positiven Proben. Ihre Fluoreszenzintensität ist somit in Relation zur Negativkontrolle zu bewerten. Die Fluoreszenzen der beiden Farbstoffe im mikroskopischen Bild wurden einzeln nacheinander aufgenommen (Kanal 1 und Kanal 2). Durch elektronische Überlagerung der Abbildungen beider Kanäle ließen sich Kollokationen der Fluoreszenzen ermitteln. Von jedem mikroskopischen Präparat wurden drei Bitmap-Grafiken erstellt und in anschließender Nachbearbeitung in ImageJ zusammengefügt.

II.2.8 Zellbiologische Methoden

II.2.8.1 Zellkulturen

Die in Tabelle 3 aufgeführten Zellen wurden unter etablierten Kulturbedingungen bei 5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit vermehrt. Als Zellkulturmedium diente je nach Zelllinie MEM oder DMEM, welches alle 3 Tage gewechselt wurde. Zusätzlich enthielt das Medium 10% fötales Kälberserum (FCS) und 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin. Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 0,25%-Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde im Durchlichtmikroskop verfolgt. Durch Hinzugabe von FCS-haltigem Medium wurde der Trypsinverdau schließlich gestoppt und die Zellen nach Hinzugabe von frischem Medium erneut ausgesät.

II.2.8.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Hierfür wurden die Zellen in einer 75 cm²-Kulturschale angezogen und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % abtrypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml frisch angesetztem Einfriermedium (60 % Medium, 30 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und langsam über 24 h auf -80°C heruntergekühlt.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen schnell in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und in ca. 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen.

II.2.8.3 Zellzahlbestimmung durch das Zellanalysegerät CASY™:

Eine Zellzahlbestimmung war sowohl zur Herstellung von Zellkulturen, als auch für die subkutane Implantation von Zellen in Mäusen wichtig. Dies erfolgte mit dem Zellanalysegerät der Firma Schade. Das Gerät ist in der Lage, sowohl die Zelldichte als auch die Verteilung der Zellgrößen innerhalb einer Suspension zu messen. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass intakte Zellen sich in einem elektrisch leitenden Medium wie Isolatoren verhalten. Indem diese eine elektrische Messzelle passieren kann eine Veränderung des elektrischen Widerstandes gemessen werden.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen im Verhältnis von 1:1.000 in Casyton verdünnt. Anzahl und Größenverteilung der Zellen wurde in Form eines Histogramms angegeben.

II.2.9 Mikrobiologische Methoden:

II.2.9.1 Kultivierung und Kryokonservierung von E.coli

E.coli wurden ausschließlich für die Plasmid-Vermehrung benötigt. Hierfür wurde der E.coli-Stamm pMosBlue eingesetzt. Für analytische Zwecke wurden die Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien hieraus wurden anschließend in jeweils 2,5 ml LB-Suspensionskultur unter Schütteln bei 37°C für 12-16 Stunden inkubiert. Zur selektiven Kultivierung wurde den LB-Agarplatten und LB-Suspensionskulturen Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

Zur Kryokonservierung wurden jeweils 800 µl der Kultur mit 20% (v/v) DMSO versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

II.2.9.2 Herstellung kompetenter Bakterien:

Unbehandelte E.coli-Bakterien nehmen in der Regel nicht ohne Weiteres Fremd-DNA auf. Da man die Fähigkeit von E.coli-DNA schnell zu replizieren für die Plasmid-Vermehrung nutzen will, werden die Bakterien einer sogenannten Kompetenzinduktion unterzogen. Sie sollen hierdurch zur Aufnahme von Plasmid-DNA befähigt werden. Hierzu wird die Bakterienzellwand durch chemische Einflüsse durchlässig gemacht, sodass DNA in die Zelle eingeschleust werden kann. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB Medium mit bereits kompetenten Bakterien angeimpft. 8 ml dieser Vorkultur dienten am nächsten Tag zur Beimpfung von 200 ml SOB-Medium, welches bei 37°C inkubiert wird. Beim Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase, welches einer optischen Dichte von 0,3 (600 nm) entspricht, wurde die Suspension bei 4°C mit 2000 rpm abzentrifugiert und für 15 min in Transformationspuffer 1 resuspendiert. Es folgte daraufhin ein letzter Zentrifugationsschritt mit anschließender Aufnahme des Pellets in 16 ml Transformationspuffer 2. Zum Einfrieren erfolgten die Herstellung von Aliquots zu je 200 µl, und das Einbringen in flüssigen Stickstoff. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Die so hergestellten Bakterien wurden in folgenden Versuchen zur Transformation mit dem Plasmid pGEM eingesetzt.

II.2.10 Tierexperimentelle Methoden

II.2.10.1 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden an 4-6 Wochen alten SCID-Mäusen der Firma Charles River durchgeführt. Es wurden lediglich weibliche Mäuse verwendet, die in Gruppen von 4 Tieren in Käfigen der Größe 425 x 266 x 155 mm gehalten wurden. Die Haltung erfolgte unter Beachtung eines Wechsels von Licht/Dunkel alle 12 Stunden bei 20°C. Da es sich um immuninkompetente Mäuse handelt, erfolgte die Haltung in einer SPF Einheit (spezifiziert pathogenfrei), in der durch Sterilisation von Luft, Wasser, Futter, Käfigen und Einstreu sowie einer dreistufigen Schleuse eine Reduktion der Keimzahl erreicht wird. Die Behandlung und Untersuchung der Tiere wurde in S2-Werkbänken durchgeführt. Die Tötung erfolgte mittels CO₂. Alle Prozeduren wurden von der Saarländischen Tierschutzkommission genehmigt.

II.2.10.2 Induktion von Tumoren mit *in vitro* infizierten Zellen

In den hier durchgeführten *in vivo* Versuchen sollten Xenograft Mäuse mit subkutan wachsenden Tumoren intratumoral mit den zuvor *in vitro* getesteten Viren einzeln und in Kombination behandelt werden. Die Herstellung der Xenograft-Mäuse erfolgte durch subkutane Injektion von Tumorzellen in die Tiere. Hierfür erfolgte am Vortag das Aussäen von U87-Zellen in 250 ml Schalen. Diese wurden von der Schale abtrypsiniert, dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Durch das Zellanalysegerät CASY™ wurden die Zellen gezählt und eine Zellsuspension der Konzentration 10⁷ Zellen/ml hergestellt. Hieraus wurden jeweils 100 µl in die linke Flanke subkutan injiziert. 100 µl der verbliebenen Suspension wurden zur Kontrolle der Vitalität der Zellen sowie ihrer Keimfreiheit in einer 10cm-Schale ausgesät und in den folgenden Tagen beobachtet. Beim erfolgreichen Anwachsen ließ sich der Tumor nach 8-14 Tagen subkutan palpieren.

II.2.10.3 Messung des Tumolvolumens in vivo

Die Messung des subkutan wachsenden Tumors erfolgte täglich. Hierfür wurde Länge (l), Breite (b) und Höhe (h) des Tumors mittels einer Schublehre gemessen und das Volumen wie folgt berechnet:

Formel 4

$$V = \frac{\pi}{6} \times l \times b \times h$$

II.2.10.4 Intratumorale Infektion

Bei einer Tumorgröße von 10-15 mm³ erfolgte die Injektion von jeweils 50 µl Virussuspension in den Tumor. Folgende Viruskonzentrationen wurden hierfür gewählt: Reovirus 10⁷ PFU; NDV 10⁸ PFU. Da ein lentogener NDV-Stamm zur Therapie verwendet wurde, erfolgte die Applikation von NDV an den Tagen 2 und 4 post infectionem. Bei Kombination erfolgte die Gabe von jeweils 25 µl mit einer Viruskonzentration von ebenfalls Reovirus 10⁷ PFU und NDV 10⁸PFU, sodass alle Tumore mit einer Gesamtmenge von 50 ml behandelt wurden. Die Kontrollmäuse wurden mit 50 µl PBS behandelt. Die Mäuse wurden anschließend täglich gewogen und auf Gewichtsverlust, Austrocknung, sowie Paralysen hin untersucht. Die Tötung aller Tiere erfolgte am 12. Tag nach Infektion, bei starker Gewichtsabnahme oder bei ausgeprägter Behinderung durch den Tumor. Pro Gruppe wurden jeweils 4 Mäuse behandelt.

II.2.10.5 Aufbereitung von Mausgewebe zur virologischen Analyse:

Nach Tötung der Mäuse erfolgte die Entnahme des Tumors sowie von Leber und Gehirn. Die Organe wurden jeweils in drei Portionen aufgeteilt. Ein Teil wurde zur histologischen Immunanalyse mit Tissue Tec bedeckt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit Hilfe eines Kryostats wurden hieraus anschließend histologische Schnitte von 6µm Dicke hergestellt und auf Objektträgern aufgebracht. Die immunhistologische Anfärbung verlief entsprechend dem in Abschnitt II.2.6 beschriebenen Protokoll. Aus den beiden anderen

Anteilen erfolgte die Aufbereitung von RNA zur Viruslastbestimmung, sowie die Vereinzelnung von Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse (Siehe Abschnitt II.2.5).

II.2.11 Virologische Methoden

II.2.11.1 Virusvermehrung

II.2.11.1.1 Parvovirus-Produktion

H1 Wildtyp Viren wurden in NBK-Zellen produziert. Nahezu konfluente 75 cm² Schalen wurden mit einer MOI von 0,01 PFU/Zelle infiziert und nach 12 h auf neue Schalen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Bei deutlich sichtbarer Zytolyse, in der Regel nach 4-5 Tagen, erfolgte die Ernte des Virus.

Hierfür wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und zusammen mit dem Überstand bei 1000 x g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet von je einer Kulturschale in 1ml VTE-Medium (siehe Material/Puffer) resuspendiert und durch 3-4 Frier/Tauzyklen aufgebrochen.

Grobe Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min abgetrennt und der Überstand mit dem zuvor entnommenen Kulturüberstand vereinigt. Die Aufreinigung des Virus erfolgte über einen Iodixanol-Gradienten.

II.2.11.1.2 Reovirus-Produktion

Hierfür wurden Verozellen in 75cm² Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert und anschließend mit Reovirus der Konzentration 0,5 MOI infiziert.

Nach 12 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei Eintreten einer sichtbaren Zytolyse, in der Regel nach 4-5 Tagen, von der Kulturflasche abgeschabt und pelletiert. Die Zellen im Pellet wurden in 1 ml VTE Puffer/75 cm-Kulturflasche aufgenommen und auf Eis mittels eines Glas-Dounser mechanisch aufgebrochen. Zur besseren Trennung von Virus und Zytoplasmamembran wurde der VTE-Puffer vor Zugabe zum Zellpellet mit Triton X-100 auf eine Konzentration von 1 % eingestellt.

Die Kontrolle des Zellaufschlusses erfolgte über die Trypanblau-Methode (Abschnitt II.2.1).

II.2.11.1.3 NDV-Produktion

Die Vermehrung der Newcastle Disease Viren erfolgte in befruchteten Eiern. Hierfür wurden ungeimpfte SPF-Eier mit einem Gewicht von 60-70 verwendet. Nach 11-tägiger Bebrütung bei 37°C und 60 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator wurden die Eier mit je 100 µl einer eingestellten Virussuspension ($EID_{50} = 10^7/ml$) inokuliert. Hierbei wurde, wie in

Abbildung 12 dargestellt, das zu vermehrende Virus in die Allantoishöhle des Kükenembryos gespritzt und die Eier für weitere 3 Tage bebrütet.

Es erfolgte in den kommenden 3 Tagen eine tägliche Kontrolle der Eier. Mittels einer starken Lampe wurden diese durchleuchtet und Eier mit abgestorbenen Embryos entfernt. Eier, die schon 24 h nach Infektion abgestorben waren, wurden als Impfschäden verworfen. Eier die nach 48h und 72 h abgestorben waren wurden zur späteren Virusernte bei 4° C aufbewahrt.

Eier, die noch nach 72 h am Leben waren wurden durch Lagerung bei 4°C über Nacht abgetötet. Die Ernte der Amnionflüssigkeit erfolgte unter der Sterilbank. Nach Entfernung der Eischale im Bereich der Luftkammer konnte die virushaltige Amnionflüssigkeit durch leichtes Einstechen der Chorio-Allantois-Membran entnommen werden. Nur klare Amnionflüssigkeit wurde verwertet. Je nach Größe des Eis konnten zwischen 7-14 ml Amnionflüssigkeit gewonnen werden. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Amnionflüssigkeit gepoolt.

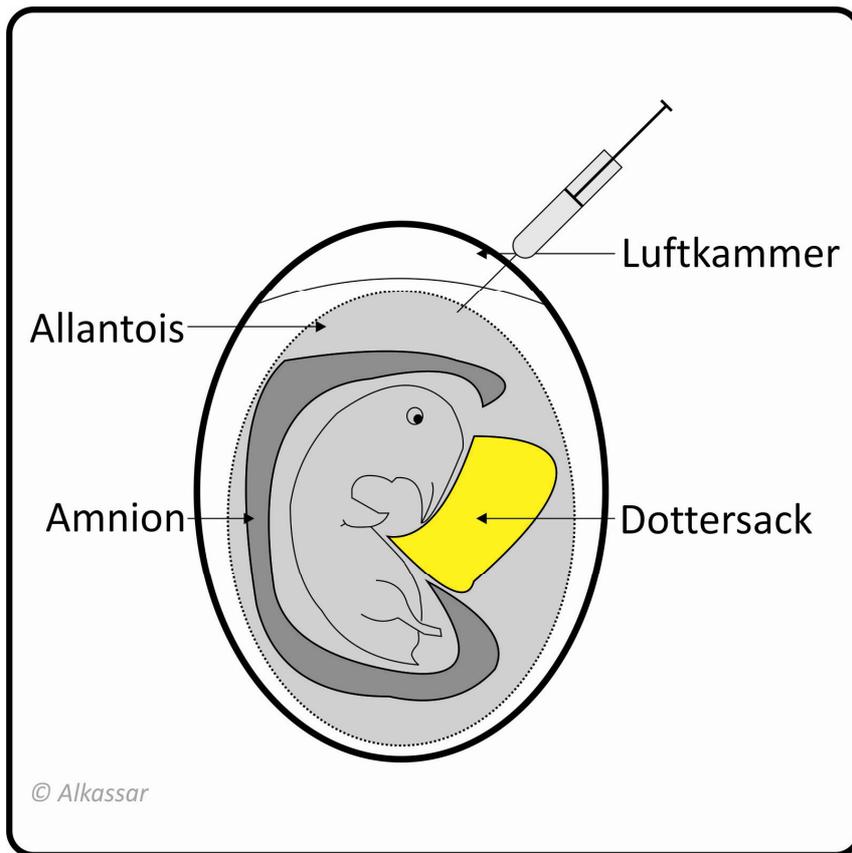


Abbildung 12: Beimpfung von 10 Tage alten Embryonen mit NDV

II.2.11.2 Virusaufreinigung

II.2.11.2.1 Parvovirus-Aufreinigung

Im ersten Schritt erfolgte die Pelletierung des Virus durch Abzentrifugation des Lysats für 4 h bei 40.000 rpm (Beckmann, Type 50.2 Ti T; ca. 250 000 x g) und 4°C in autoklavierten Quick-Seal Polyalomer-Röhrchen (39 ml). Das Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und die Röhrchen vereinigt.

Zur weiteren Aufreinigung wurde ein Iodixanol-Dichtegradient verwendet. Hierfür wurde ein diskontinuierlicher Stufengradient aus Iodixanollösung mit der aufzureinigenden Virussuspension überschichtet und bei 40000 rpm (Beckmann, Type 50.2 Ti T; ca. 250 000 x g) für 12 h abzentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte in autoklavierten Quick-Seal Polyalomer-Röhrchen (39 ml).

15%-, 25%-, 40%-und 60%-iges Iodixanol wurde mit PBS mit 1mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl hergestellt.

Es wurden pro Röhrchen 20 ml der aufzureinigenden Virussuspension 7 ml 15 %-ige, 5 ml 25%-ige, 4 ml 40%-ige und 4 ml 60 %-ige Iodixanol-Lösungen eingesetzt.

Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Schichten wurde der 60%- und der 25%-Phase Phenol-Rot (0,01 µg/ml) zugesetzt. Der 15%-igen Lösung wurde außerdem noch NaCl zu einer Endkonzentration von 1M zugegeben, um die Aggregation der Viruspartikel zu verhindern. Aufgrund ihrer Dichte sammelten sich volle Partikel in der 40%-Phase an, während leere Kapside und Zellreste in der darüberliegenden 25%-Phase zu finden waren. Durch Einstechen ein kleines Stück unterhalb der 40%-Bande konnte die virushaltige Bande steril abgenommen werden. Im letzten Schritt wurde Iodixanol durch Zentrifugations-Diafiltration in Vivaspin 15-Röhrchen (Durchgängigkeit: 100 kDa) entfernt und die Viruskonzentration durch Plaque-Assay ermittelt.

II.2.11.2.2 Reovirus-Aufreinigung

Die Aufreinigung erfolgte durch Abzentrifugation des virushaltigen Lysats für 4 h bei 28.000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) und 4°C in autoklavierten Polyallomer-Opti-Seal-Röhrchen. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS aufgenommen und die Virussuspension von 6 Röhrchen auf insgesamt 10 ml eingestellt. Im letzten Schritt erfolgte die Abzentrifugation des Reovirus über einem 30%-igen Saccharose-Gradienten für 12 h bei 4°C. Das Virus wurde in PBS aufgenommen und die Konzentration mittels Plaque-assay ermittelt.

II.2.11.2.3 Newcastle Disease Virus-Aufreinigung

Je 38,5 ml der virushaltigen Amnionflüssigkeit wurden in autoklavierten Polyallomer-Opti-Seal-Röhrchen für 1 h bei 28 000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) und 4°C abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml PBS gelöst, und jeweils 6 Ansätze vereinigt (30 ml Gesamtvolumen). Die weitere Aufreinigung der Virussuspension erfolgte mittels eines Saccharose-Dichtegradienten. Hierfür wurde ein diskontinuierlicher Stufengradient aus Saccharoselösung mit der aufzureinigenden Virussuspension überschichtet und für 2 h bei 28 000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) abzentrifugiert.

Material/Methoden

Es wurden, auf 2 Röhren verteilt, je 10 ml 20 %-ige, 3,5 ml 40 %-ige sowie 10 ml 60 %-ige Saccharoselösung geschichtet und mit 15 ml der aufzureinigenden Virussuspension bedeckt. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Schichten wurde der 60%-Phase Phenol-Rot (0,01 µg/ml) zugesetzt.

Durch Einstechen ein kleines Stück unterhalb der 40%-Bande (Abbildung 13) konnte die virushaltige Lösung nach Ende der Ultrazentrifugation steril abgenommen werden.

Im letzten Schritt wurde Saccharose durch Zentrifugations-Diafiltration in Vivaspin-15-Röhren (Durchgängigkeit: 100 kDa) entfernt und die Viruskonzentration mittels Titration (EID50) bestimmt.

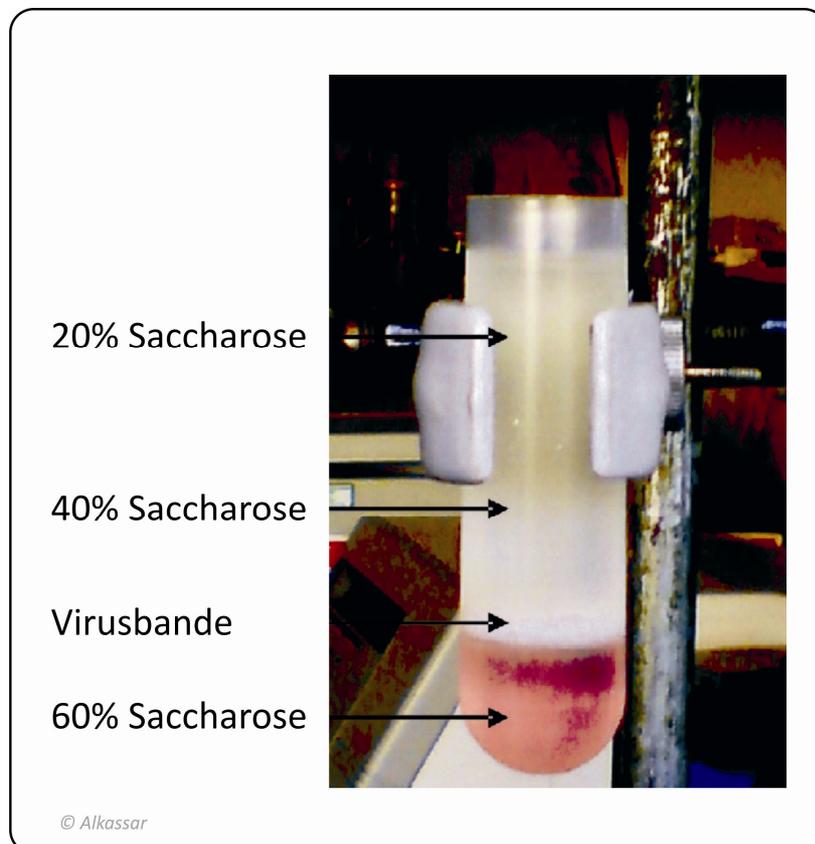


Abbildung 13: NDV-Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation

Aufreinigung der Virussuspension über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Hierfür erfolgte die Unterschichtung der Viruslösung mit Saccharose (20%, 40% und 60%) und Zentrifugation für 2 h bei 28 000 rpm. Die NDV-Bande zeigt sich im Grenzbereich zwischen der 40% und der 60% Bande und kann durch Einstechen abgezogen werden.

II.2.11.3 Virus-Titration

II.2.11.3.1 Plaque-Test

Der Plaque-Test, mit dem der Lysetiter (LT) in plaque forming units (pfu/ml) bestimmt wird, ist die Standard-Titrationsmethode für Wildtyp-Viren. Diese Methode beruht auf der direkten Messung der virusinduzierten Zelllyse.

Voraussetzung für die Durchführung des Tests ist die Fähigkeit der Viren die entsprechenden Zellen zu befallen, sich darin zu vermehren und sich durch Zelllyse freizusetzen. Während der längeren Inkubation der Zellen mit Virus werden infektiöse Nachkommenviren freigesetzt, die wegen eines Agaroseüberzugs nur unmittelbar benachbarte Zellen infizieren können. Dadurch entstehen Löcher im Zellrasen, sogenannte Plaques. Durch Färbung lebender Zellen mit Neutralrot werden diese Bereiche ausgespart, sodass die Löcher sichtbar hervortreten.

Zur Plaquebestimmung der Reoviren wurden jeweils 5×10^5 Vero Zellen/ 6 cm Schale, für die Bestimmung der Parvoviren 5×10^5 NBK Zellen/ 6 cm Schale ausgesät. 24 h später wurden die Zellen jeweils mit verschiedenen Verdünnungsstufen ($1:10^3$ - $1:10^8$, je Verdünnungsstufe 2 Ansätze) der Viren in 1.000 μ l Medium infiziert. Nach 12 h Inkubation wurde das Virusinokulum abgenommen und die Zellen mit einer Agar-Mischung (8 ml, 1,3 %-Agar, in Kompletmedium) überschichtet. Hierfür wurden 4 ml Medium (2x FCS) auf 37°C und 4 ml Medium (ohne FCS) mit 3,4 % Agar auf 65°C erwärmt und kurz vor dem Überschichten gemischt.

Nach dem Erstarren des Agar-Überzugmediums wurden die Zellen 6 Tage bei 37°C inkubiert. Am sechsten Tag erfolgte die erneute Überschichtung der alten Agarschicht mit 3 ml Neutralrot-Färbemedium (22,5 ml 2xPBS, 3 ml Neutralrot-Lösung, beide auf 37°C erwärmt und 22,5 ml 2 %-Agar, auf 65°C temperiert; beide Mischungen erst kurz vor dem Überschichten mischen). Nach weiterer Inkubation bei 37°C über Nacht konnten die Schalen ausgewertet werden. Dazu wurde der Agar-Überzug vorsichtig entfernt und die nicht gefärbten Plaques gezählt. Der Lysetiter errechnete sich wie folgt:

$$\text{LT (pfu/ml)} = 2,5 \times \text{Plaques} \times \text{Verdünnung.}$$

II.2.11.3.2 Hämagglutinationstest

Verschiedene Viren besitzen die Fähigkeit an Erythrozyten zu adsorbieren. Aufgrund der polyvalenten Adsorptionsmöglichkeiten der Viruspartikel kann in einer Erythrozyten-suspension die Vernetzung der roten Blutkörperchen (Hämagglutination) beobachtet werden.

Sowohl NDV als auch Reo- und Parvoviren sind hämagglutinierende Viren. Reoviren sind in der Lage, humane Erythrozyten der Gruppe 0 zu agglutinieren, wobei Parvoviren Hamstererythrozyten und NDV Kükenerythrozyten agglutinieren.

In dieser Arbeit wird die Hämagglutinationsmethode lediglich zur Bestimmung des NDV-Titers verwendet.

Frische Kükenerythrozyten werden zweimal mit PBS gewaschen und in PBS auf eine Gebrauchskonzentration von 1 % (w/v) eingestellt. Der Hämagglutinationstest wird in 96-Loch-Rundbodenplatten in Duplikaten durchgeführt. Von der Virussuspension werden serielle 1:2 Verdünnungen in PBS (100 µl) hergestellt. Zu den einzelnen Verdünnungen wird das gleiche Volumen der 1%igen Kükenerythrozytensuspension in PBS pipettiert. Nach 60 bis 90 min. Inkubation bei Raumtemperatur wird der Virustiter abgelesen. Eine hämagglutinierende Einheit (HU) ist definiert als die geringste Viruskonzentration, bei der die letzte vollständige Agglutination zu erkennen ist.

II.2.11.3.3 EID₅₀-Test

Bei der Ei-infektiösen Dosis (EID₅₀) handelt es sich um eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von infektiösem NDV. Durch EID₅₀ kann die Anzahl infektiöser Einheiten pro Volumen (hier in ml) eingesetzter Virussuspension bestimmt werden.

EID₅₀ ist diejenige Titrationsstufe an Virus, die bei 50% der infizierten embryonierten Hühnereier noch eine Infektion verursachen kann. Die Auswertung wurde nach der Methode von REED und Muench durchgeführt⁷⁵. Dazu wurde mit PBS eine Verdünnungsreihe (10⁷-10¹¹) der zu untersuchenden Viruslösung erstellt, diese in 9-11 Tage alte embryonierte SPF Eier inokuliert (100 µl/Ei) und untersucht, bei welcher Verdünnung noch bei 50% der Eier eine Infektion vorlag. Die Inokulation von NDV erfolgte dabei in die Allantoishöhle (Abbildung 1). Es wurden drei SPF Eier pro Verdünnungsstufe inokuliert und die Infektion der

Amnionflüssigkeit 3 Tage nach Infektion über eine HA-Testung (Siehe Abschnitt X) bestimmt.

Die Berechnung der EID₅₀ erfolgte nach folgender Formel:

Formel 5: Bestimmung des EID nach Reed und Muench

$$\Pi = \frac{(\% V_{<50}) - (50\%)}{(\% V_{<50}) - (\% V_{>50})}$$

%V_{<50} infizierte Eier in der zum 50% Wert niedrigeren Verdünnungsstufe

%V_{>50} infizierte Eier in der zum 50% Wert höheren Verdünnungsstufe

Der sich aus dieser Formel ergebende Faktor Π wird zu der Potenz der niedrigeren Verdünnungen addiert und ergibt die minimale Verdünnungsstufe, mit genau einer infektiösen Einheit in 100 μ l untersuchter Virussuspension. Da EID₅₀ in ml angegeben wird, muss die Potenz des Verdünnungsfaktors (EID₅₀/ml) um 1 erhöht werden.

II.2.12 Auswertung

II.2.12.1 Signifikanztestung

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurde mit Hilfe des Rangsummentests von Kruksal-Wallis überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ gesetzt. Zur Berechnung wurde die Software SPSS verwendet.

II.2.12.2 Kombinationsindex (CI) zur Überprüfung eines synergistischen Effektes

Schon seit einigen Jahren beschäftigt man sich intensiv mit der Fragestellung des adäquaten Nachweises eines synergistischen Effektes von zwei Therapien. Der verstärkte Effekt einer Kombinationstherapie im Vergleich zu einer Monotherapie muss nicht zwangsläufig die Folge eines Synergismus sein, es kann sich genauso gut um einen additiven Effekt handeln. Die mathematische Erfassung eines synergistischen Effektes bereitet deshalb Probleme, weil verschiedene physikochemische Eigenschaften oft keinen linearen Verlauf zeigen. Um dennoch eine verlässliche Überprüfung der Wirkweise von zwei Medikamenten durchführen zu können, erfolgte 1983 durch ¹³⁷ die Einführung eines Algorithmus, der durch Vereinigung

der vier biomedizinischen Grundgleichungen Henderson-Hasselbach, Michaelis-Menten, Hill und Scatchard zustande kommt.

Hierbei handelt es sich um den sogenannten Kombinationsindex (CI). Die Herleitung kann aus der Medianeffektgleichung durchgeführt werden.

Die Medianeffektgleichung beschreibt die Erfolgsquote des Medikamentes abhängig von einer bestimmten Konzentration. In unseren Versuchen ist die Erfolgsquote der Anteil abgestorbener Tumorzellen nach Behandlung mit Virus. Die Gleichung ist wie folgt:

Gleichung 1

$$\frac{fa}{fu} = (D/D_m)^m$$

Fa= Anteil abgestorbener Tumorzellen bei Dosis D; Fu= Anteil überlebender Zellen.

Dm = Mitteleffektdosis, d.h. die Dosis bei der 50% der Zellen abgestorben sind.

m = Koeffizient, Beschreibung der Form der Dosiswirkungskurve, für m=1, hyperbolisch, für >1 einen Sigmoid und für <1 einen Flachsigmoiden.

Da $Fu=1-Fa$ kann die Gleichung auch wie folgt umgeschrieben werden:

Gleichung 2

$$D = D_m \times (fa/1 - fa)^{1/m}$$

Bei bekannter mittlerer Dosis D_m , dem Koeffizienten m und dem Anteil abgestorbener Zellen kann rückwirkend die eingesetzte Dosis D berechnet werden.

Erweitert man die Medianeffektgleichung auf eine Kombination von zwei Viren ergibt sich folgende Gleichung:

Gleichung 3

$$\left(\frac{(fa)_{1,2}}{(fu)_{1,2}} \right)^{1/m} = \left(\frac{(fa)_1}{(fu)_1} \right)^{1/m} + \left(\frac{(fa)_2}{(fu)_2} \right)^{1/m} = \frac{D1}{(Dm)_1} + \frac{D2}{(Dm)_2}$$

Setzt man nun Gleichung 1 in Gleichung 3 ein erhält man die Gleichung zur Berechnung des Kombinationsindex:

Gleichung 4

$$CI = \frac{D1}{(Dx)_1} + \frac{D2}{(Dx)_2} = \frac{D1}{(Dm)_1 \times (fa/1-fa)^{1/m1}} + \frac{D2}{(Dm)_2 \times (fa/1-fa)^{1/m2}}$$

Hierbei beschreibt $(Dx)_1$ und $(Dx)_2$ die Dosis an Virus 1 bzw. die Dosis an Virus 2 die diese anteilmäßig alleine hemmen würden.

Ein Kombinationsindex von 1 zeigt einen additiven Effekt an, ein $CI < 1$ deutet auf einen synergistischen Effekt hin wobei ein $CI > 1$ auf einen antagonistischen Effekt hinweist.

Die Berechnung der CI-Werte erfolgte mit dem Programm CalcuSyn, Version 2 (Biosoft).

III Ergebnisse

III.1 Auswirkungen einer Kombination onkolytischer Viren in vitro

Im ersten Schritt galt es zu prüfen, welche Auswirkungen eine Kombination onkolytischer Viren auf Glioblastomzellen besitzt. Hierfür wurden die beiden etablierten Glioblastomzelllinien U87-MG und U373 mit einem Virus alleine und mit einer Kombination aus zwei Viren infiziert und die Effekte einer Monotherapie mit denen einer kombinierten Therapie verglichen.

Um den Einfluss einer Kombination von onkolytischen Viren auf Glioblastomzellen beurteilen zu können, mussten folgende Fragen beantwortet werden:

- a. Bewirkt die Kombination zweier onkolytischer Viren eine Änderung im Absterbeverhalten infizierter Glioblastomzellen?
- b. Wie verändert die Kombination onkolytischer Viren die Verteilung infizierter Zellen?
- c. Wie beeinflusst die Kombination zweier onkolytischer Viren die Replikationskinetik dieser Viren?

III.1.1 Absterbekinetik nach Kombination onkolytischer Viren

Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, ist bei den drei onkolytischen Viren Reo-, Parvo- und NDV die Stärke der Absterbekinetik von der initial eingesetzten Viruskonzentration abhängig^{138 139 140}. Deshalb wurden die entsprechenden Zellen jeweils mit einem Virus alleine und mit einer Kombination aus zwei Viren in aufsteigender Konzentration (0,005-5 PFU/Zellen) infiziert und das Absterben der Zellen nach 72 h beurteilt. Die Konzentrationen der beiden Viren bei Einsatz in Kombination waren identisch. Die Beurteilung des Zellsterbens erfolgte zum Einen quantitativ mittels MTT-Assay, andererseits wurden auch morphologische Veränderungen der infizierten Zellen untersucht.

Wie man in Abbildung 14 und Abbildung 15 sehen kann, bewirkte bei beiden Zelllinien die Infektion mit Reo-, Parvo- oder ND-Virus jeweils ein deutliches Zellsterben. Die Stärke der Tumoronkolyse war bei allen Viren abhängig von der initial eingesetzten Viruskonzentration (Abbildung 16, Abbildung 17). Allerdings unterschied sich die Onkolysestärke nach Infektion mit Reovirus und Parvovirus in den beiden Zelllinien deutlich voneinander (Abbildung 18). Im

Ergebnisse

Vergleich erkennt man, dass Reovirus bei der Zelllinie U87 onkolytisch wirksamer ist als bei der Zelllinie U373. Dies wird v.a. in höheren Konzentrationen deutlich. Ab einer Konzentration von $MOI = 0,05$ PFU/Zelle kann ein Unterschied in der Onkolysestärke zwischen beiden Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 18). Dies lässt sich durch eine Signifikanztestung bestätigen (Tabelle 6).

NDV hingegen zeigt bei beiden eingesetzten Zelllinien jeweils eine ähnliche Onkolysestärke (Abbildung 18). Hier kann in keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien eruiert werden (Tabelle 6).

Ähnlich wie Reovirus verursacht auch Parvovirus in der Zelllinie U87 einen größeren Zelluntergang als in der Zelllinie U373 (Abbildung 16, Abbildung 17). Ein signifikant stärkeres Zellsterben in U87-Zellen lässt sich ab einer Konzentration von $MOI > 0,05$ messen (Tabelle 6).

Bei beiden Zelllinien konnte eine deutliche Steigerung der onkolytischen Wirksamkeit durch Kombination von Reovirus plus NDV beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 17) Im direkten Vergleich mit den Kombinationen Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus zeigte sich diese Kombination in ihrer onkolytischen Aktivität am effektivsten. Derselbe onkolytischen Effekt konnte durch einen Bruchteil der Infektionsdosis erreicht werden, wenn Reovirus und NDV nicht alleine sondern kombiniert eingesetzt wurden. Wie aus Abbildung 16 und Abbildung 17 hervorgeht, ist das Überleben der Glioblastomzellen U87 und U373, die mit Reovirus plus NDV der Konzentration von jeweils 0,5 PFU/Zelle infiziert wurden schlechter als das von entsprechenden Zellen, die nur mit einem der beiden Viren der 10-fach höheren Konzentration (5 PFU/Zelle) infiziert wurden. Im Vergleich zeigten U87-Zellen eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber der Kombination Reovirus plus NDV als U373-Zellen (Abbildung 19). Eine Signifikanz ließ sich hierbei in allen Konzentrationen zeigen (Tabelle 6). Wie nicht anders zu erwarten, war das Zellsterben in allen untersuchten Konzentrationen nach kombinierter Infektion signifikant höher als nach Monoinfektion (Tabelle 7). Allerdings erlaubt eine einfache Signifikanztestung keine Aussage über die Kinetik des Zusammenwirkens beider Viren. Um festzustellen, ob hier ein synergistischer oder additiver Effekt vorliegt, erfolgte deshalb die Testung der kombinierten Wirksamkeit unter Verwendung einer Kombinationsindex (CI)-Analyse nach Chou und Talalay¹³⁷. Hierfür wurden für verschiedene Konzentrationen die CI's berechnet und in einer Übersichtstabelle

Ergebnisse

aufgetragen. Wie in (Tabelle 8) zu sehen, ließ sich für die Kombination Reovirus plus NDV ab einer Konzentration von 0,05 PFU/Zelle ein starker synergistischer Effekt beweisen. Beide Zelllinien verhielten sich hierbei ähnlich.

Ebenfalls eine Steigerung des Zellsterbens konnte nach kombinierter Gabe von Reovirus plus Parvovirus gemessen werden (Abbildung 16). Wenn auch die Steigerung der Onkolyse hier im Vergleich mit der Kombination Reovirus plus NDV etwas schwächer ausgefallen ist, so zeigt sich dennoch ein signifikanter Unterschied zwischen monoviral und kombiniert behandelten Tumorzellen (Tabelle 9). Dies gilt für beide untersuchte Zelllinien. Anders als bei der Kombination Reovirus plus NDV lässt sich hier erst ab einer Konzentration von 0,5 PFU/Zelle ein eindeutiger Synergismus feststellen (Abbildung 16). Beim Vergleich der CI-Werte beider untersuchter Zelllinien erkennt man bei U373 einen stärkeren synergistischen Effekt für die Kombinationsbehandlung mit Reovirus plus Parvovirus als bei U87 (Tabelle 8). Trotzdem ist der absolute Anteil abgestorbener Zellen bei der Zelllinie U87 signifikant höher als bei U373 (Abbildung 19; Tabelle 6).

Verglichen mit der Infektion von Glioblastomzellen mit NDV oder Parvovirus in Monotherapie führte die Kombination beider Viren erstaunlicherweise zu einer Verschlechterung der Absterbekinetik (Abbildung 16, Abbildung 17, Tabelle 10). Hierin unterschieden sich die beiden untersuchten Zelllinien nicht voneinander (Abbildung 19) (Tabelle 6). Im Gegensatz zu den Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus bewirkte die Kombination Parvovirus plus NDV eine Inhibierung der onkolytischen Aktivität. Zur Bestätigung erfolgte auch hier die Durchführung einer CI-Analyse (Tabelle 8).

Ergebnisse

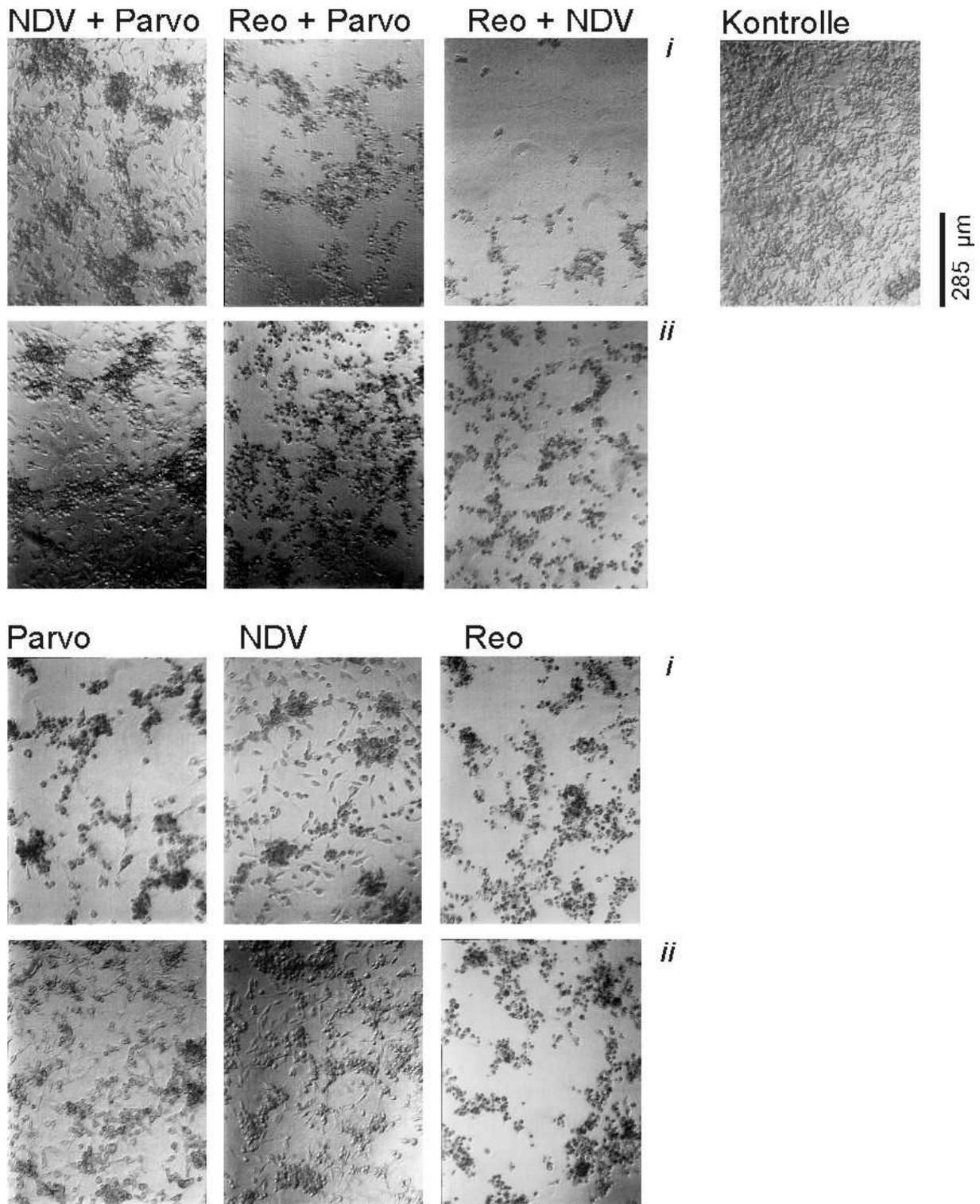


Abbildung 14: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U87-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus.

Eine Monolayer-Zellschicht wurde mit Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und in Kombination von jeweils zwei Viren inkubiert und nach 72 h die Morphologie beurteilt. Jedes Virus wurde in einer Konzentration von $MOI = 0,5$ PFU/Zelle (ii) und $MOI = 5$ PFU/Zelle (i) verabreicht. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

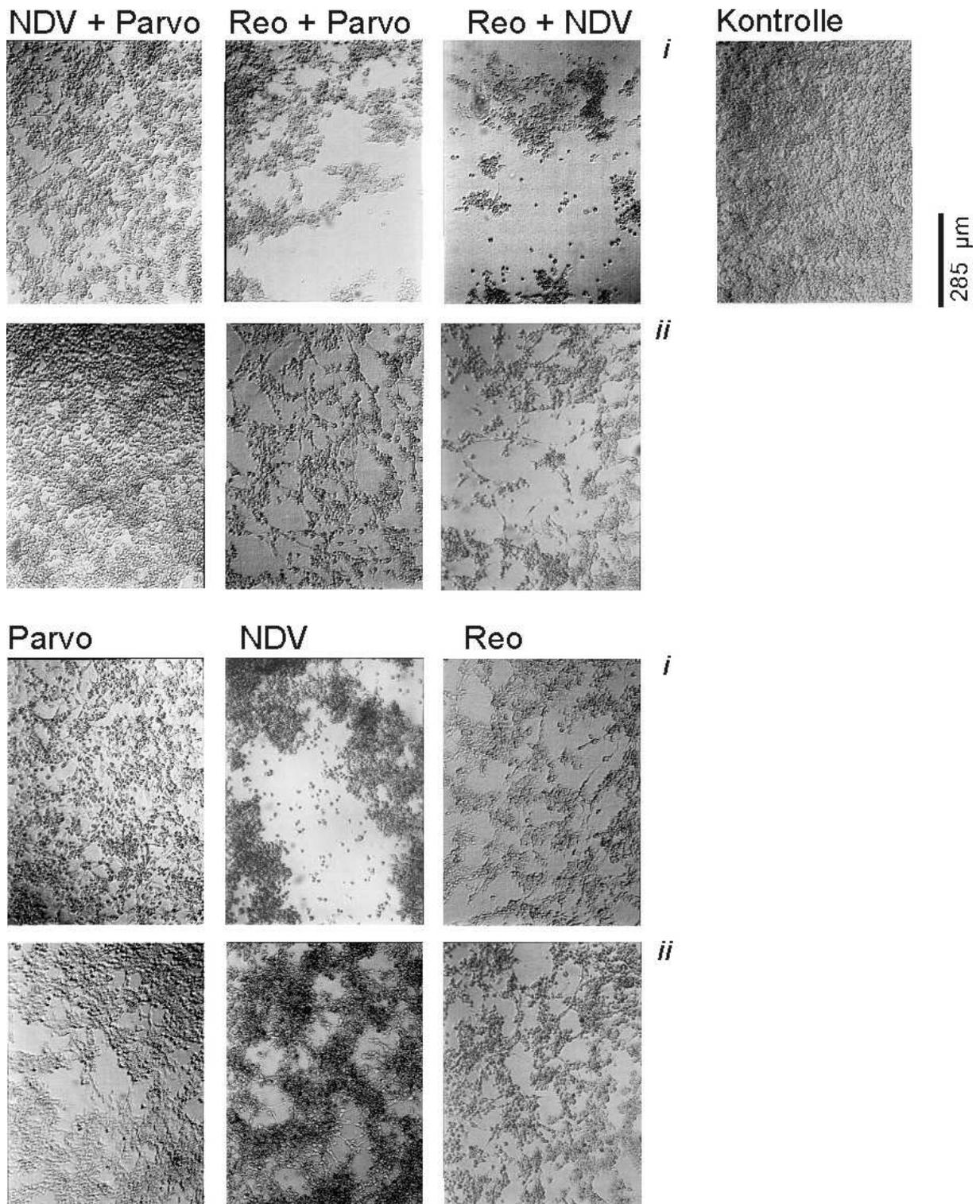


Abbildung 15: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U373-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus.

Eine Monolayer-Zellschicht wurde mit Reovirus, NDV und Parvovirus alleine und in Kombination von jeweils zwei Viren inkubiert und nach 72 h die Morphologie beurteilt. Jedes Virus wurde in einer Konzentration von MOI = 0,5 PFU/Zelle (ii) und MOI = 5 PFU/Zelle (i) verabreicht. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Tabelle 6 Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 bei verschiedenen Konzentrationen
(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| | MOI (PFU/Zelle) | | | | | |
|-----------------|-----------------|------|------|------|-------|--------|
| MOI (PFU/Zelle) | 5 | 2,5 | 0,5 | 0,05 | 0,005 | 0,0005 |
| NDV | ,059 | ,142 | ,295 | ,009 | ,053 | ,064 |
| Reo | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,248 | ,530 |
| Parvo | ,009 | ,009 | ,009 | ,673 | ,344 | ,142 |
| Reo+NDV | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,016 |
| Reo+Parvo | ,009 | ,009 | ,016 | ,009 | ,036 | ,054 |
| NDV+Parvo | ,028 | ,402 | ,402 | ,122 | ,172 | ,347 |

Tabelle 7 Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus NDV und einer Infektion mit Reovirus oder NDV alleine.
(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| | | Reo + NDV | | | | | |
|-----------------|------|-----------|------|------|------|-------|--------|
| MOI (PFU/Zelle) | | 5 | 2,5 | 0,5 | 0,05 | 0,005 | 0,0005 |
| NDV | U87 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,344 |
| | U373 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,021 |
| Reo | U87 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,115 | ,599 |
| | U373 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,016 |

Tabelle 8 Kombinationsindex (CI) – Analyse für Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1.
(CI < 0,3 → ausgeprägter Synergismus, CI = 1 → additiver Effekt, CI > 30 → antagonistischer Effekt)

| | Reo+NDV | | Reo+Parvo | | Parvo+NDV | |
|-----------------|---------|-------|-----------|-------|-----------|--------|
| MOI (PFU/Zelle) | U87 | U373 | U87 | U373 | U87 | U373 |
| 0,0005 | 0,49 | 0,112 | 0,83 | 0,037 | 1,2 | 7,193 |
| 0,05 | 0,07 | 0,045 | 0,27 | 0,060 | 5,4 | 10,443 |
| 5 | 0,06 | 0,013 | 0,23 | 0,051 | 6,54 | 12,668 |

Ergebnisse

Tabelle 9 Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit Reovirus plus Parvovirus und einer Infektion mit Reovirus oder Parvovirus alleine.
(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| MOI (PFU/Zelle) | | Reo + Parvo | | | | | |
|--------------------|------|-------------|------|------|------|-------|--------|
| | | 5 | 2,5 | 0,5 | 0,05 | 0,005 | 0,0005 |
| Reo | U87 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,599 | 1,000 |
| | U373 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,059 | ,021 |
| Parvo | U87 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,142 | ,462 |
| | U373 | ,009 | ,009 | ,009 | ,009 | ,028 | ,117 |

Tabelle 10 Signifikanztestung der Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen einer kombinierten Infektion mit NDV plus Parvovirus und einer Infektion mit NDV oder Parvovirus alleine.
(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| MOI (PFU/Zelle) | | NDV + Parvo | | | | | |
|--------------------|------|-------------|------|------|------|-------|--------|
| | | 5 | 2,5 | 0,5 | 0,05 | 0,005 | 0,0005 |
| NDV | U87 | ,346 | ,028 | ,009 | ,402 | 1,000 | ,675 |
| | U373 | ,009 | ,016 | ,009 | ,009 | ,117 | ,142 |
| Parvo | U87 | ,009 | ,009 | ,009 | ,036 | ,462 | 1,000 |
| | U373 | ,012 | ,028 | ,753 | ,142 | 1,000 | ,402 |

Ergebnisse

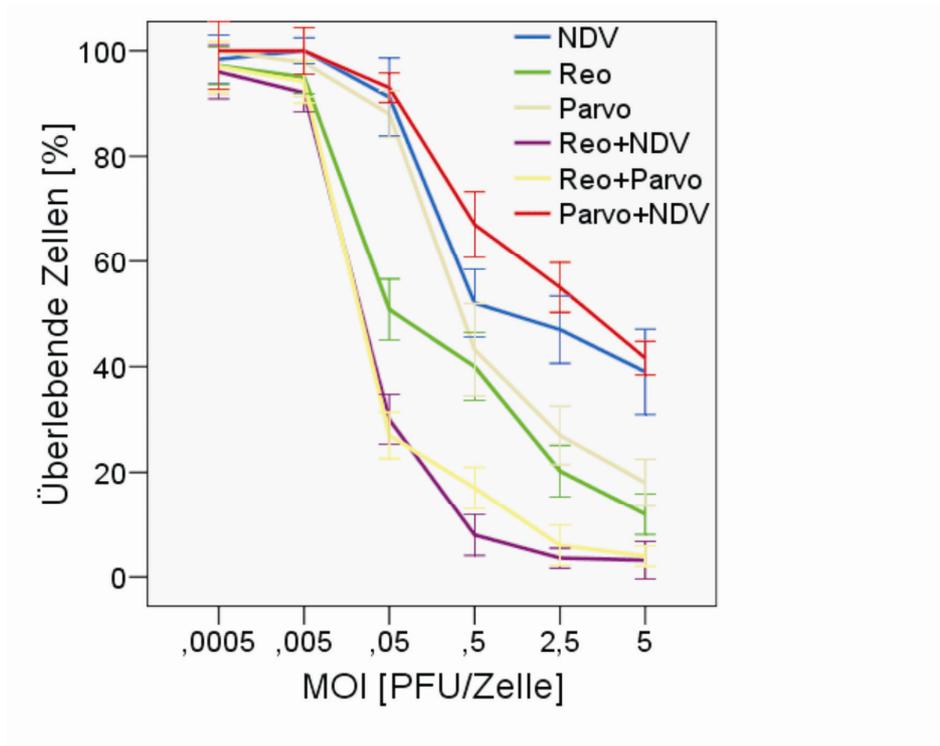


Abbildung 16: Vergleich des Anteils überlebender U87-Zellen 72 h nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus, Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit den Viren inkubiert und nach 72 h der Anteil überlebender Zellen ausgehend von unbehandelten Kontrollzellen mittels MTT-Assay gemessen. Jedes Virus wurde in verschiedenen Konzentration (0,0005-0,5, 2,5 und 5 PFU/Zelle) verabreicht.

Ergebnisse

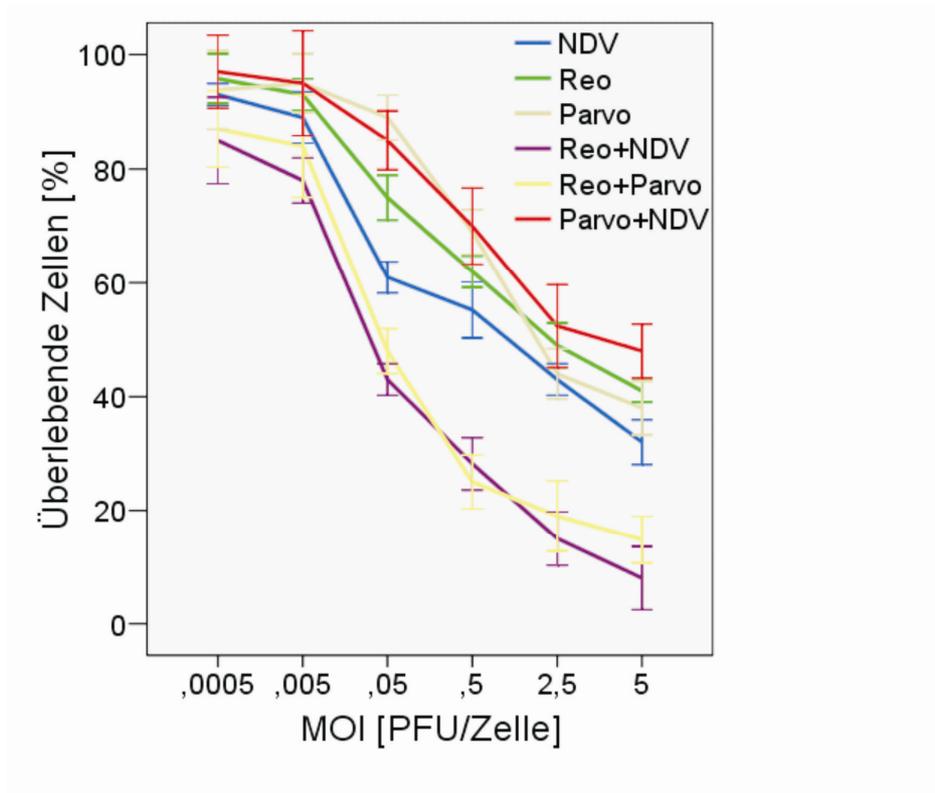


Abbildung 17: Vergleich des Anteils überlebender U373-Zellen 72 h nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus, Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit den Viren inkubiert und nach 72 h der Anteil überlebender Zellen ausgehend von unbehandelten Kontrollzellen mittels MTT-Assay gemessen. Jedes Virus wurde in verschiedenen Konzentration (0,0005-0,5, 2,5 und 5 PFU/Zelle) verabreicht.

Ergebnisse

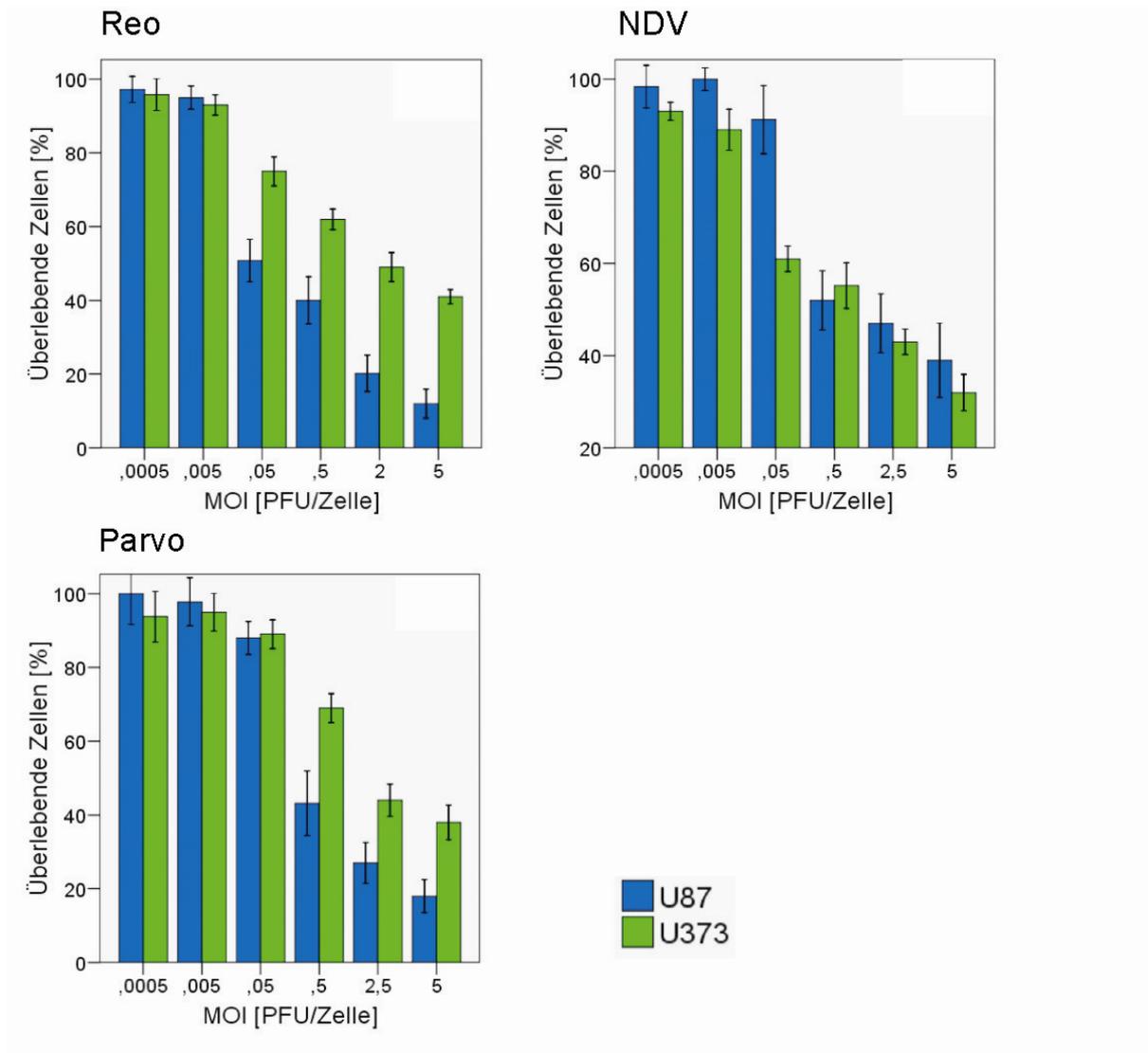


Abbildung 18 Unterschiede im Zellsterben zwischen den Zelllinien U87 und U373 nach Infektion mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit den Viren inkubiert und nach 72 h der Anteil überlebender Zellen ausgehend von Kontrollzellen mittels MTT-Assay gemessen. Jedes Virus wurde in Konzentration von MOI = 0,0005-0,5, 2,5 und 5 PFU/Zelle verabreicht. Für jede Konzentration erfolgte die vergleichende Darstellung einem Histogramm. Fehlerbalken zeigt mittleren Fehler des Mittelwerts an.

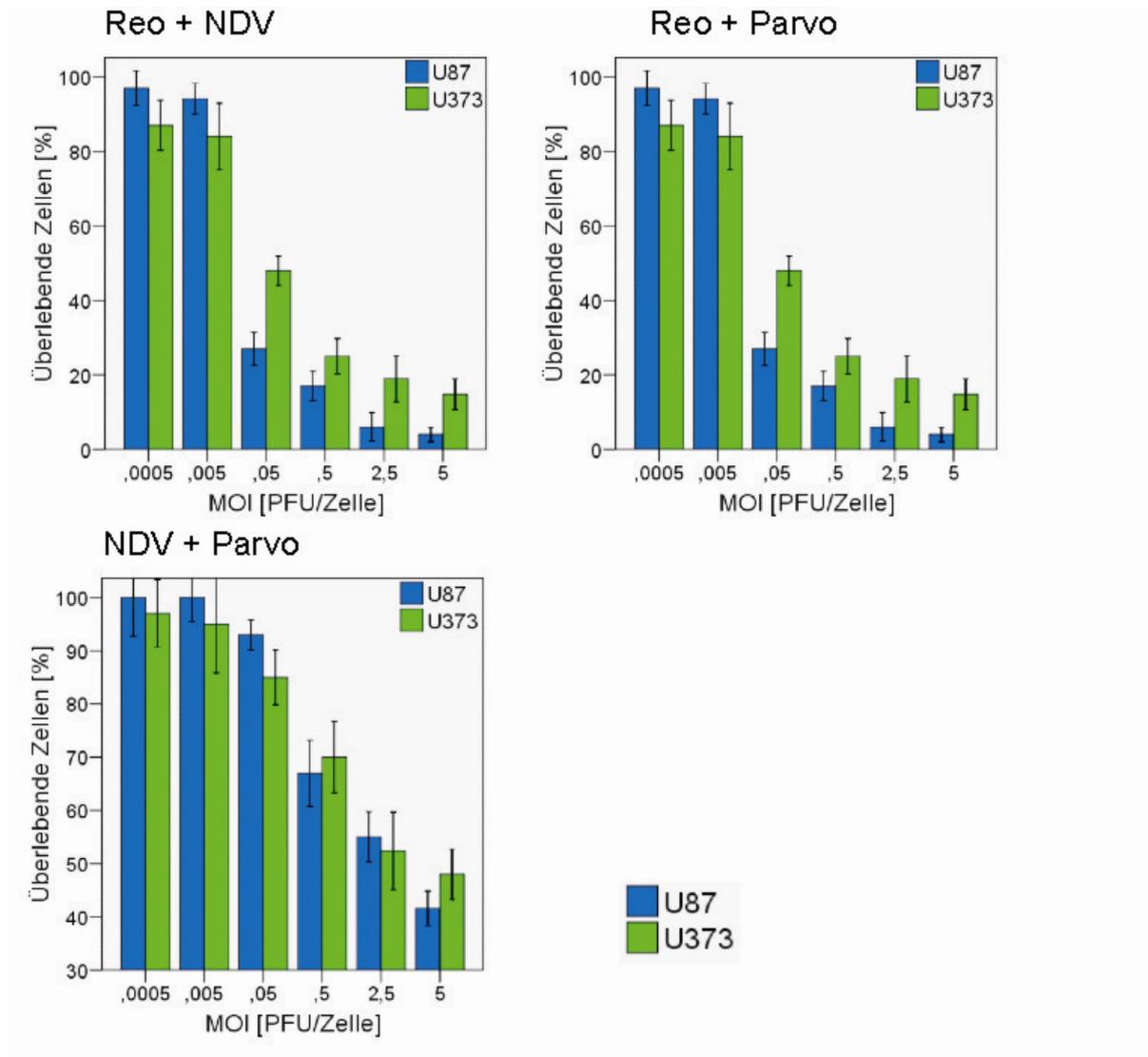


Abbildung 19 Unterschiede im Zellsterben zwischen den Zelllinien U87 und U373 nach Infektion mit Reovirus plus Newcastle Disease Virus (NDV), Reovirus plus Parvovirus-H1 und Newcastle Disease Virus (NDV) plus Parvovirus-H1.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit den Viren inkubiert und nach 72 h der Anteil überlebender Zellen mittels MTT-Assay gemessen (relativer Anteil gemessen an nicht behandelten Zellen). Jedes Virus wurde in Konzentration von MOI = 0,0005-0,5, 2,5 und 5 PFU/Zelle verabreicht. Für jede Konzentration erfolgte die vergleichende Darstellung einem Histogramm. Fehlerbalken zeigt mittleren Fehler des Mittelwerts an.

III.1.1.1 Veränderung der Zellmorphologie nach Infektion mit Reovirus, Parvovirus monoviral und in dualer Kombination

Zur Darstellung der morphologischen Veränderungen erfolgte die mikroskopische Untersuchung von U373- bzw. U87-Zellen 48 h nach Infektion mit einem Virus alleine und mit einer Kombination aus zwei Viren. Wie in Abbildung 20 und Abbildung 21 zu erkennen

Ergebnisse

ist, konnte bei allen infizierten Zellen ein zytopathischer Effekt beobachtet werden. Alle infizierten Zellen reagierten durch ein Abrunden mit Ausbildung intrazellulärer Vakuolen. Zusätzlich ließen sich bei Reovirus-infizierten Zellen „inclusion bodies“ nachweisen, Parvovirus bewirkte ein starkes Anschwellen des Zellkerns. In der Kombination Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus konnte eine additive zytopathische Wirkung beobachtet werden. In den Zellen, die mit NDV plus Parvovirus infiziert worden sind, entsprach der zytopathische Effekt den Zellen die lediglich mit NDV alleine infiziert worden waren; die Ausprägung des Zelluntergangs war hierbei jedoch schwächer als bei monoinfizierten Vergleichszellen derselben Konzentration. Es konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien U373 und U87 festgestellt werden.

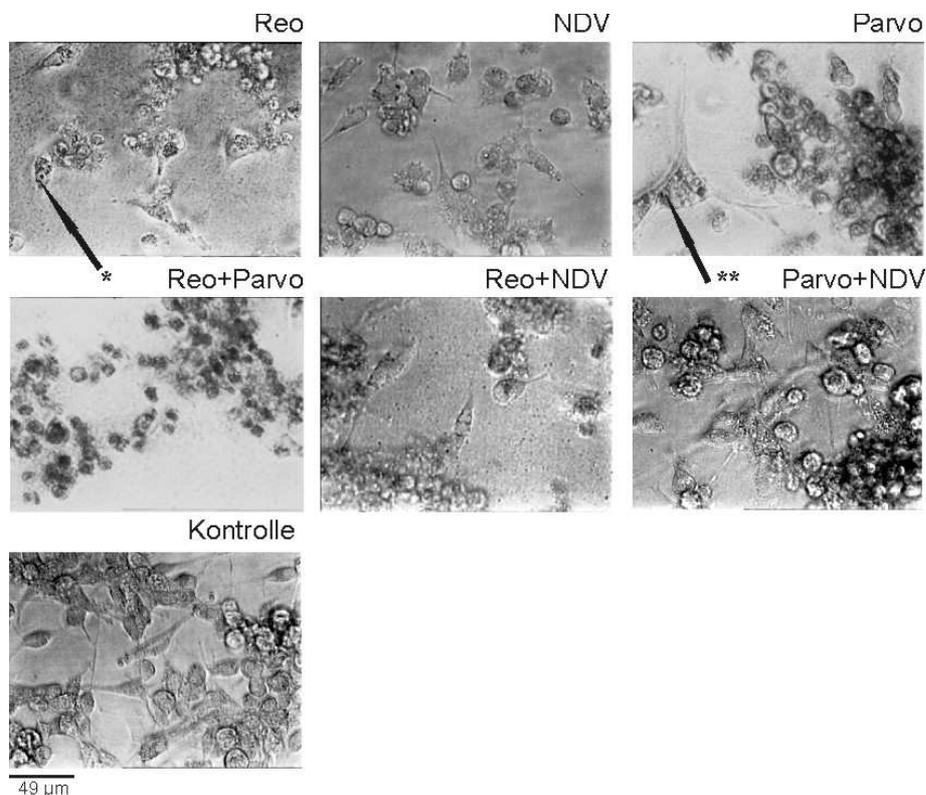


Abbildung 20: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U87-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und in Kombination von jeweils zwei Viren inkubiert und nach 72 h die Morphologie beurteilt. Die Viren wurden jeweils in einer Konzentration von MOI = 5 PFU/Zelle verabreicht. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung. Sämtliche Zellen zeigen eine Reaktion mit Abrunden und Zellklumpen.. Daneben waren in Reoviren „inclusion bodies“ () sichtbar, Parvoviren zeigten eine ausgeprägte Kernschwellung (**).*

Ergebnisse

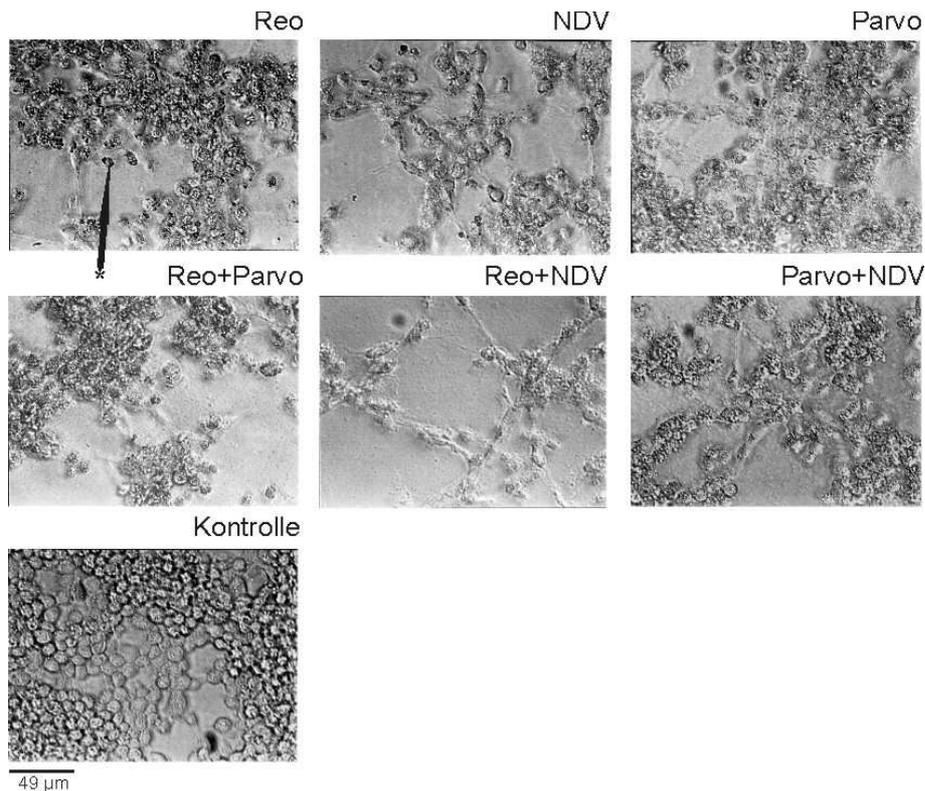


Abbildung 21: Zytopathischer Effekt nach kombinierter Infektion von U373-Zellen mit Parvovirus-H1, Newcastle Disease Virus (NDV) und Reovirus.

Eine Monolayer Zellschicht wurde mit Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und in Kombination von jeweils zwei Viren inkubiert und nach 72 h die Morphologie beurteilt. Die Viren wurden jeweils in einer Konzentration von MOI = 5 PFU/Zelle verabreicht. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 400-facher Vergrößerung. Sämtliche Zellen zeigen eine Reaktion mit Abrunden und Zellklumpen. Daneben waren in Reoviren „inclusion bodys“ () sichtbar.*

III.1.2 Beeinflussung des Infektionsmusters nach Kombination onkolytischer Viren:

Im letzten Abschnitt konnten wir zeigen, dass sich durch die Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus, die onkolytische Wirksamkeit synergistisch steigern lässt. Die in diesem und im nächsten Abschnitt beschriebene Arbeit dient der Untersuchung der Mechanismen die zur Steigerung der onkolytischen Wirksamkeit der Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus führen. Die erste wichtige Frage, die es dabei zu beantworten gilt, ist, inwieweit eine Infektion mit zwei Viren das Infektionsmuster jedes Einzelnen der beiden Viren verändert. Des Weiteren gilt es zu klären, ob die verschiedenen Viren unterschiedliche Zellpopulationen infizieren oder eine Doppelinfektion in einer Zelle möglich ist. Ausführliche Untersuchungen zum Verhalten verschiedener Virusarten nach Infektion einer Zelle sind bisher noch ausstehend, sodass zur Aufklärung

Ergebnisse

eines möglichen Synergismus zunächst eine Beschreibung des Infektionsmusters für jede Viruskombination nötig ist.

Hierfür wurde die Virusreplikation in den Zelllinien U87 und U373 48 Stunden nach Infektion mit einem Virus alleine und nach Infektion mit den Virenkombinationen Reovirus plus NDV, Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus immunhistologisch und durchflusszytometrisch untersucht. Die Infektionsdosis betrug für jedes Virus MOI = 5 PFU/Zelle.

III.1.2.1 Immunhistologische Analyse nach Infektion mit Reovirus, Parvovirus monoviral und in dualer Kombination

Es wurde festgestellt, dass die monovirale Behandlung mit Reo-, Parvo- und ND-Virus zu einer ausgeprägten intrazellulären Virusreplikation führte (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 25, und Abbildung 24). In Zellen, die mit Reovirus infiziert wurden, erkennt man größere Ansammlungen von Virusproteinen im Zytoplasma, v.a. im perinukleären Bereich (Abbildung 25). Diese Ausbildungen zytoplasmatischer Ansammlungen sind spezifisch für Reoviren vom Typ III und werden wegen der Anhäufung von Virusprotein in für sie spezifischen intrazellulären Räumen auch „inclusion bodies“ oder „viral factories“ genannt. NDV-Proteine hingegen zeigen eine diffus gesprenkelte Verteilung über das gesamte Zytoplasma infizierter Zellen. Eine Anreicherung findet sich hierbei perinukleär v.a. im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

Im Gegensatz zu den beiden RNA-Viren Reovirus und NDV erfolgt die Replikation beim Parvovirus, welches ein DNA-Virus ist, im Zellkern. Wie man in Abbildung 25 erkennen kann, führt eine Infektion mit Parvovirus zu einem deutlichen Anschwellen des Zellkerns. Die Zellkerne der beiden infizierten Zellen haben ein 3-4-fach größeres Volumen als die Zellkerne der nicht infizierten Zellen. Ein Nachweis virusspezifischer Proteine ist im gesamten Zellkern, ausgenommen der DNA-reichen Regionen (DAPI-Färbung), möglich. In den Übersichtsaufnahmen bei geringerer Vergrößerung lässt sich für alle mit Reovirus- oder NDV-behandelten Zellen eine Virusreplikation nachweisen (Abbildung 22, Abbildung 24). Die Behandlung mit Parvoviren derselben Konzentration führt nur in ca. 75-90 % der Zellen zu einer intranukleären Virusreplikation nach 48 Stunden (Abbildung 23). Ein Unterschied im Replikationsverhalten von Reovirus oder NDV zwischen den beiden untersuchten Zelllinien

Ergebnisse

war nicht ersichtlich. Allerdings führte eine Behandlung mit Parvovirus zu einem höheren Anteil infizierter Zellen in U87 als in U373.

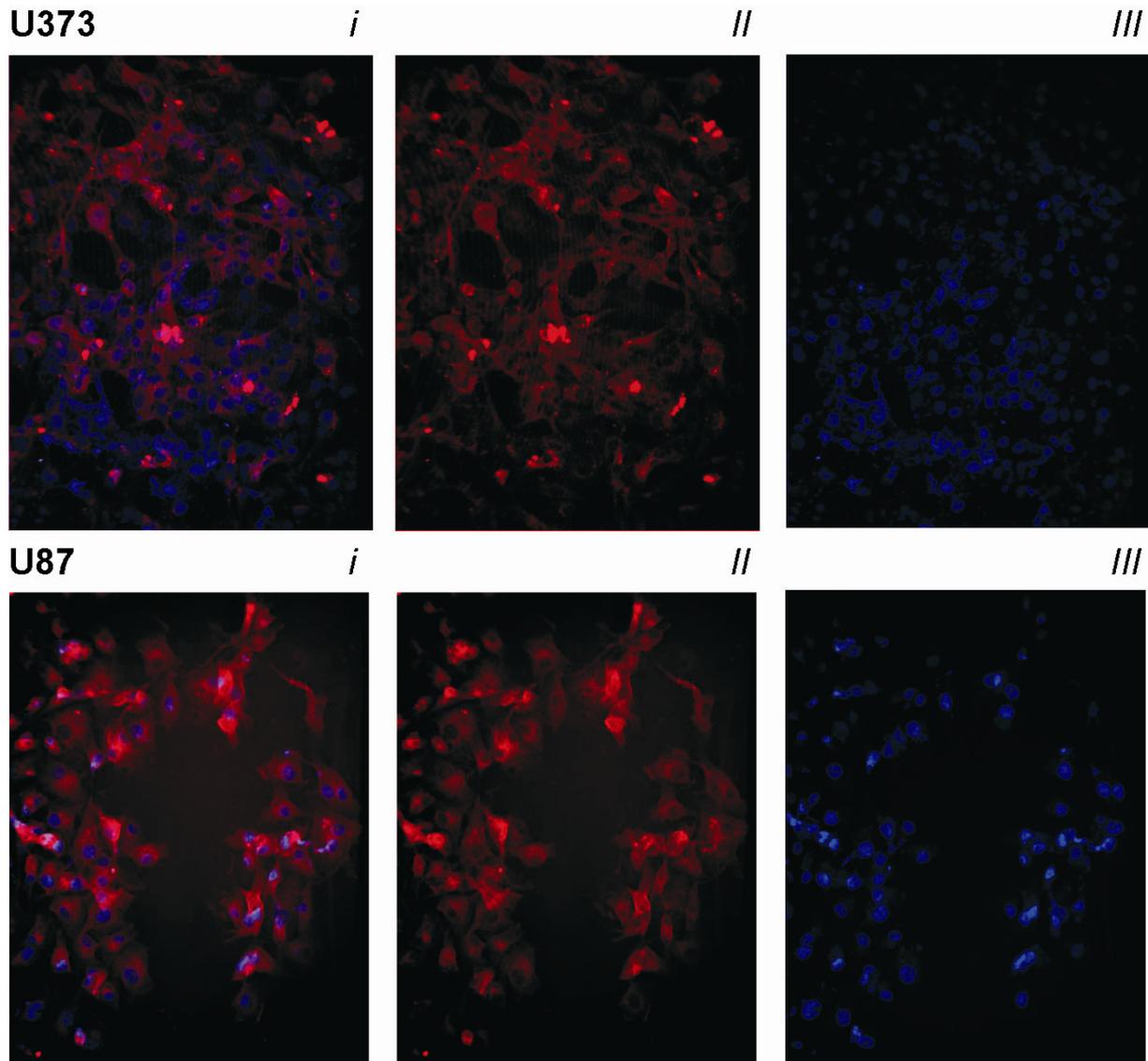


Abbildung 22: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV

48 h nach Infektion von U87- bzw. U373-Zellen mit einer Konzentration von jeweils 5 PFUs/Zelle erfolgte die Fixierung und Fluoreszenzanalyse.

Rot dargestellt sind die TRITC-markierten NDV-Antigenstrukturen (ii), DAPI diente zur Kerndarstellung, blau (iii). Merge (i). Vergrößerung 1:100.

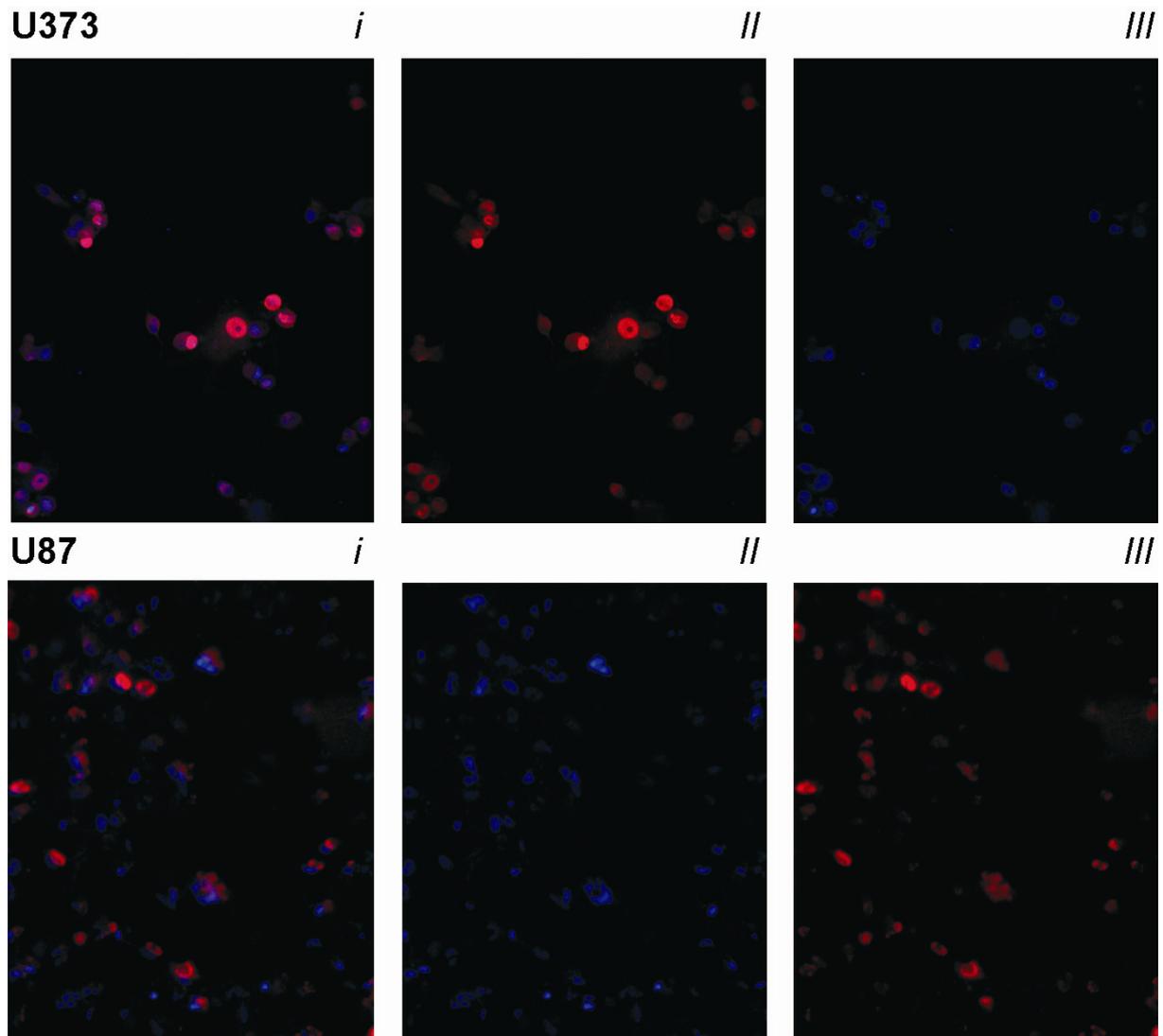


Abbildung 23: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Parvovirus

48 h nach Infektion von U87- bzw. U373-Zellen mit einer Konzentration von jeweils 5 PFUs/Zelle erfolgte die Fixierung und Fluoreszenzanalyse.

Rot dargestellt sind die TRITC-markierten Parvovirus-Antigenstrukturen (ii), DAPI diente zur Kerndarstellung, blau (iii). Merge (i). Vergrößerung 1:100.

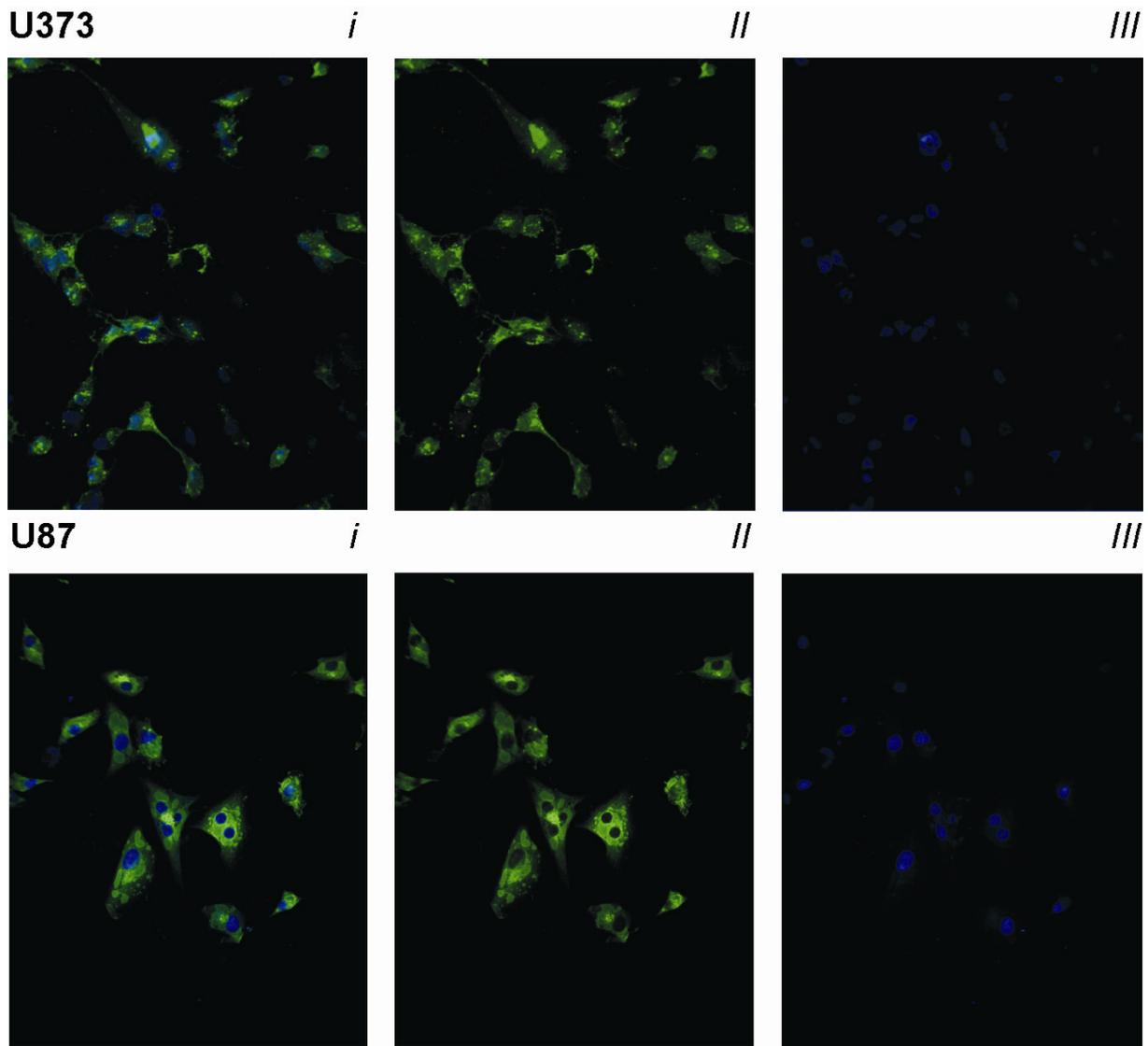


Abbildung 24: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus.

48 h nach Infektion von U87- bzw. U373-Zellen mit einer Konzentration von jeweils 5 PFUs/Zelle erfolgte die Fixierung und Fluoreszenzanalyse.

Grün dargestellt sind die Fitc-markierten NDV- Antigenstrukturen (ii), DAPI diente zur Kerndarstellung, blau(iii). Merge (i). Vergrößerung 1:100.

Ergebnisse

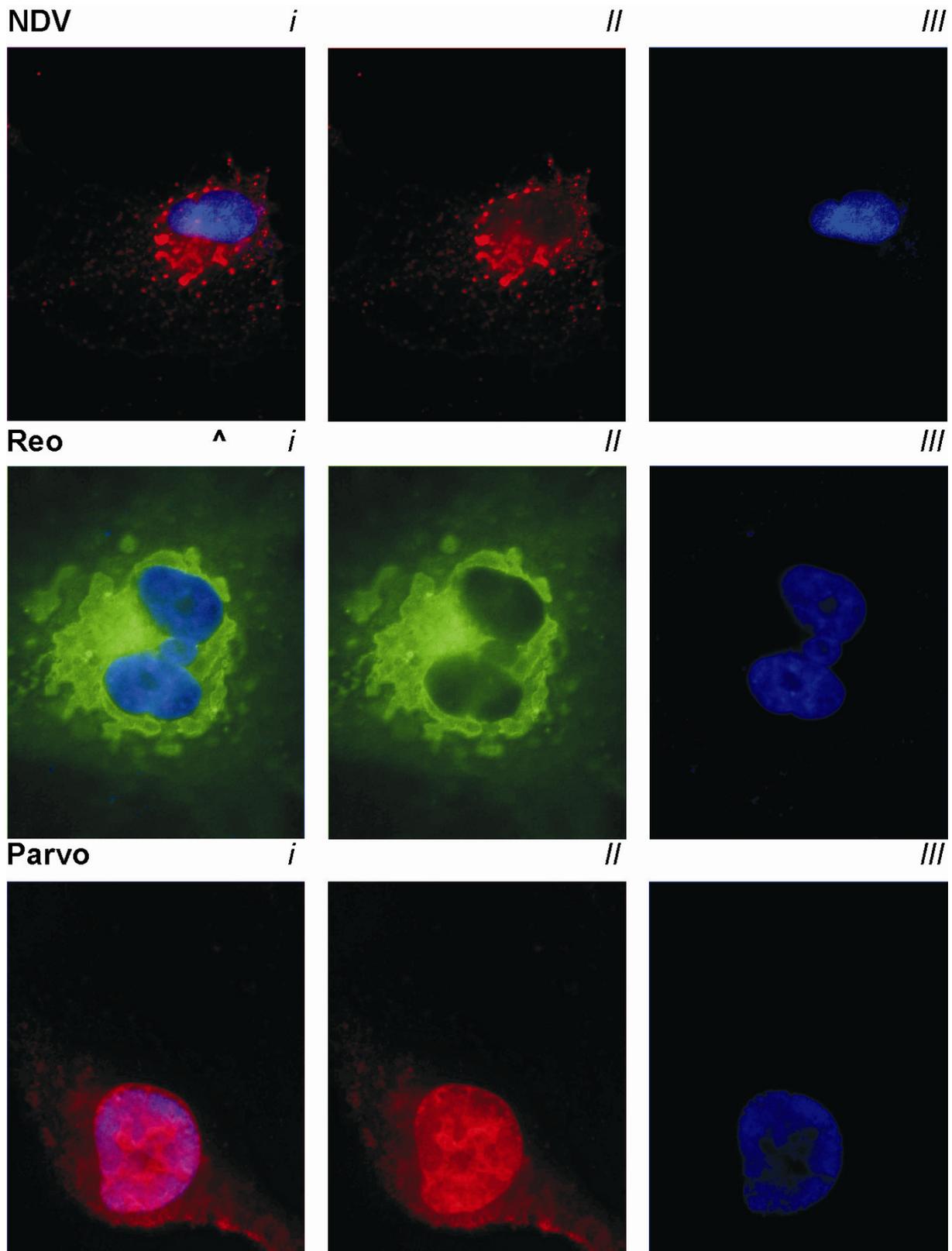


Abbildung 25 Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV, Reovirus und Parvovirus.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Grün → FITC-markierten Reovirus-Antigenstrukturen, Rot → TRITC markierten NDV- bzw. Parvovirus-Antigenstrukturen (ii), Blau → DAPI-DNA-Färbung (iii), blau, Merge (i). Vergrößerung 1:400.

Ergebnisse

Als Nächstes erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung doppelinfizierter Zellen. Erstaunlicherweise führte eine Behandlung mit Reovirus plus NDV zum Nachweis beider Virusproteine in nahezu allen Zellen (Abbildung 26). Bei näherer Betrachtung erkennt man für jedes Virus dieselbe intrazelluläre Verteilung der Virusproteine, wie bei monoinfizierten Zellen. Wie man in Abbildung 28 sehen kann, lassen sich in einer Zelle sowohl die Reovirus-spezifischen Inclusion-Bodies, als auch die „versprenkelten“ NDV-Proteine in ER-Nähe darstellen. Eine gegenseitige Beeinflussung der intrazellulären viralen Proteinverteilung konnte nicht beobachtet werden. Obwohl in beiden Zelllinien ein ähnliches Replikationsmuster zu sehen war, bestanden geringe Unterschiede im Infektionsmuster. Anders als in U87 Zellen, in der eine vollständige Doppelinfektion nach Behandlung mit Reovirus plus NDV zu sehen war, konnte in U373-Zellen ein kleiner Anteil von Zellen identifiziert werden, die nur eines der beiden Viren (Reo oder NDV) replizierten (Anteil je < 5 %, Abbildung 25).

Eine gemeinsame Replikation in derselben Zelle kann ebenfalls bei der Kombination Reovirus plus Parvovirus nachgewiesen werden. Auch hier bewirkt eine Infektion mit zwei Viren keine offensichtliche Beeinträchtigung des intrazellulären Replikationsmusters. Sowohl die Replikation des Parvovirus im Nukleus, als auch von Reovirus im Zytosol zeigen dieselbe Virusprotein-Verteilung bei monoviral infizierten Zellen wie bei kombiniert infizierten Zellen (Abbildung 27). Wenn auch die überwiegende Mehrzahl der Zellen nach Doppelinfektion eine Replikation von Reo- und Parvovirus aufweisen (85-90 %), so sind 10-15 % der Zellen nur mit einem der beiden Viren infiziert (Abbildung 28). Immunhistologisch lässt sich hier im Replikationsverhalten kombiniert infizierter Zellen kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zelllinien feststellen.

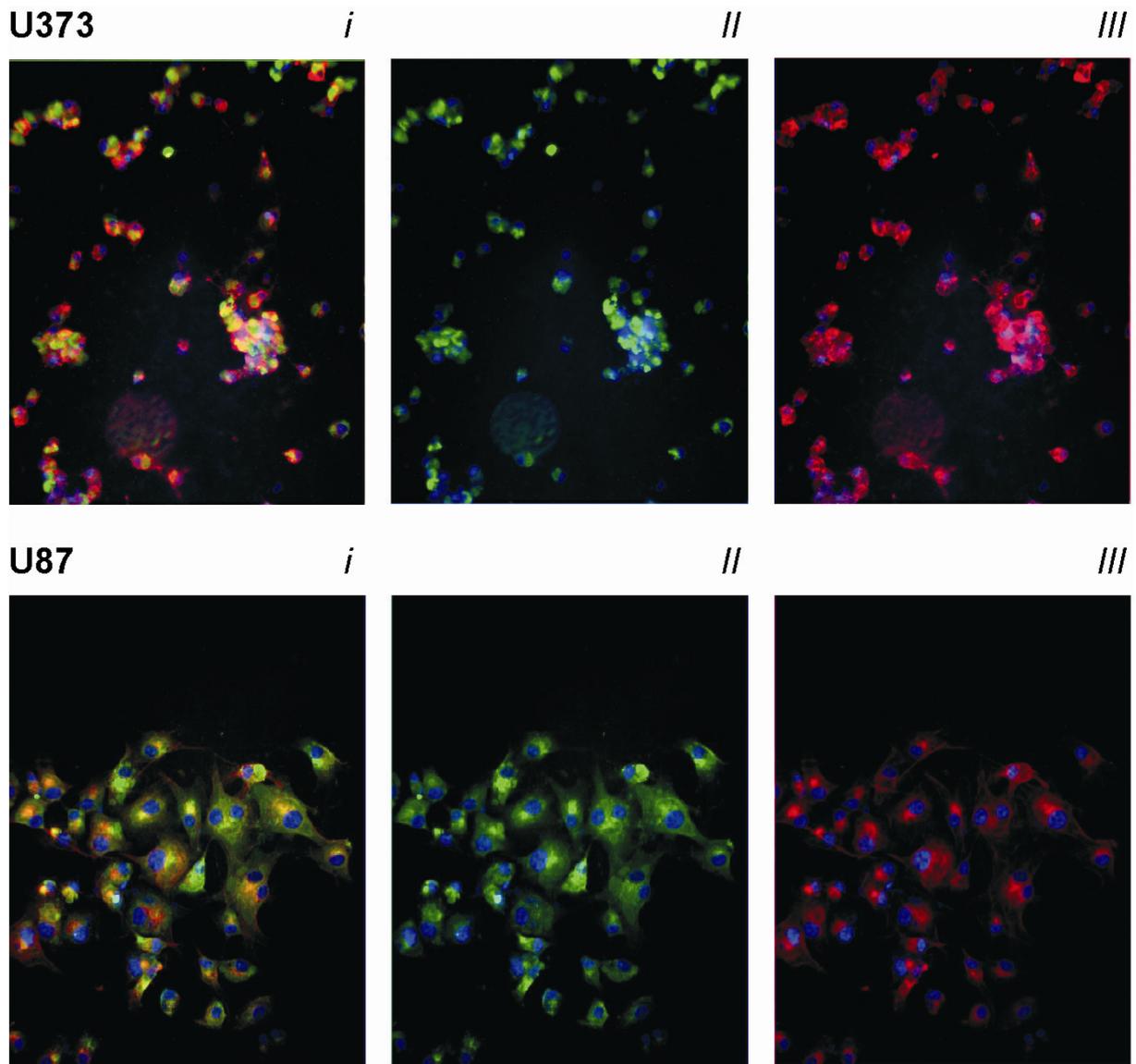


Abbildung 26 Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus plus NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Grün → Fitc-markierten Reovirus-Antigenstrukturen (ii), Rot → TRITC markierten NDV-Antigenstrukturen (iii), Blau → DAPI-DNA-Färbung, blau, Merge (i). Vergrößerung 1:100.

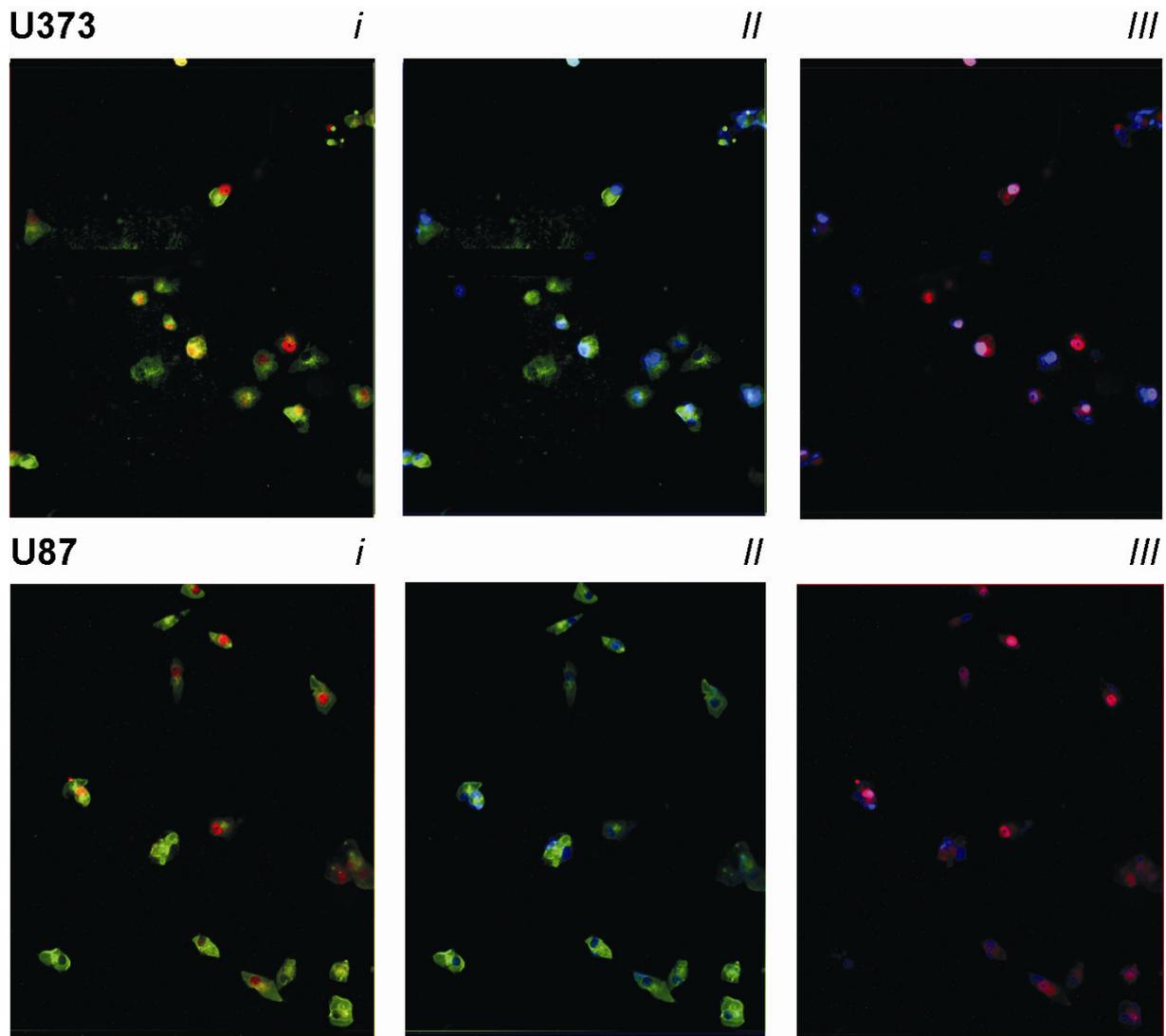


Abbildung 27: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit Reovirus plus Parvovirus.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Grün → Fitc-markierten Reovirus-Antigenstrukturen (ii), Rot → TRITC markierten Parvovirus-Antigenstrukturen (iii), Blau → DAPI-DNA-Färbung, blau, Merge (i). Vergrößerung 1:100.

Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Kombinationen führt der gemeinsame Einsatz von Parvovirus und NDV nur in einem geringen Anteil der behandelten Zellen zu einer Doppelinfektion (8-15 %). Die überwiegende Mehrzahl der Zellen zeigt eine Replikation von NDV. Dagegen sind keine Zellen erkennbar, die nur mit Parvovirus infiziert sind.

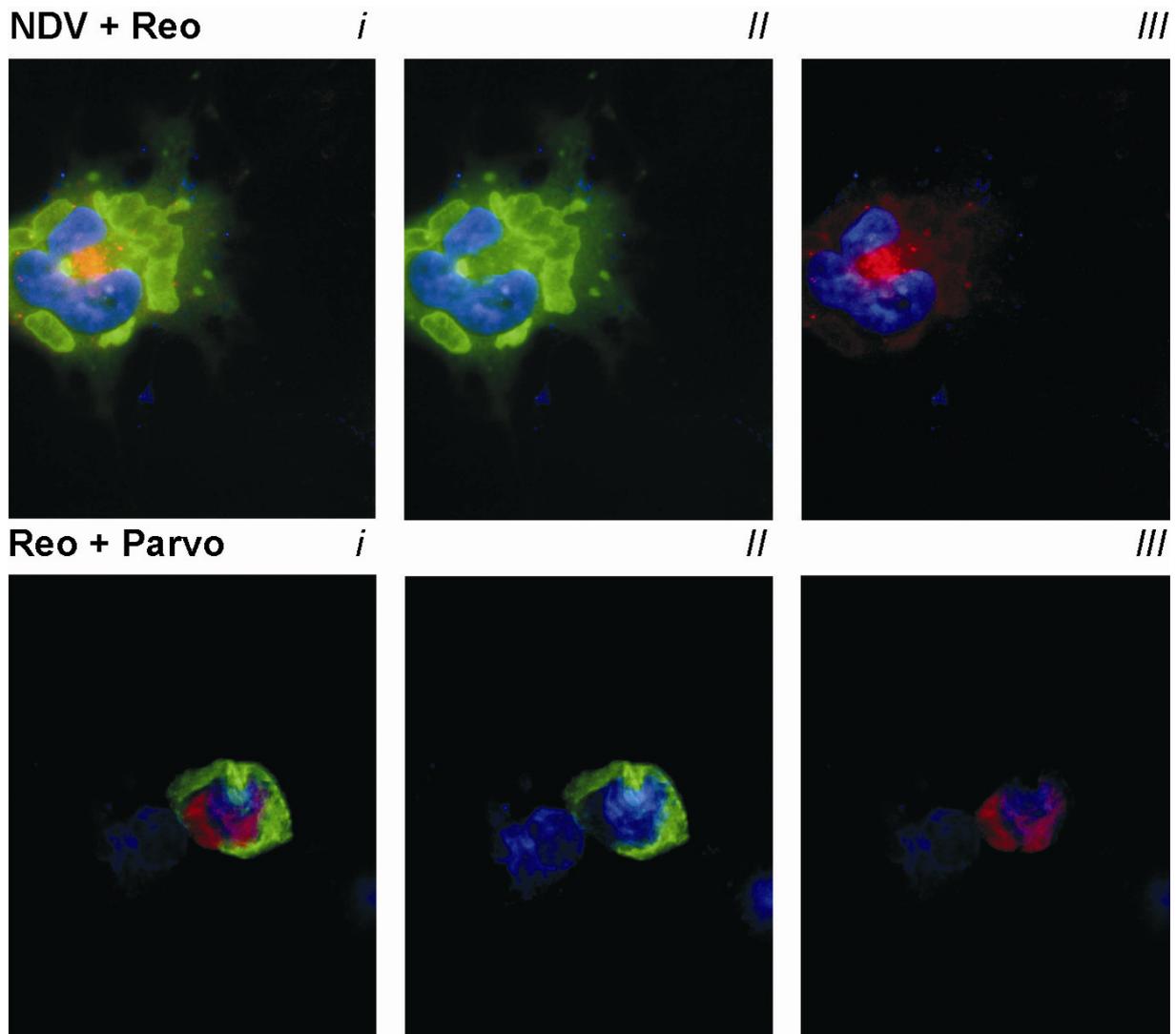


Abbildung 28 Immunhistologische Fluoreszenzanalyse viraler Antigenstrukturen nach Infektion mit NDV plus Reovirus und Reovirus plus Parvovirus.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Grün → Fitc-markierten Reovirus-Antigenstrukturen (ii), Rot → TRITC markierten NDV- bzw. Parvovirus-Antigenstrukturen (iii), Blau → DAPI-DNA-Färbung, blau, Merge (i). Vergrößerung 1:400.

III.1.2.2 Durchflusszytometrische Analyse nach Infektion mit Reovirus, Parvovirus monoviral und in dualer Kombination

Zur Quantifizierung des Anteils Reovirus-, NDV- und Parvovirus-infizierter Zellen nach monoviraler und kombinierter Virusbehandlung erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen 48 h nach Infektion (Abbildung 29, Abbildung 30).

Nach Inkubation mit Reovirus waren im Mittel 97 % der U87- und 93 % der U373-Zellen infiziert (Abbildung 31, Tabelle 11). Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zeigte jedoch nur eine schwache Signifikanz ($P=0,49$; Tabelle 12).

Eine Behandlung mit NDV führte sowohl in U87 als auch in U373 zu einer nahezu vollständigen Virusreplikation in allen Zellen (U87 \rightarrow 98,3 %; U373 \rightarrow 97,9 %, Abbildung 32). Es waren dabei keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien messbar ($P=0,6$, Tabelle 12). Die Behandlung mit Parvovirus hingegen führte lediglich zu einer Replikation in 83,7 % der U87-Zellen und in 77,9 % der U373-Zellen (Abbildung 33, Tabelle 11). Wie bei Reovirus wies die Signifikanzanalyse auch hier wieder einen höheren Anteil befallener Zellen in der Zelllinie U87 nach ($P=0,028$; Tabelle 12).

Die Kombination Reovirus plus NDV bewirkte eine vollständige Infektion aller Zellen (Abbildung 31, Abbildung 32). Bei der überwiegenden Mehrzahl konnte hierbei eine Doppelinfektion gemessen werden (96,9 % der U87- und in 93,2 % der U373-Zellen). Lediglich ein sehr geringer Anteil der Zellen war mit Reovirus oder NDV alleine infiziert (3,1 % der U87-Zellen und 6,8% der U373-Zellen; Tabelle 11). Um herauszufinden, ob sich der Anteil an Zellen, die Reovirus oder NDV replizieren durch Kombination ändert, erfolgte der statistische Vergleich monoinfizierter mit doppelinfizierten Zellen. Wie man in Tabelle 13 sehen kann, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Virusreplikation zwischen monoviraler oder kombinierter Therapie mit NDV und Reovirus (U87 Reo, $P=0,347$; U87 NDV, $P=0,465$).

Interessanterweise führte die Kombination von Reovirus plus Parvovirus zu einer Steigerung des Anteils Parvovirus-replizierender Zellen von 83,7 % auf 92,17 % in der Zelllinie U87 und von 77,9 % auf 88,6 % in der Zelllinie U373 (Abbildung 32, Abbildung 33). Dieser Anstieg zeigte bei statistischer Testung eine starke Signifikanz (U87, $P=0,016$, U373, $P=0,009$; Tabelle 12). Dagegen konnte keine relevante Änderung des Gesamtanteils Reovirus-replizierender

Ergebnisse

Zellen in dieser Gruppe gemessen werden. Auch bei dieser Kombination war der überwiegende Anteil an Zellen mit Reovirus und Parvovirus doppelinfiziert (U87, 89,7 %; U373, 83,6 %). 2-3 % der Zellen waren im Durchschnitt nach der kombinierten Virusapplikation mit keinem Virus infiziert, und 8,3% der U87 und 16,1% der U373-Zellen lediglich mit Reovirus oder Parvovirus alleine infiziert. Insgesamt war der Anteil an Parvovirus-infizierten Zellen bei U87 ein wenig höher als bei U373-Zellen ($P=0,047$). Ein Unterschied der reoviralen Infektionsrate zwischen beiden Zelllinien war hingegen nicht nachweisbar ($P=0,917$; Tabelle 11).

Die Kombination von NDV und Parvovirus erbrachte, wie zuvor immunhistologisch gezeigt, einen deutlichen Abfall des Anteils Parvovirus-infizierter Zellen, bei U87 von 83,7 % auf 8,3 % und bei U373 von 77,9 % auf 5,3 % (Abbildung 32, Abbildung 33). Dieser Abfall zeigte bei beiden Zelllinien eine starke Signifikanz (U87/U373, $P=0,009$; Tabelle 12). Der Anteil an NDV-replizierenden Zellen nach Kombination mit Parvovirus hingegen unterschied sich nicht von monoviral mit NDV-behandelten Zellen ($P=0,675$; U373, $P=0,209$; Tabelle 12). Die Kombination NDV plus Parvovirus zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Infektionskinetik zwischen den beiden untersuchten Zelllinien (NDV, $P=0,142$; Parvo, $P=0,117$).

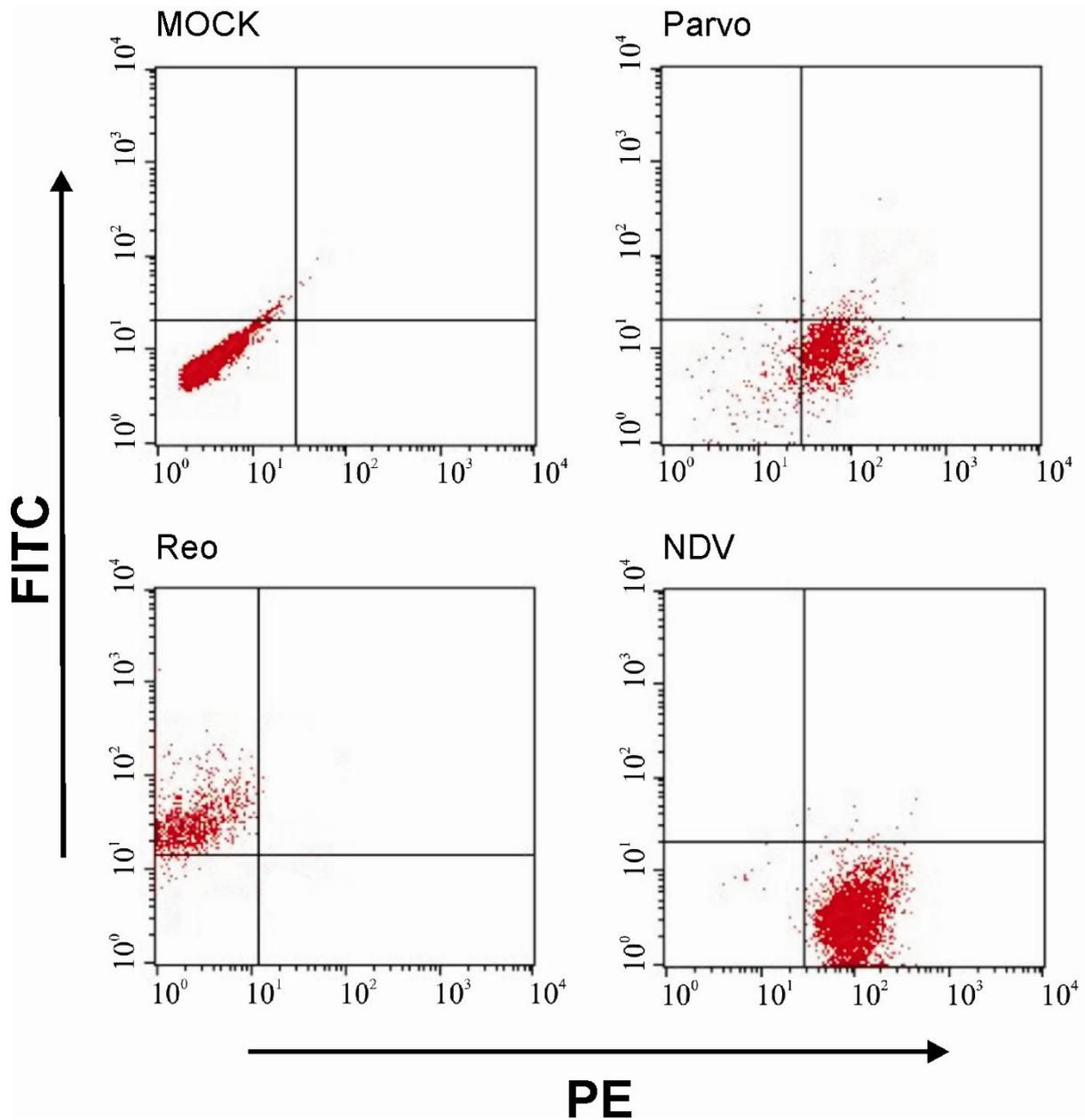


Abbildung 29: FACS-Analyse infizierter U87-Zellen nach Behandlung mit Reovirus, NDV und Parvovirus

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. NDV und Parvovirus wurden mittels PE-gekoppelten AK markiert, für Reovirus erfolgte die Markierung mittels Fitc-gekoppelten AK.

y-Achse → Intensität für FITC-markierte Zellen

x-Achse → Intensität für PE-markierte Zellen

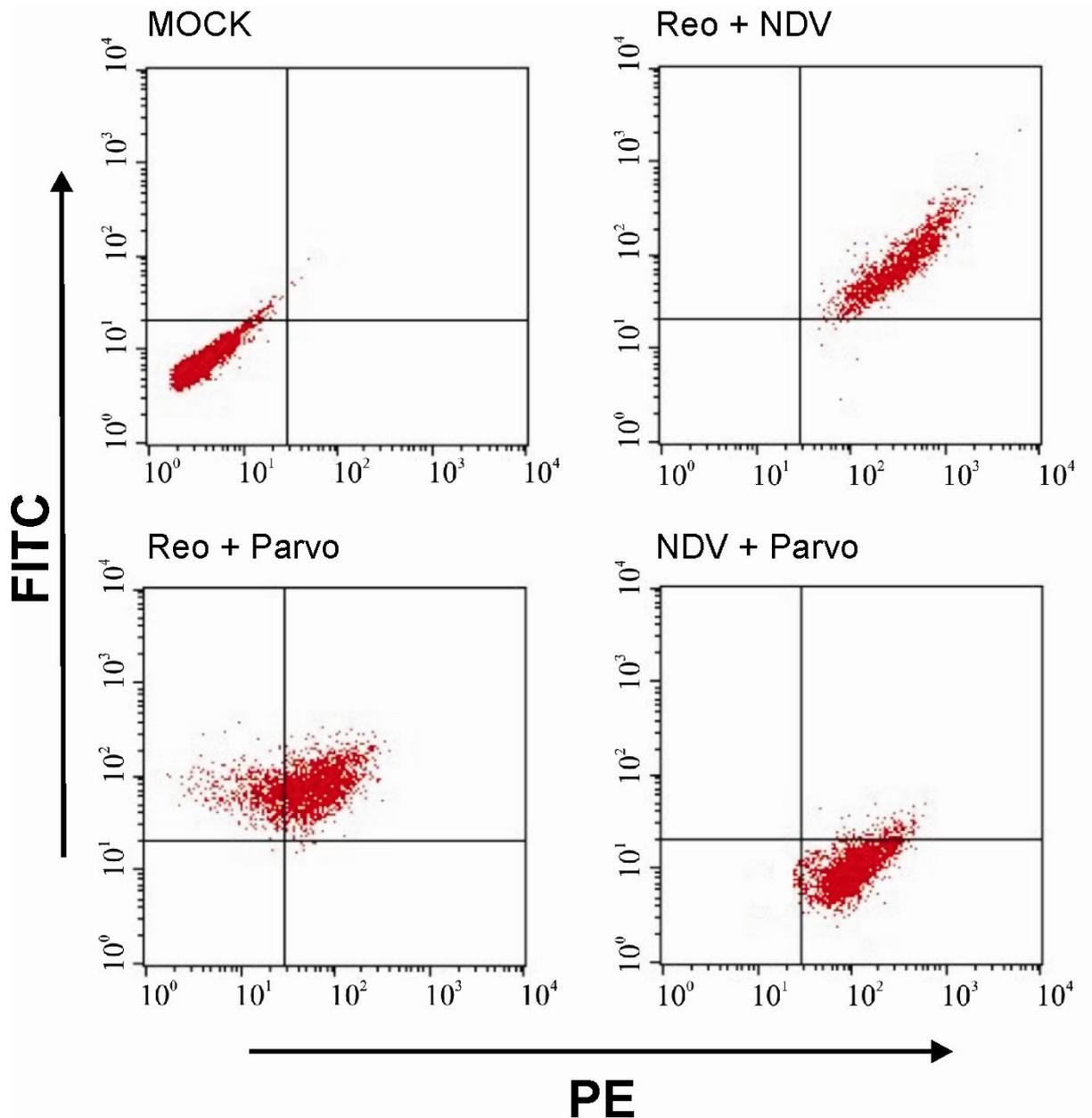


Abbildung 30 FACS-Analyse infizierter U87-Zellen nach Behandlung mit Reovirus plus NDV, Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. NDV und Parvovirus wurden mittels PE-gekoppelten AK markiert, für Reovirus erfolgte die Markierung mittels Fitc-gekoppelten AK.

Im Einsatz mit Reovirus wurde NDV und Parvovirus mittels PE-gekoppelten AK markiert, in der Kombination NDV plus Parvovirus erfolgte für Parvovirus die Markierung mit Fitc-markierten AK. Reovirus erfolgte die Markierung mittels Fitc-gekoppelten AK.

y-Achse → Intensität für FITC-markierte Zellen

x-Achse → die Intensität für PE-markierte Zellen

Ergebnisse

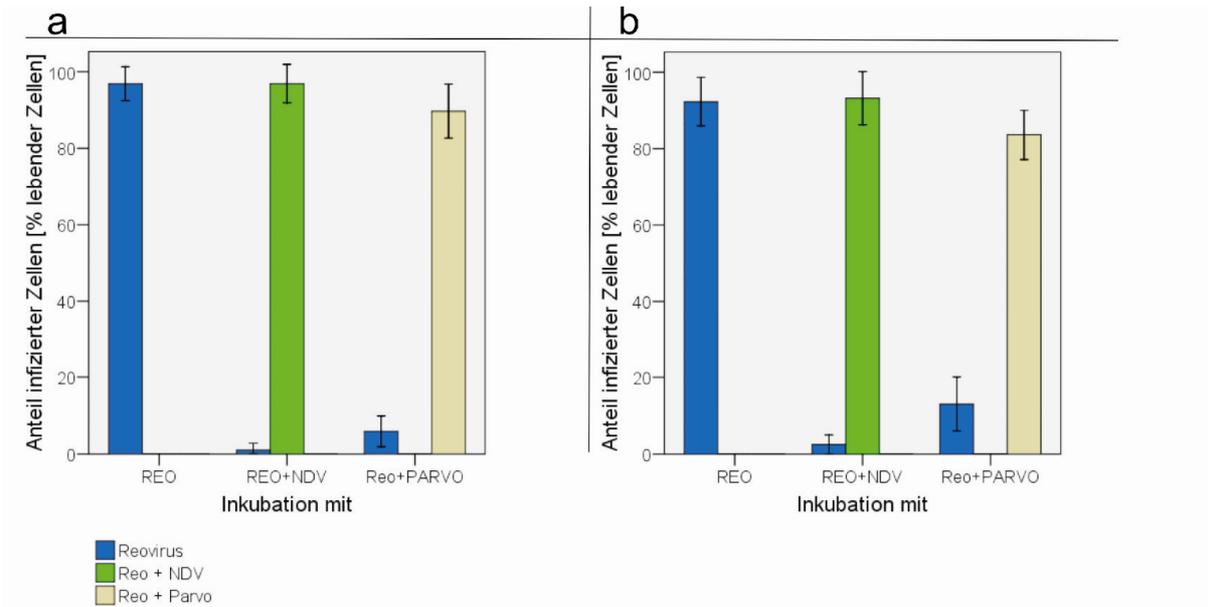


Abbildung 31 Messung des Anteils infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit Reovirus, Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus durch FACS-Analyse.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Anteil an Zellen, die nach Infektion mit Reovirus, Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus ein bzw. zwei Viren replizieren (Quadrantenanalyse). (a) U87, (b) U373

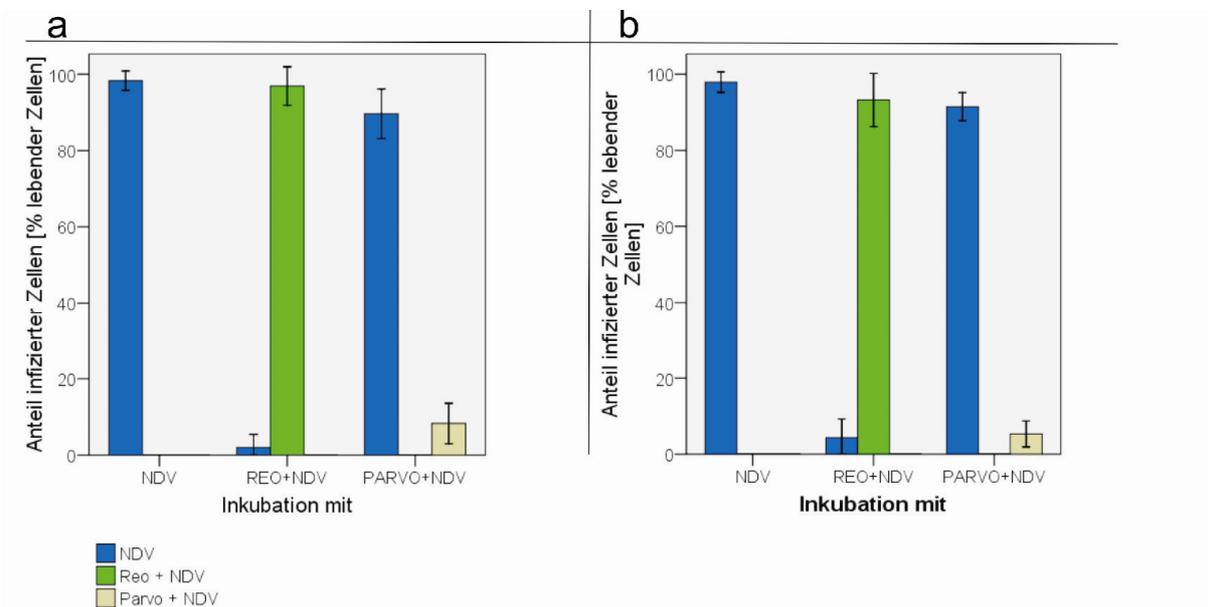


Abbildung 32 Messung des Anteils infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit NDV, NDV plus Reovirus und NDV plus Parvovirus durch FACS-Analyse

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Anteil an Zellen, die nach Infektion mit NDV, NDV plus Reovirus und NDV plus Parvovirus ein bzw. zwei Viren replizieren (Quadrantenanalyse). (a) U87, (b) U373

Ergebnisse

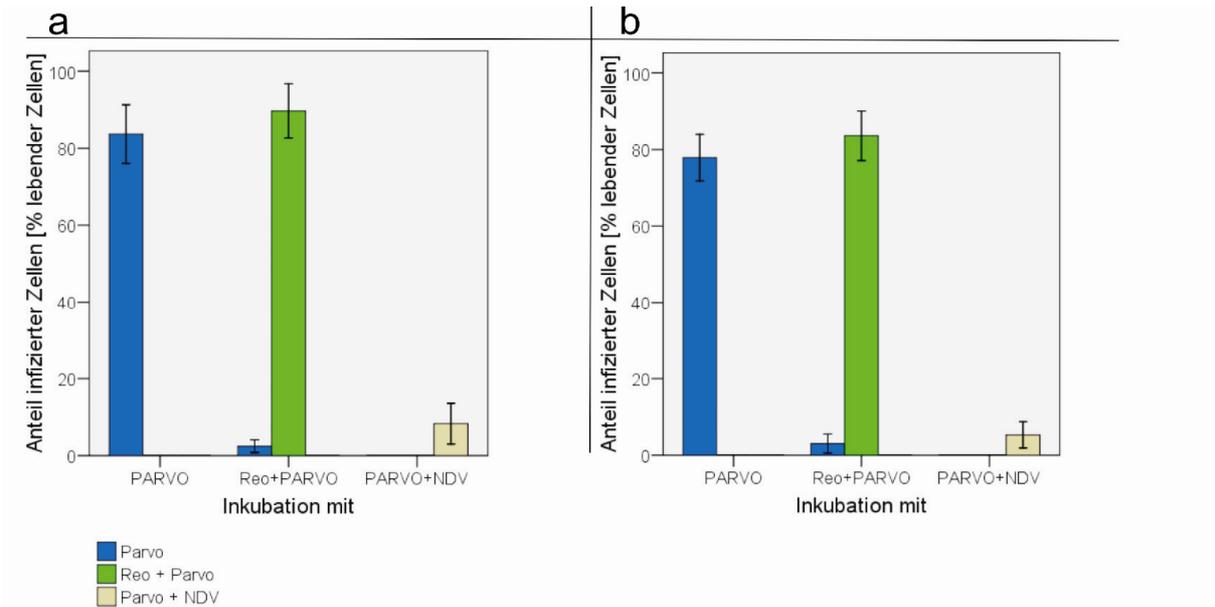


Abbildung 33 Messung des Anteils infizierter U87- und U-373-Zellen nach Behandlung mit Parvovirus, Parvovirus plus Reovirus und NDV plus Parvovirus durch FACS-Analyse

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Anteil an Zellen, die nach Infektion mit Parvovirus, Parvovirus plus Reovirus und NDV plus Parvovirus ein bzw. zwei Viren replizieren (Quadrantenanalyse). (a) U87, (b) U373

Tabelle 11 Signifikanztestung der Unterschiede in der Infektionsrate zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 bei verschiedenen Konzentrationen

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| | Reo | NDV | Parvo | Reo+NDV | Reo+Parvo | NDV+Parvo |
|-------|------|------|-------|---------|-----------|-----------|
| NDV | - | ,602 | - | ,094 | - | ,142 |
| Reo | ,047 | - | - | ,116 | ,917 | - |
| Parvo | - | - | ,028 | - | ,047 | ,117 |

Tabelle 12 Signifikanztestung der Änderung der Infektionsrate nach Kombination von NDV, Reovirus und Parvovirus .

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| | | Reo + NDV | Reo+Parvo | Parvo+NDV |
|-------|------|-----------|-----------|-----------|
| NDV | U87 | ,465 | - | ,675 |
| | U373 | ,675 | - | ,209 |
| Reo | U87 | ,347 | ,347 | - |
| | U373 | ,075 | ,028 | - |
| Parvo | U87 | - | ,016 | ,009 |
| | U373 | - | ,009 | ,009 |

III.1.3 Veränderung der Replikationskinetik durch Kombination von onkolytischen Viren

In den letzten beiden Abschnitten konnten wir zeigen, dass die Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus zu einer Steigerung des Zellsterbens bei Glioblastomzellen führt, und dass es sich hierbei um einen synergistischen Effekt handelt, der durch die gemeinsame Replikation von zwei Viren in einer Zelle zustande kommt. In diesem Abschnitt soll nun der Einfluss auf die Kinetik der Virusreplikation und der Virusfreisetzung nach Koinfektion mit zwei der drei zu untersuchenden Viren untersucht werden. Hierzu wurde die Viruslast in den Zell-Überständen zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion mit einer Konzentration von MOI=5 PFU/Zelle für jedes Virus untersucht.

Wie man in Abbildung 34 erkennen kann, ist der Verlauf der Virusfreisetzung für die beiden untersuchten Zelllinien nach Infektion mit Reovirus sehr verschieden. Obwohl die Viruslast im Überstand 72h nach Infektion bei beiden Zelllinien ähnlich hoch ist (ca. 10^{10} Viren/ml), zeigt sie zu den Zeitpunkten 24h und 48h einen signifikanten Unterschied (24h \rightarrow P=0,016; 48h \rightarrow P= 0,009; Tabelle 14). Der Reovirustiter kann dabei bei U87-Zellen um das 100-fache gegenüber U373-Zellen erhöht sein. In NDV-infizierten Zellen ist dagegen kein Unterschied im Titerverlauf zwischen den beiden Zelllinien eruierbar (Abbildung 35; Tabelle 14). Es wird bei beiden Zelllinien ebenfalls eine Endkonzentration von ca. 10^{10} Viren/ml im Zellüberstand erreicht.

Ein drastischer Unterschied der Virustiterentwicklung zwischen den Zelllinien U373- und U87-Zellen konnte nach Behandlung mit Parvovirus beobachtet werden (Abbildung 36; Tabelle 13). Im Überstand Parvovirus-behandelter U373-Zellen war der Virustiteranstieg sehr flach und erreichte 72 h nach Infektion eine Endkonzentration von ca. $10^{9,5}$ Viren/ml. Dagegen war nach Behandlung von U87-Zellen mit Parvovirus ein sehr steiler Titeranstieg messbar; die Parvovirus-Endkonzentration lag bei ca. 10^{13} . Somit lag die parvovirale Konzentration 72 h nach Infektion bei U87-Zellen mehr als 500-fach höher als bei U373-Zellen.

Unter Kenntnis der Titerverläufe nach monoviraler Infektion wurde als nächstes untersucht, inwiefern die kombinierte Behandlung mit den Viren Reovirus plus NDV, Reovirus plus Parvovirus und NDV plus Parvovirus die Virustiterentwicklung von Reovirus, NDV und Parvovirus verändert.

Ergebnisse

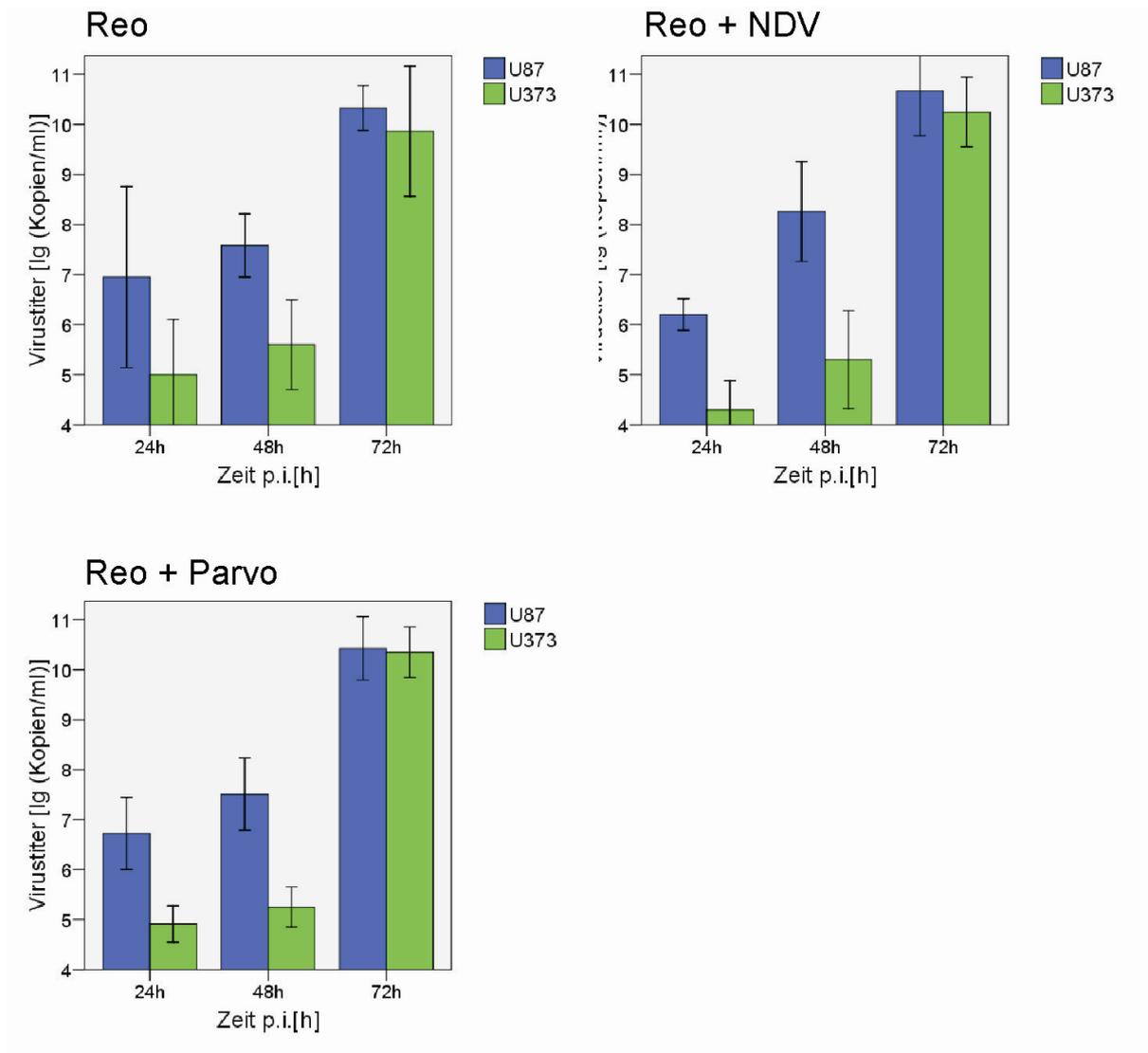


Abbildung 34 : Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Ergebnisse

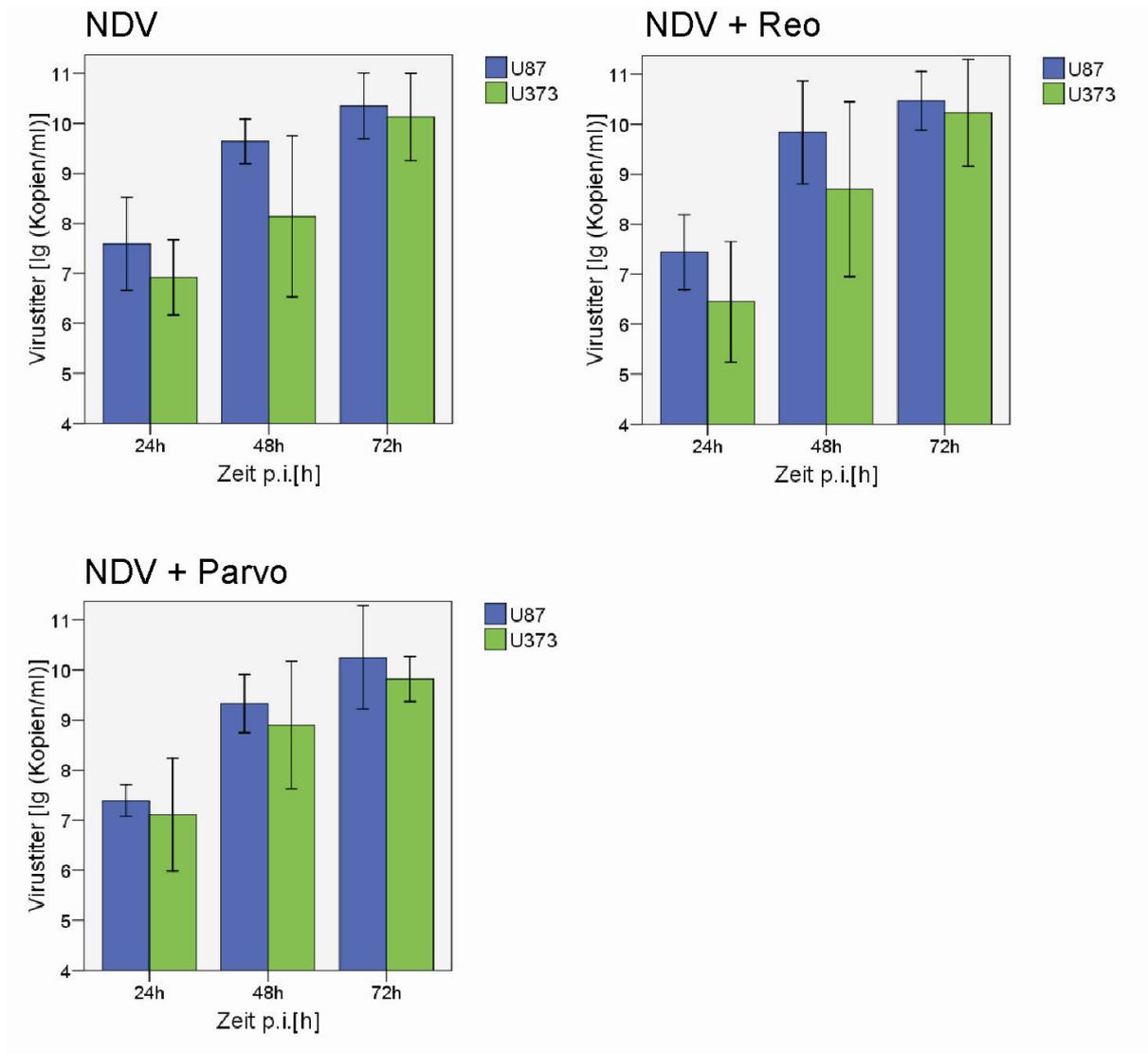


Abbildung 35 Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit NDV alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/Reovirus.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Ergebnisse

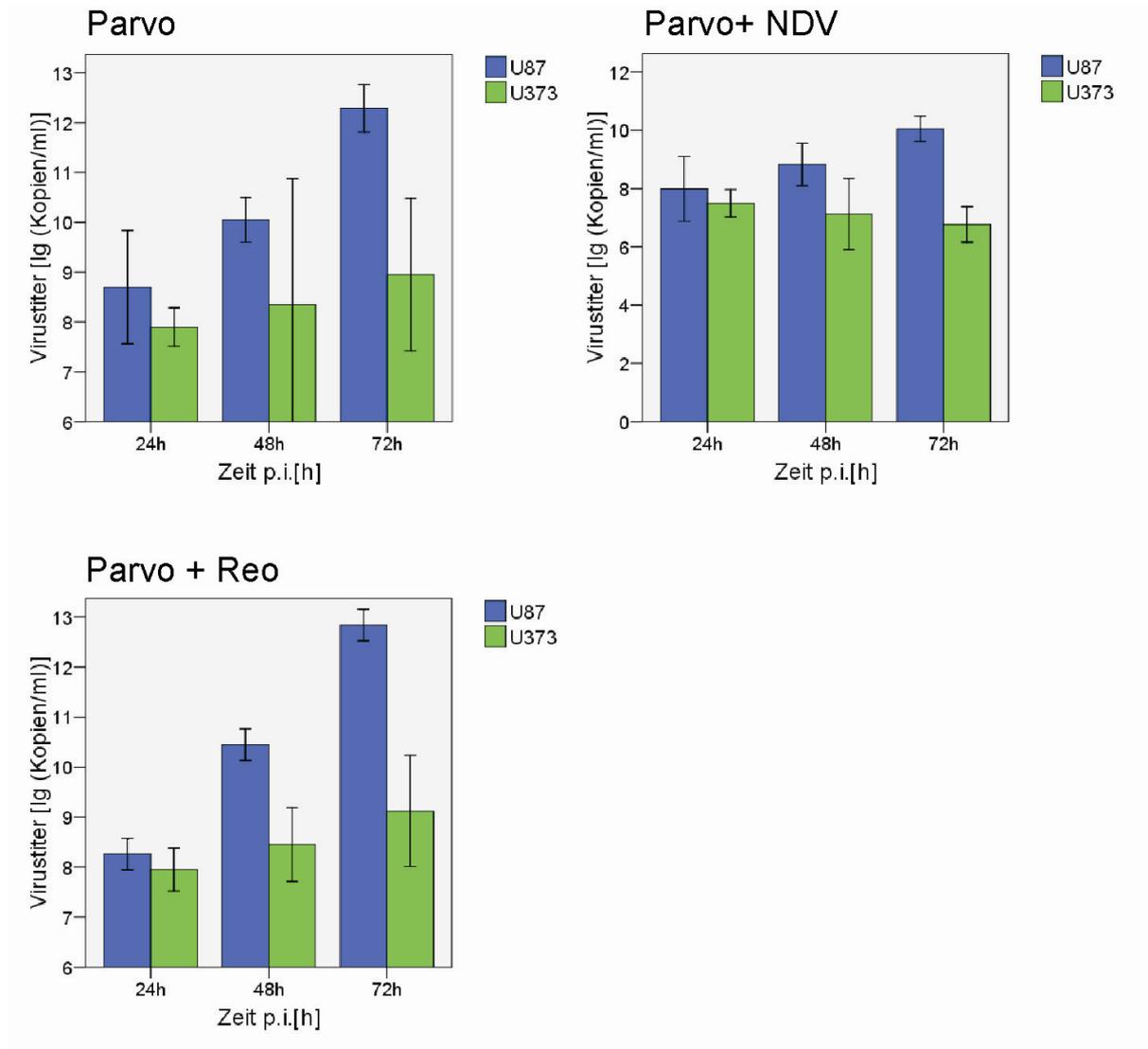


Abbildung 36 Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien U87 und U373 in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Parvovirus alleine oder in dualer Kombination mit Reovirus/NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, beeinflusst die Kombination von Reovirus plus NDV die Reovirus-Kinetik nicht. Zu keinem Zeitpunkt ist ein Unterschied in der Reoviruskonzentration zwischen einfach und kombiniert infizierten Zellen darstellbar (Tabelle 14). Dies gilt für beide untersuchten Zelllinien. Auch die Kombination Reovirus plus Parvovirus hat keinen Einfluss auf die Reovirus-Titerentwicklung im Zellüberstand von U87 oder U373-Zellen (Abbildung 37, Tabelle 15).

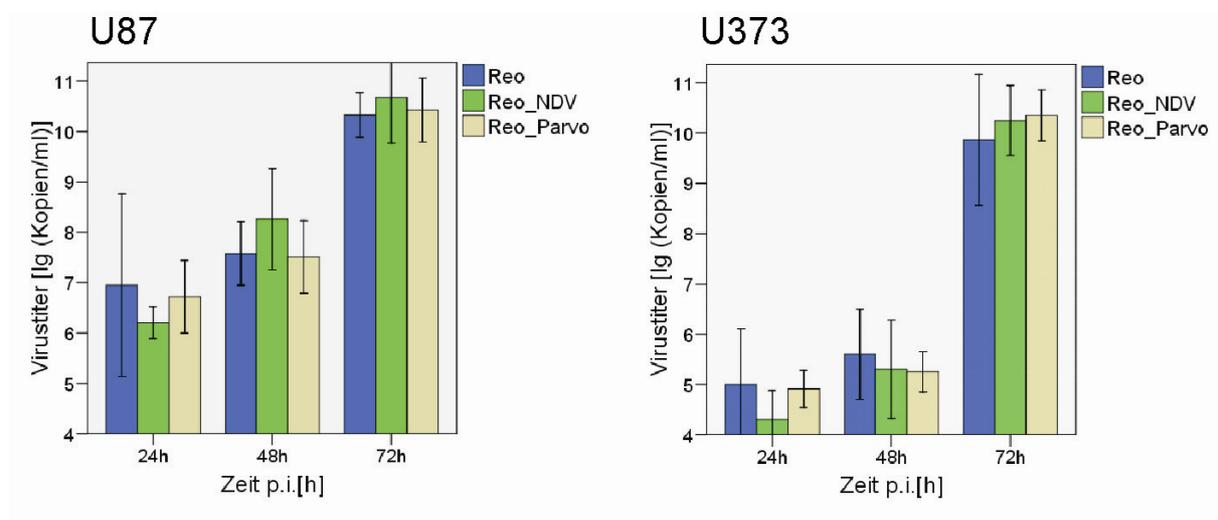


Abbildung 37 Unterschiede in der Freisetzung von Reovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 38 und Tabelle 14 erkennbar, hat die Kombination von NDV mit Reovirus oder Parvovirus ebenfalls keinen Einfluss auf die Viruskinetik von NDV. Auch hier ist kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien feststellbar (Tabelle 15).

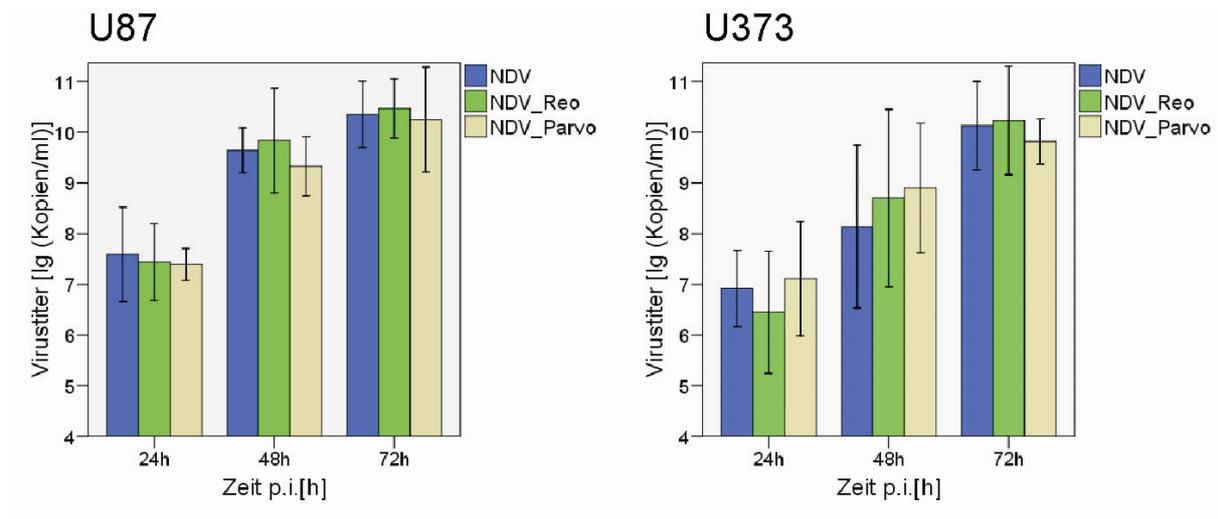


Abbildung 38 Unterschiede in der Freisetzung von NDV ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Im Gegensatz hierzu bewirkt die Kombination Parvovirus plus NDV einen drastischen Rückgang des Parvovirus-Titers zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 39). Mittels Signifikanzanalyse lässt sich der stark inhibierende Einfluss der Kombination mit NDV für die Parvoviruslast im Zellüberstand nachweisen (Tabelle 16). Auch hier lassen sich die Veränderungen in beiden untersuchten Zelllinien beobachten.

Ergebnisse

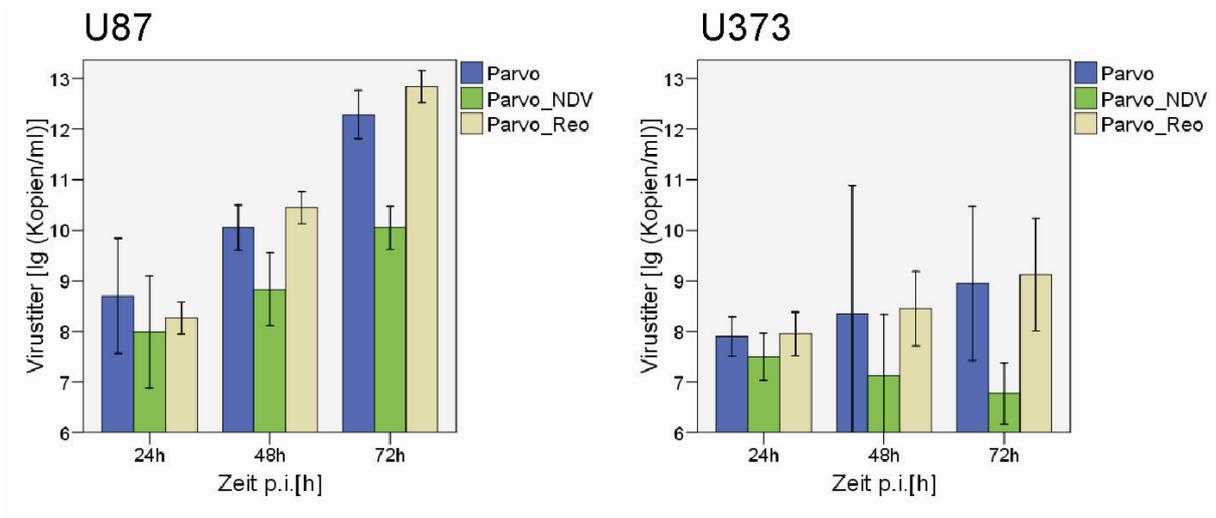


Abbildung 39 Unterschiede in der Freisetzung von Parvovirus ins Zellmedium nach Infektion mit Reovirus alleine oder in dualer Kombination mit Parvovirus/NDV.

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle. Quantifizierung mittels RT-PCR. 5%-Fehlerbalken vom Mittelwert.

Tabelle 13 Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen U87- und U373-Zellen nach Infektion mit Reovirus, NDV und Parvovirus in Monotherapie und in dualer Kombination.

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| Inkubation mit | Virustier von | Zeit p.i. [h] | | |
|----------------|---------------|---------------|------|------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| NDV | NDV | ,047 | ,009 | ,347 |
| Reo | Reo | ,016 | ,009 | ,175 |
| Parvo | Parvo | ,016 | ,021 | ,009 |
| Reo+NDV | NDV | ,021 | ,047 | ,402 |
| | Reo | ,009 | ,009 | ,117 |
| NDV+Parvo | Parvo | ,117 | ,009 | ,009 |
| | NDV | ,465 | ,175 | ,117 |
| Reo+Parvo | Reo | ,009 | ,009 | ,675 |
| | Parvo | ,028 | ,009 | ,009 |

Ergebnisse

Tabelle 14 Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelter Zellen. Es wurden die Viren Reovirus und NDV untersucht.

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| Zeit p.i. [h] | | Reo + NDV | | |
|---------------|------|-----------|------|------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| NDV | U87 | ,602 | ,402 | ,347 |
| | U373 | ,209 | ,347 | ,675 |
| Reo | U87 | ,117 | ,047 | ,117 |
| | U373 | ,047 | ,347 | ,347 |

Tabelle 15 Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelter Zellen. Es wurden die Viren Reovirus und Parvovirus untersucht.

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| Zeit p.i. [h] | | Reo + Parvo | | |
|---------------|------|-------------|-------------|-------------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| Reo | U87 | ,465 | ,917 | ,597 |
| | U373 | ,602 | ,117 | ,175 |
| Parvo | U87 | ,251 | ,021 | ,009 |
| | U373 | ,016 | ,117 | ,009 |

Tabelle 16 Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen monoviral und in dualer Kombination behandelter Zellen. Es wurden die Viren NDV und Parvovirus untersucht.

(Kruskal-Wallis, Signifikanzgrenze < 0,05)

| Zeit p.i. [h] | | Parvo + NDV | | |
|---------------|------|-------------|-------------|-------------|
| | | 24 | 48 | 72 |
| NDV | U87 | ,462 | ,076 | ,602 |
| | U373 | ,602 | ,142 | ,251 |
| Parvo | U87 | ,076 | ,009 | ,009 |
| | U373 | ,016 | ,117 | ,009 |

III.2 Untersuchung des Zytoskelett-Einflusses auf die Kombination Reovirus plus NDV

Eine ganze Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit den Veränderungen des Zytoskeletts, die durch Reovirusinfektionen verursacht werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Reovirus-Proteine aktiv an Umstrukturierungen des Zytoskeletts infizierter Zellen beteiligt sind. Die NDV-Replikation ist ebenfalls auf das Zytoskelett angewiesen. Es wird für den viralen Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum an die Membranoberfläche benötigt. Um eine räumliche Vorstellung der Beziehung der Virusproteine zum Zytoskelett zu bekommen und Umstrukturierungen im Zytoskelett, die durch eine kombinierte Replikation von Reovirus und NDV verursacht werden, darzustellen, erfolgte eine immunhistologische Analyse unter gemeinsamer Fluoreszenzmarkierung von alpha-Mikrotubuli und Virusproteinen in infizierten Zellen.

Wie in (Abbildung 40, Abbildung 41) zu erkennen, bewirkt eine Infektion mit Reovirus alleine die Entstehung von sogenannten „viral factories“ in den Zellen. Hierbei handelt es sich um intrazytoplasmatische Räume mit hoher Dichte an reoviralen Proteinen. Die Mikrotubuli von Reovirus-infizierten Zellen umspannen dabei diese Räume von außen ohne sie zu durchdringen, ähnlich einem stabilisierenden Gerüst (Abbildung 40). Die Infektion der Zelle mit Reovirus bewirkt somit einen Umbau des Zytoskeletts. Im Gegensatz hierzu erkennt man bei NDV-Proteinen eine punktförmige Verteilung mit einer Konzentrierung an einem perinukleären Ende (Abbildung 41). Auch hier findet man eine enge Vergesellschaftung der NDV-Proteine mit den Mikrotubulifilamenten. Allerdings deutet hierbei nichts auf eine Beeinflussung der Zytoskelett-Struktur hin.

Unser Interesse lag darin herauszufinden, inwieweit die Umformung des Zytoskeletts durch das Reovirus das Verteilungsmuster der NDV-Proteine beeinflusst. Wie wir in den vorangegangenen Abschnitten gesehen haben, scheint sich eine gemeinsame Replikation von Reovirus und NDV in einer Zelle auf keines der beiden Viren negativ auf das Replikationsverhalten auszuwirken. In Abbildung 40 sind zwei doppelinfizierte Zellen dargestellt, in denen sowohl Reovirus als auch NDV problemlos replizieren können. Die Veränderungen des Zytoskeletts nach Doppelinfektion stellen sich wie in Zellen dar, die nur mit Reovirus alleine infiziert wurden. Auch hier kommt es zu einem Umbau der

Ergebnisse

mikrotubulären Filamente und zum Aufbau eines mikrotubulären Gerüsts, welches die „viral factories“ umspannt. Interessanterweise zeigen auch die NDV-Proteine doppelinfizierter Zellen ein ähnliches intrazelluläres Verteilungsmuster wie in Zellen, die nur mit NDV alleine infiziert wurden. Diese verteilen sich weiterhin punktförmig am mikrotubulären Zytoskelett. Da auch NDV-Proteine in engem Kontakt mit dem Zytoskelett stehen und das Zytoskelett die viral factories umspannt, macht es den Anschein, als würden NDV-Proteine die „viral factories“ umrahmen (Abbildung 42). Wie bei monoviral mit NDV infizierten Zellen lässt sich auch bei doppelinfizierten Zellen die größte NDV-Protein-Ansammlung an einer Seite perinukleär darstellen.

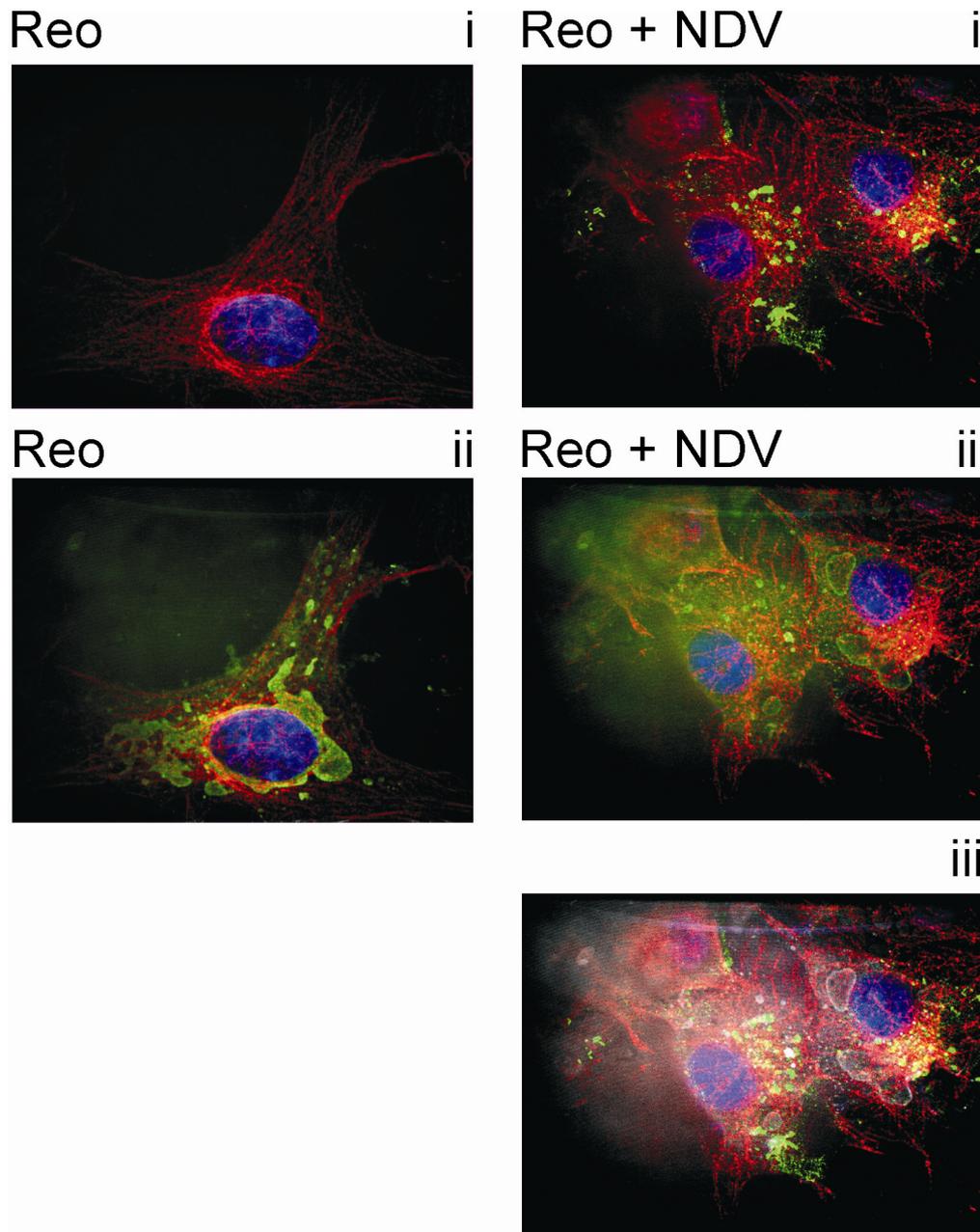


Abbildung 40 Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus und Reovirus plus NDV

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle.

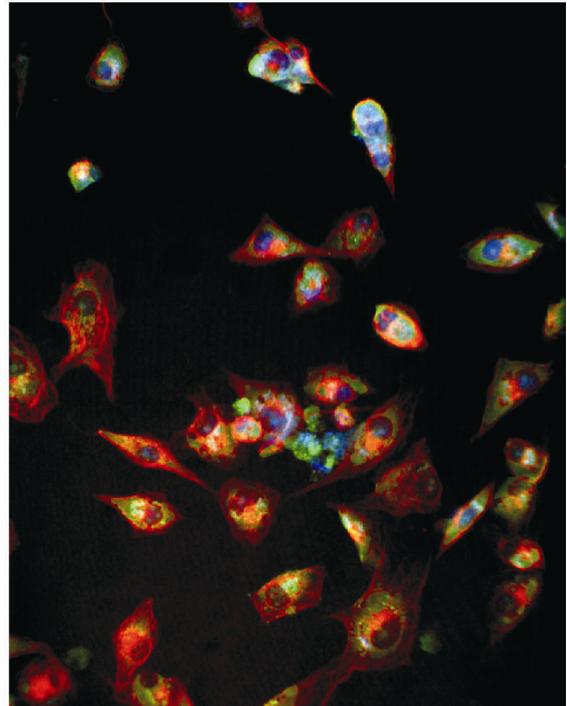
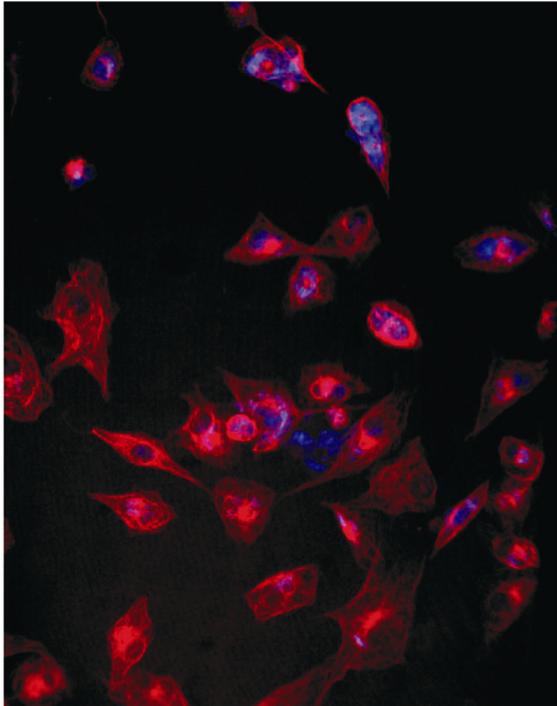
Infektion nur mit Reovirus → Tubulin (rot) (i)/(ii)/(iii), Reovirus (grün) (ii)

Infektion mit Reovirus plus NDV → Tubulin (rot) (i)/(ii)/(iii), Reovirus grün (ii), NDV grün (i), Reovirus grau, NDV grün (iii). Kern in allen blau. Vergrößerung 1:400.

Reo

i

ii



NDV

i

ii

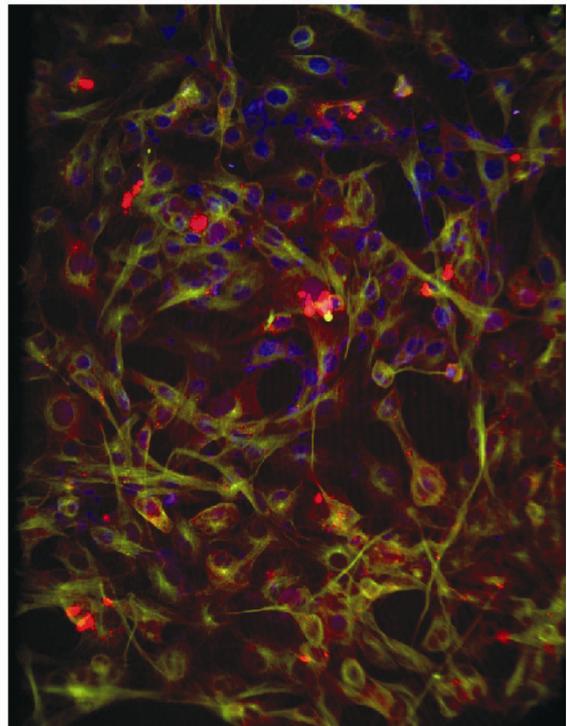
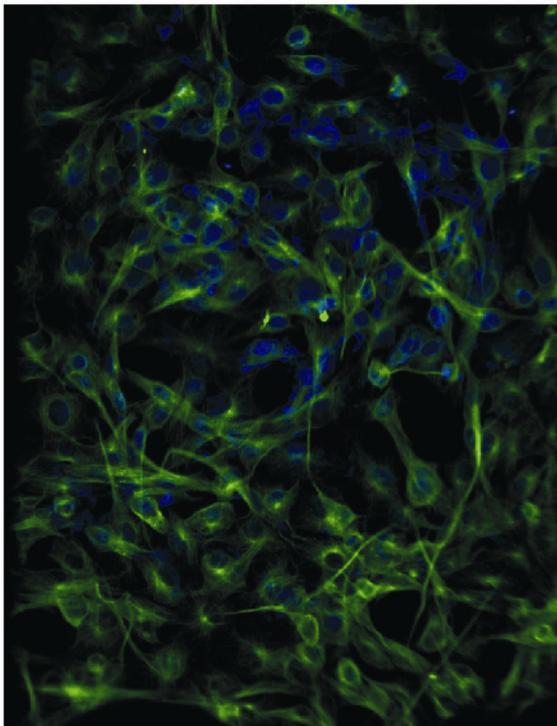


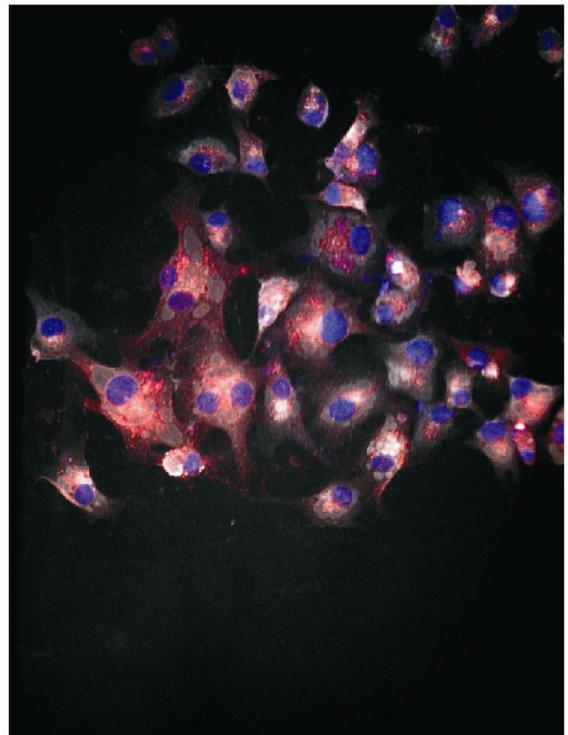
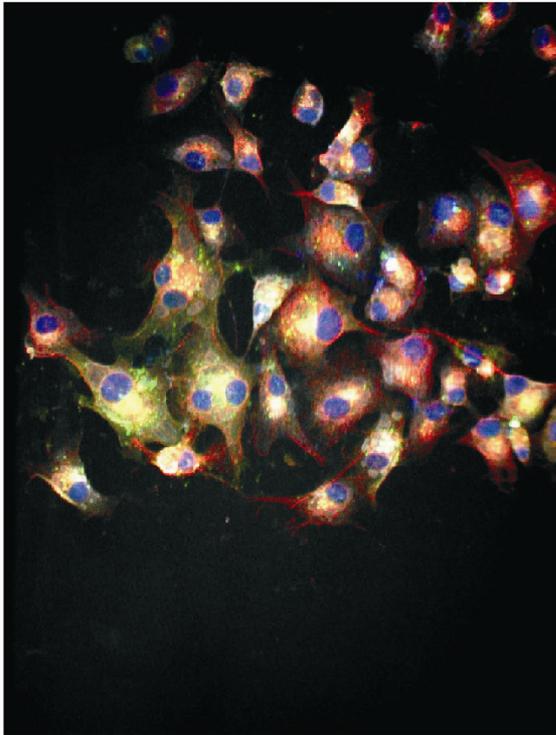
Abbildung 41 Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus oder NDV.

*Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle.
Infektion mit NDV → Tubulin grün, NDV rot
Infektion mit Reovirus → Tubulin rot, Reovirus grün
Kern in allen blau. Vergrößerung 1:100.*

Reo + NDV

i

ii



iii

iv

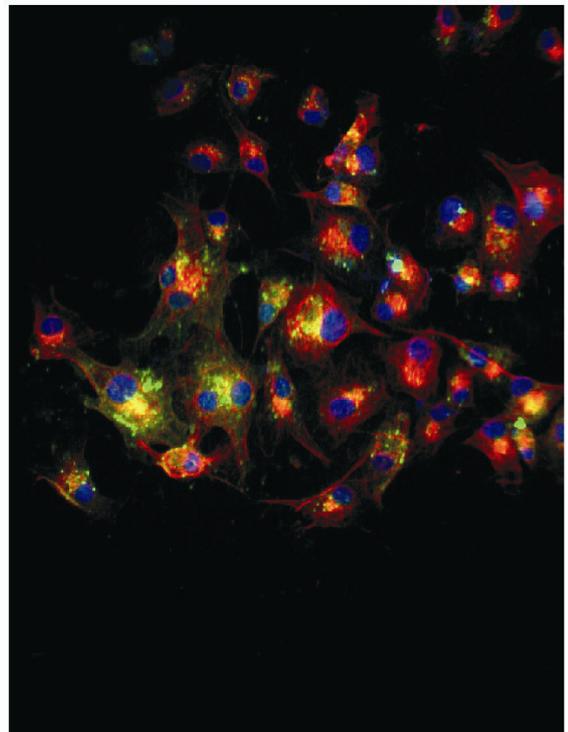
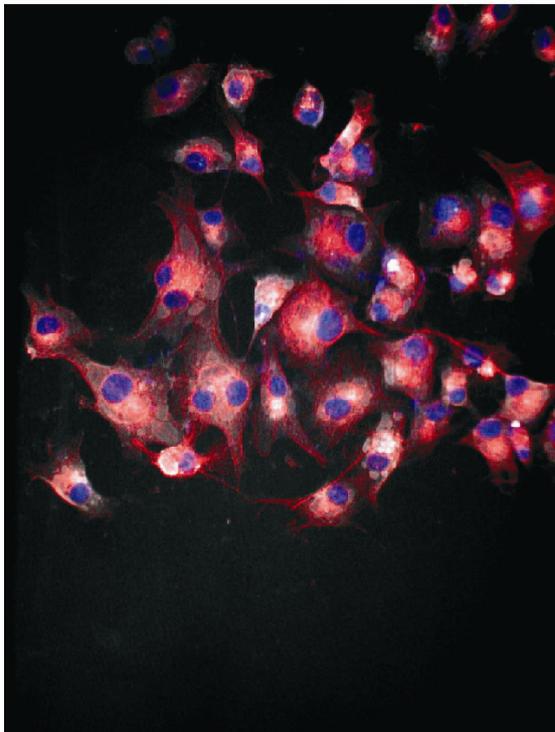


Abbildung 42 Veränderungen des Zytoskeletts durch Infektion mit Reovirus plus NDV

Virus-Konzentration, jeweils 5 PFUs/Zelle.

(i) Tubulin rot, Reovirus grau, NDV grün

(iii) Tubulin rot, Reovirus grau

Kern in allen blau. Vergrößerung 1:100

(ii) Reovirus grau, NDV rot

(iv) Tubulin rot, NDV grün

III.3 Auswirkungen der Kombination Reovirus plus NDV in vivo:

Die Kombination Reovirus plus NDV zeigte den besten synergistischen Effekt in vitro. Um herauszufinden, inwieweit sich diese Effekte am lebenden Organismus reproduzieren lassen, wurde die Wirksamkeit der beiden Viren in Kombination an Xenograft-Tumoren bei Mäusen getestet. Hierfür wurden immungeschwächten SCID/NOD-Mäusen subkutan Tumorzellen implantiert. Nach Anwachsen der Tumore erfolgte eine intratumorale Injektion von Reovirus oder NDV alleine oder in Kombination. Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt.

Die Kontrolltumore zeigten einen exponentiellen Wachstumsverlauf und hatten bei Versuchsende an Tag 12 mehr als das 15-fache ihres Ausgangsvolumens erreicht (Abbildung 43). Die virusbehandelten Tumore zeigten zunächst ebenfalls eine Größenzunahme, die Wachstumskurve flachte allerdings ab dem Tag 6 deutlich ab. Tumore, die nur mit Reovirus behandelt wurden, nahmen zwar dennoch an Größe zu, erreichten zu Versuchsende jedoch lediglich das Doppelte ihres Ausgangsvolumens. Mit NDV-behandelte Tumore nahmen in den ersten 6 Tagen an Volumen zu, waren aber danach größenregredient, sodass an Tag 12 im Mittel wieder das Ausgangsvolumen erreicht war. Doppelinfizierte Tumore waren dagegen die einzigen Tumore, die sich tatsächlich verkleinerten. Lediglich bei 2 der 3 untersuchten Mäuse war der Tumor nach 12 Tagen noch makroskopisch nachweisbar, der andere zeigte eine drastische Verkleinerung (Abbildung 44).

Die durchflusszytometrische Analyse der Tumore ergab eine Rate von 74 % an doppelinfizierten Zellen bei Tumoren, die mit beiden Viren behandelt wurden. 7,5 % dieser Tumore wiesen eine Monoinfektion mit Reovirus und 8,5 % eine Monoinfektion mit NDV auf. Eine Tumorbehandlung mit Reovirus alleine hingegen bewirkte eine Infektion von 63 % der Resttumorzellen an Tag 12. Mit NDV behandelte Tumore waren zu 66 % mit Virus infiziert (Abbildung 45).

Zur Veranschaulichung der Verteilung infizierter Zellen erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse der histologischen Tumorschnitte. Es zeigte sich ein ähnliches Infektionsmuster (Abbildung 46), wie zuvor schon in vitro gesehen. In der Übersichtsbetrachtung (ohne Abbildung) erkennt man ein Cluster-artiges Verteilungsmuster der infizierten Zellen. Dies gilt sowohl für monoviral als auch kombiniert behandelte Mäusetumore.

Um zu untersuchen inwieweit die Behandlung mit Reovirus und NDV zu einer systemischen Virusinfektion führt, erfolgte die Bestimmung der Viruslast behandelter Mäuse im Blut an

Ergebnisse

Tag 12 und in der Leber. Die Viruskonzentrationen im Blut und in der Leber wurden mit denen in den virusbehandelten Tumoren verglichen. Wie man in Tabelle 17 sehen kann, führt eine Infektion mit Reovirus noch an Tag 12 zu einem Nachweis von Virus im Blut. Ebenfalls nachweisen lässt sich Reovirus in der Leber. Die Viruskonzentration liegt hierbei um den Faktor 20-30 niedriger als im Tumorgewebe. NDV hingegen kann nur in behandelten Tumoren gefunden werden. Unter Kombination von Reovirus und NDV zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie unter monoviraler Behandlung.

Alle untersuchten Mäuse waren bis zum Versuchsende an Tag 12 in einem guten Allgemeinzustand. Therapieinduzierte Nebenwirkungen waren nicht aufgefallen.

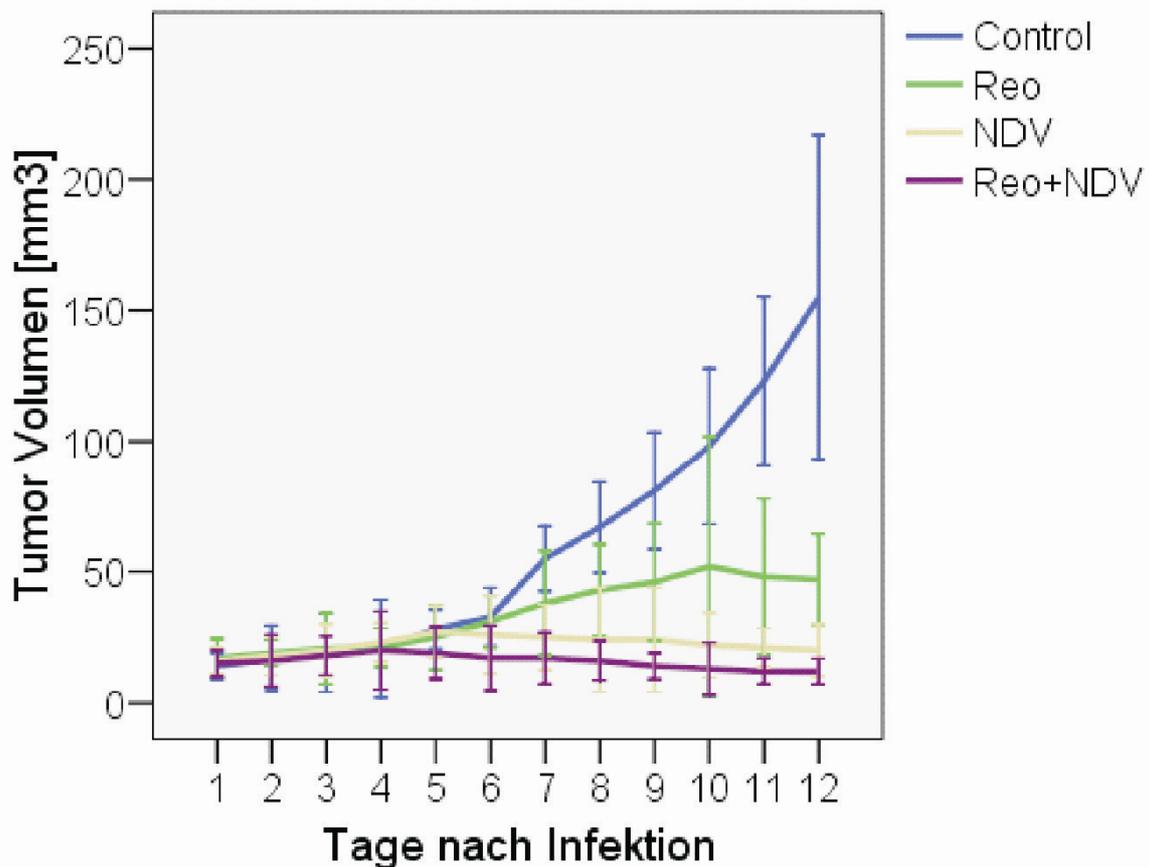


Abbildung 43 Entwicklung der Tumorgöße nach intratumoraler Applikation von Reovirus, NDV und der Kombination Reovirus plus NDV in subkutane Tumore.

SCID/NOD Mäuse. Mittelwerte mit 5%-Fehlerbalken.

Ergebnisse

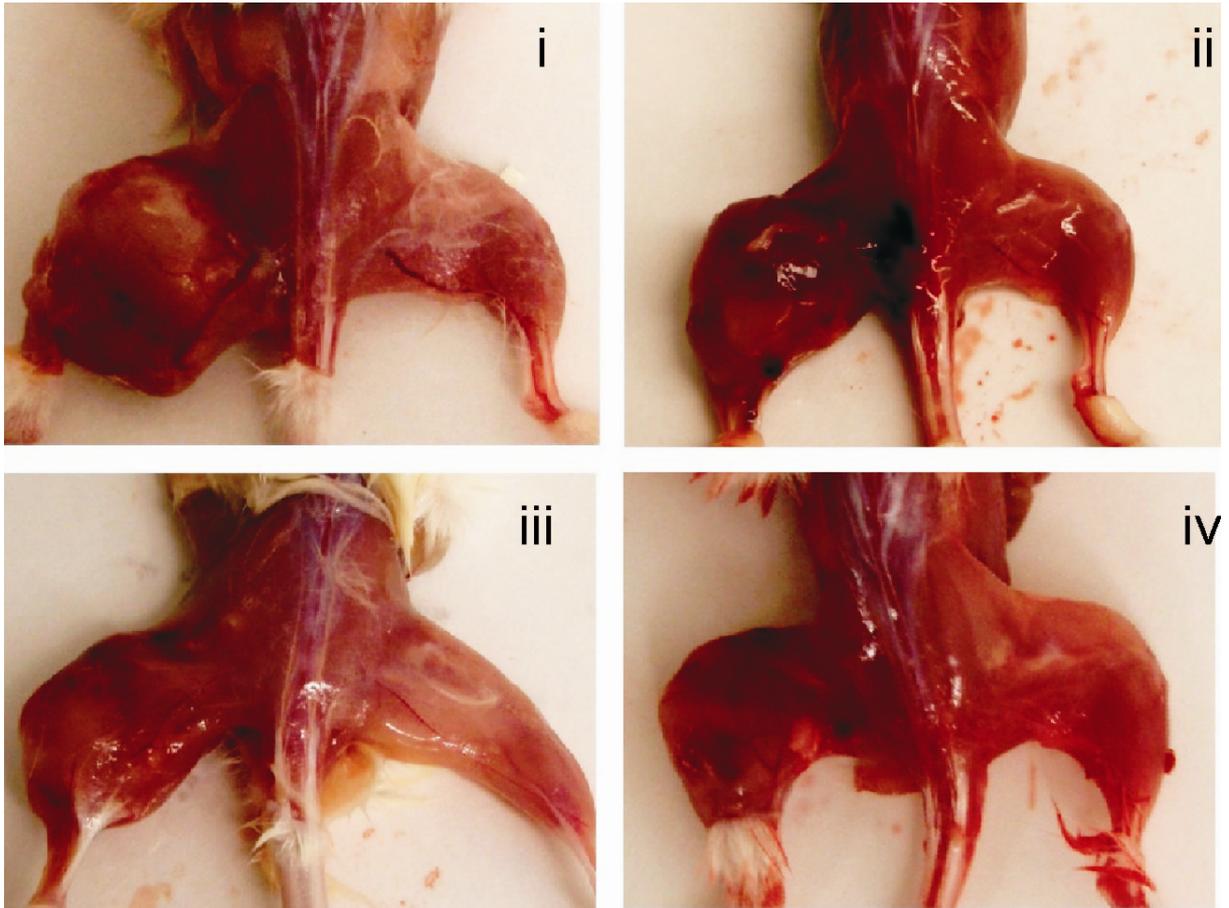


Abbildung 44 Entwicklung der TumorgroÙe nach intratumoralen Applikation von Reovirus, NDV und der Kombination Reovirus plus NDV in subkutane Tumore.

(i) Kontrollmäuse (PBS)
(iii) NDV

(ii) Reovirus
(iv) Reovirus plus NDV

Ergebnisse

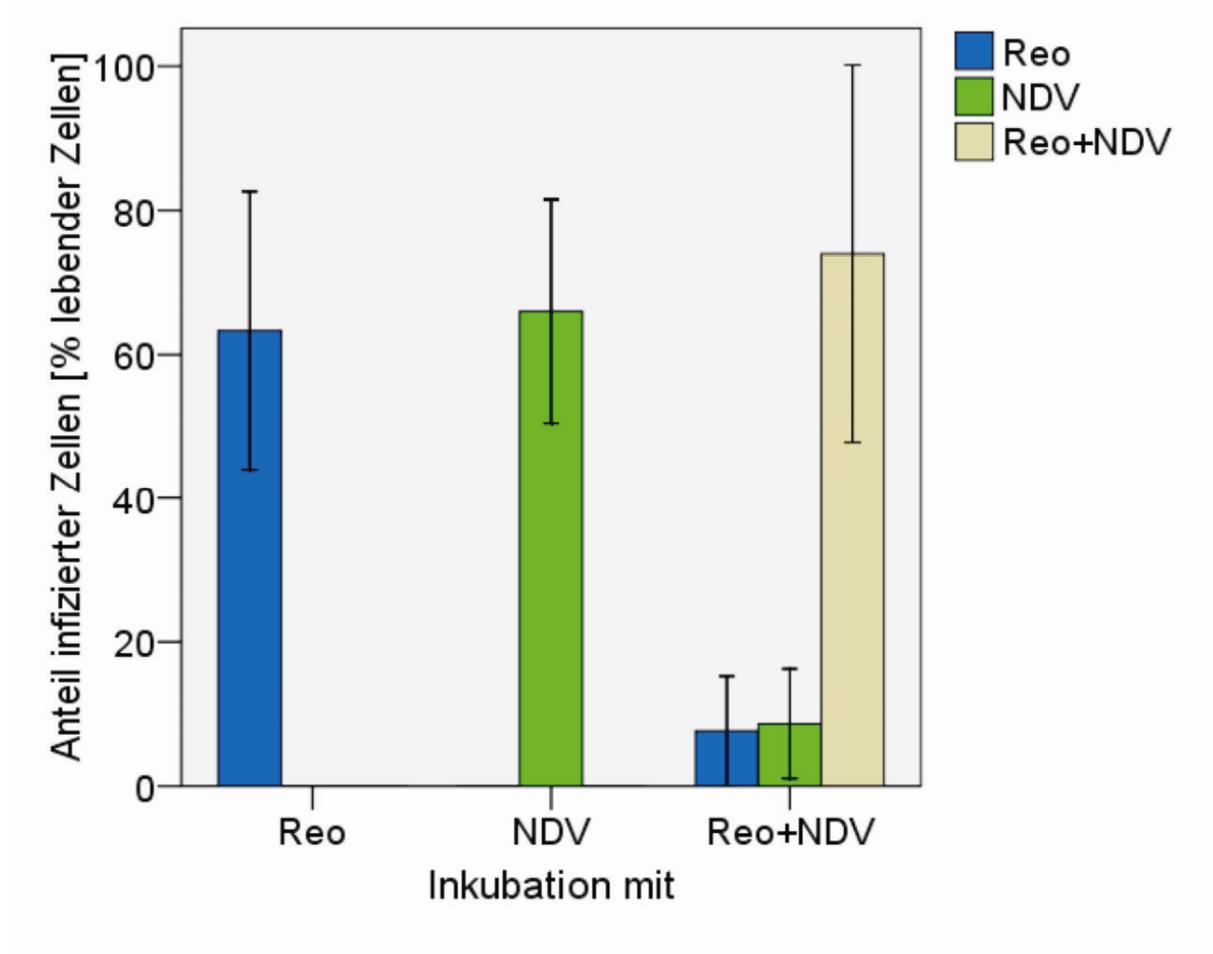


Abbildung 45 Messung des Anteils infizierter Tumorzellen nach Behandlung mit Reovirus, Reovirus plus NDV durch FACS-Analyse.

Anteil an Zellen, die nach Infektion mit Reovirus, Reovirus plus NDV ein bzw. zwei Viren replizieren (Quadrantenanalyse).

Ergebnisse

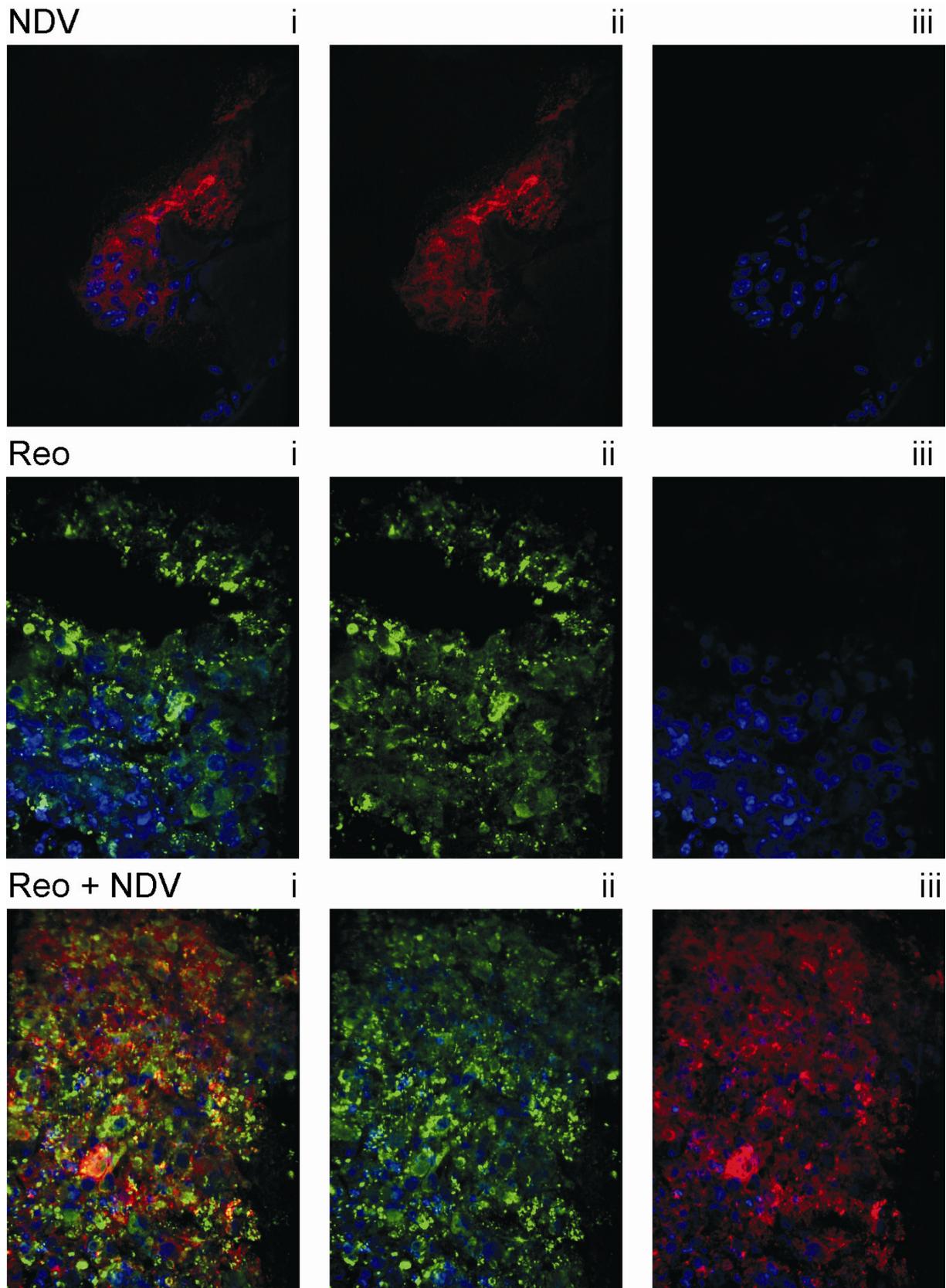


Abbildung 46 Anteil infizierter Zellen in Tumorgewebe mit Reovirus NDV oder Reovirus plus NDV behandelter Mäuse.

*NDV infiziert → NDV rot
Reovirus plus NDV infiziert → Reovirus grün, NDV rot
Vergrößerung 1:100*

*Reovirus infiziert → Reovirus grün
Kern in allen blau.*

Ergebnisse

Tabelle 17 Virustiter von Reovirus und NDV in Tumor Leber und Blut von SCID/NOD Mäusen nach Infektion mit Reovirus und NDV jeweils alleine und in Kombination.

| | | Virus-Titer [Kopien/ml] | Virus-Titer [Kopien/ml] |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Reo | NDV |
| Reovirus infizierte Mäuse | Tumor | $8,9 \cdot 10^9$ | |
| | Leber | $2,9 \cdot 10^8$ | |
| | But | $4,6 \cdot 10^6$ | |
| NDV infizierte Mäuse | Tumor | | $1,13 \cdot 10^6$ |
| | Leber | | - |
| | But | | - |
| Reo+NDV infizierte Mäuse | Tumor | $11,9 \cdot 10^9$ | $1,18 \cdot 10^6$ |
| | Leber | $1,9 \cdot 10^8$ | - |
| | But | $5,7 \cdot 10^6$ | - |

IV Diskussion

„Wie alles sich zum Ganzen webt, Eins in dem anderen wirkt und lebt“ Goethe

IV.1 Folgen einer monoviralen Infektion der Glioblastomzellen mit Reovirus, NDV und Parvovirus und Vergleich mit der Literatur

Die starke onkolytische Wirksamkeit von Reovirus, Parvovirus und NDV in Monotherapie konnte durch die hier durchgeführten Versuche erneut belegt werden. Hierbei ließ sich wie zuvor von Wilcox et al beschrieben¹³⁸, eine sehr starke onkolytische Wirksamkeit von Reovirus bei der primären Glioblastomzelllinie U87 nachweisen. Bei der sekundären Glioblastomzelllinie U373 war der onkolytische Effekt ebenfalls ausgeprägt, jedoch deutlich schwächer als bei U87. Es bestätigte sich die bekannte Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität von Reovirus von der initialen Infektionsdosis. Beim Vergleich der Viruskonzentrationen im Überstand infizierter Zellen, erkennt man bei der Zelllinie U373 in den ersten 48 h einen deutlich geringeren Anstieg als bei U87 Zellen. Die endgültige Titerkonzentration nach 72 h ist allerdings bei beiden Zelllinien fast identisch. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im Anteil infizierter Zellen zwischen U373 und U87. Es lässt sich allenfalls eine Tendenz zur besseren Infektiosität bei U373-Zellen nachweisen ($p = 0,47$). Der Grund für den langsameren Titer-Anstieg liegt vermutlich in den unterschiedlichen Tyrosinkinase-aktivierten Proliferationskaskaden beider Zelllinien. Bei U87-Zellen ist aktiviertes RAS auf eine gesteigerte EGFR-Amplifikation zurückzuführen und endet in der Aktivierung von MAPK. Bei U373-Zellen hingegen wird RAS über den Tyrosinkinaserzeptor PDGFR aktiviert und hat keinen nennenswerten Einfluss auf die MAP-Kinase¹³⁸. In einer ganzen Reihe von Arbeiten konnte eine starke Replikation in Zellen mit aktivierter MAPK nachgewiesen werden^{70, 141}. Der geringe Replikationsvorteil erklärt bei vergleichbarem Virustiter nicht das signifikant niedrigere Zellsterben in U373-Zellen nach Reovirusinfektion. Der Hauptgrund hierfür liegt vermutlich im defekten extrinsischen Apoptosesystem von U373-Zellen. Wie Choi et al zeigen konnten vermögen U373-Zellen keine Apoptose über den extrinsischen Weg zu induzieren³⁷. Genau dies ist jedoch der Hauptmechanismus, mit dem Reovirus in infizierten Zellen Apoptose und somit den Zelluntergang induziert⁷⁰. Dass dennoch eine Lyse von U373 stattfindet, belegen neuere Beobachtungen, die neben der extrinsischen Apoptose andere Mechanismen für den Zelluntergang Reovirus-infizierter Zellen verantwortlich machen^{70 142}. Kein signifikanter Unterschied in der onkolytischen

Diskussion

Wirksamkeit konnte nach Infektion von U87 oder U373 mit NDV gemessen werden. Wie bei Reovirus ließ sich auch hier eine direkte Abhängigkeit des Zellsterbens von der initial eingesetzten Infektionsdosis beobachten. Beide Zelllinien waren 72 h nach Behandlung mit NDV der Konzentration $MOI = 5$ PFU/Zelle fast vollständig infiziert und zeigten lichtmikroskopisch ähnliche morphologische Veränderungen. Anders als Reovirus benötigt NDV keine Tumor-spezifischen Faktoren um in Tumorzellen replizieren zu können. Die einzige Voraussetzung ist eine stark herabgesetzte intrazelluläre Immunität. In den Arbeiten von Schirmacher et al und Elankumaran konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche NDV Vermehrung nur in Zellen mit gestörter Aktivierung von Interferon erfolgen ⁹². Durch Überaktivierung von SOCS 3 vermögen die meisten Glioblastome die Aktivierung von STAT und somit die Produktion von Interferon- β suffizient zu inhibieren ¹⁴³. Weder ein Unterschied in der Anzahl infizierter Zellen noch in der Virusreplikation oder in der Onkolysestärke konnte zwischen den beiden Zelllinien nachgewiesen werden.

Das DNA-Virus Parvo H1 zeigt ebenfalls, wie schon zuvor bei verschiedenen anderen Glioblastomzelllinien nachgewiesen, eine ausgeprägte onkolytische Wirksamkeit bei beiden untersuchten Zelllinien. Ähnlich wie bei Reovirus zeigt sich hier ebenfalls eine signifikant stärkere zytotoxische Aktivität bei der Zelllinie U87. Die Abhängigkeit des Zellsterbens von der initial eingesetzten Virusdosis bei Glioblastomen konnte zuvor schon von Geletneky et al nachgewiesen werden und wurde hier von uns für die beiden Glioblastomzelllinien U87 und U373 bestätigt. Anders als nach Infektion mit Reovirus zeigt sich der Anteil an infizierten U373-Zellen nach Behandlung mit Parvovirus hier ebenfalls signifikant reduziert im Vergleich mit U87 infizierten Zellen. Bei signifikant niedrigerem Virustiter im Überstand infizierter U373-Zellen bei erniedrigter Infektionsrate kann geschlussfolgert werden, dass Parvovirus in U87 besser replizieren kann als in U87 Zellen. Wie in der Arbeit von Blum et al gezeigt werden konnte, befinden sich proliferierende U87-Zellen zu über 90 % in der G1/S-Phase; in derselben Arbeit wurde die erhöhte E2F Aktivität bei U87-Zellen beschrieben. Dagegen zeigen sich U373-Zellen in ihrer Zellzyklusverteilung eher asynchron ¹⁴⁴. Dementsprechend befinden sich mehr U87-Zellen in einem für Parvovirus H1 günstigen Zellzyklusabschnitt, was den erhöhten Anteil infizierter U87 Zellen erklären kann.

Zusammenfassend ließ sich eine gute bis sehr gute onkolytische Wirksamkeit der drei untersuchten Viren in den beiden Zelllinien U373 und U87 nachweisen.

IV.2 Folgen einer Infektion von Glioblastomzellen mit Reovirus plus NDV (Abbildung 47)

Eines der erstaunlichsten Ergebnisse dieser Arbeit ließ sich für die Kombination Reovirus plus NDV nachweisen. Hierbei zeigte sich bei beiden untersuchten Zelllinien eine deutliche Steigerung der onkolytischen Wirksamkeit. Um herauszufinden, ob es sich bei der gesteigerten Zytotoxizität nur um einen additiven Effekt handelte oder durch die Kombination ein synergistischer Mechanismus induziert wurde, erfolgte die Testung der Viruskombination in unterschiedlichen Infektionsdosen und die anschließende Signifikanz-Analyse mittels des Testverfahrens nach Chuo-Talalay. Eine sehr starke Signifikanz ließ sich für sämtliche Konzentrationen nachweisen. Reovirus und NDV, jeweils in 10-fach geringerer Konzentration eingesetzt, genügten, um eine stärkere onkolytische Wirkung zu bewirken als die Infektion mit den Ausgangskonzentrationen (MOI=5 und MOI=0,5 PFU/Zellen). Die Ergebnisse in beiden Zelllinien waren dabei ähnlich, dennoch war der absolute Anteil abgestorbener Zellen in U87-Zellen ausgeprägter als bei U373-Zellen. Im nächsten Schritt galt es zu klären, ob der beobachtete Synergismus Folge einer intrazellulären oder extrazellulären Zusammenarbeit der Viren war. Durch Immunfluoreszenzanalysen konnten wir nachweisen, dass der verstärkte Tumorzerfall nicht etwa durch Infektion verschiedener Zellpopulationen innerhalb derselben Zelllinie zustande kam, sondern durch eine Doppelinfektion der Zellen mit Reovirus und NDV. Die gemeinsame Applikation von Reovirus und NDV führte zu einer fast vollständigen Doppelinfektion aller Glioblastomzellen. Dies ist insofern sehr interessant, als unseres Wissens zuvor noch keine Untersuchung zur kombinierten Infektion von Tumorzellen mit zwei verschiedenen Virenarten durchgeführt wurde.

Um die Frage zu klären, ob die gemeinsame Replikation von Reovirus mit NDV in derselben Zelle zu einer Veränderung der zellulären Virusproduktion führt, wurde die Entwicklung der Viruslast im Zellüberstand über einen Zeitraum von 72h beobachtet.

Diskussion

Die Viruslast von Reovirus als auch von NDV nach kombinierter Infektion unterscheidet sich weder zu den unterschiedlichen untersuchten Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h), noch in den verschiedenen eingesetzten Konzentrationen ($MOI=0,005-5$) von der nach Infektion mit einem Virus alleine. Die Replikation der einzelnen Viren wird somit nach einer Doppelinfektion mit Reovirus plus NDV nicht beeinträchtigt, allerdings trat auch keine Induktion des Replikationsvermögens eines der Viren durch die gemeinsame intrazelluläre Lokalisation mit dem anderen Virus auf. Da bei gleicher Konzentration nach Doppelinfektion ein bedeutend stärkeres Zellsterben eintrat, muss die gleichzeitige Replikation der Viren in derselben Tumorzelle intrazellulär die Förderung zytotoxischer Prozesse initiiert haben. Welche Mechanismen das sind, ist noch völlig unklar. Mehrere Möglichkeiten kommen hierbei in Frage. Beispielsweise könnte eine Kombination von Reovirus und NDV zu einer Verstärkung der zellulären Apoptose führen. Soweit bisher bekannt induziert Reovirus den TRAIL-Rezeptor des extrinsischen Apoptosewegs, NDV hingegen bewirkt eine Aktivierung von Caspase-3 über den intrinsischen Apoptoseweg. Eine Verstärkung des Zellsterbens ist durch gleichzeitige Aktivierung des intrinsischen und des extrinsischen Apoptosewegs in Leukämiezellen beschrieben¹⁴⁵. Ein Synergismus infolge einer verbesserten Apoptose wird auch für die Kombination von verschiedenen Chemotherapeutika und Strahlentherapien mit Reovirus vermutet. Sowohl Reovirus als auch NDV nutzen für ihre Vermehrung Defekte in der Interferonantwort von Tumorzellen aus. Hierbei ist die RAS-Überaktivierung in Malignomzellen für das Reovirus von entscheidender Bedeutung. Über einen noch nicht ganz geklärten Signaltransduktionsweg ist Ras in der Lage PKR zu hemmen (Abbildung 6). Bei PKR handelt es sich um einen der wichtigsten Antwortmechanismen des Interferons, mit dem die Zelle die Translation von Virusproteinen hemmen kann (eIF2a-Inhibitor). Die Bekämpfung von virusinfizierten Zellen durch Erkennung von ssRNA mittels IRF3 und IRF7 und IRF9 ist v.a. bei ssRNA Viren (wie beispielsweise NDV) wirksam (Abbildung 7). Studien haben gezeigt, dass nach Eindringen der dsRNA des Reovirus es hauptsächlich zur PKR-Induktion kommt. Das Reovirusprotein sigma1 ist in der Lage PKR schwach zu hemmen. Da im Rahmen der ausgeprägten Interferonaktivierung nach NDV-Infektion ebenfalls die Konzentration von PKR ansteigt, könnte durch das Reovirusprotein Sigma1 eine Infektion mit NDV begünstigen. Ebenfalls günstig auf eine NDV-Infektion könnte sich das Reovirusprotein $\mu 2$ auswirken. Aktuelle Publikationen haben bei einigen Reovirus-Stämmen eine hemmende Wirkung auf IRF9 zeigen können. Da sich eine Hemmung von IRF9 durch Inaktivierung der

Diskussion

Interferonantwort positiv auf eine Infektion mit NDV auswirkt ¹⁴⁶, könnte dies die Doppelinfektion von Zellen, die bereits Reovirus replizieren, beschleunigen.

Daneben ist $\mu 2$ zusammen mit μNS ein wichtiges Protein für die Umstrukturierung des Zytoskeletts der befallenen Zellen nach Reovirusinfektion (Abbildung 6). Es bindet an mikrotubuläre Strukturen, und induziert so die Ausbildung des Viroplasmas. Eine Hemmung von $\mu 2$ führt zu einer Replikationshemmung von Reovirus. Es konnte gezeigt werden, dass $\mu 2$ ebenfalls an ssRNA- sowie dsRNA-Molekülen bindet, vermutlich um eine Konzentrierung des frisch replizierten Virusgenoms im Viroplasma zu bewirken. Natürlich ist auch das NDV zur erfolgreichen Virusexpression auf ein funktionierendes mikrotubuläres System angewiesen. Die Synthese der Virusproteine erfolgt über das ER mit anschließender Ausschleusung über ER-Vesikel. Die Koordinierung des Vesikeltransports läuft über das tubuläre Zytoskelett ab. Wie man in Abbildung 40 sehen kann, erfolgt durch das Reovirus eine deutliche Umstrukturierung dieses zytoskelettalen Systems. Dadurch kommt es allerdings zu keiner Beeinträchtigung der NDV-Produktion, es ist sogar durchaus vorstellbar, dass die ssRNA-bindende Wirkung von $\mu 2$ auch einen vorteilhaften Effekt für die Replikation von NDV besitzt.

Im Mausversuch konnte der in vitro gesehene synergistische Effekt der Viren Reo und NDV bestätigt werden. Die Mäuse, die beide Viren gemeinsam appliziert bekamen, entwickelten die kleinsten Tumore nach 12 Tagen. Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz zu den in vitro Studien infolge der Doppelinfektion nach 12 Tagen nicht nur ein deutlich stärkeres Absterben des Tumors verglichen mit monoviral behandelten Tumoren, sondern auch eine deutliche Erhöhung des Gesamtanteils an Reovirus- bzw. NDV-infizierten Tumorzellen im Tumorrestgewebe. Die Reoviruskonzentration im verbliebenen Tumor nach Kombinationsbehandlung war ca. doppelt so hoch wie in Tumoren, die lediglich mit Reovirus therapiert wurden. Bei NDV hingegen stieg die Viruskonzentration pro Gramm infiziertes Gewebe nur unwesentlich an und lag in einem sehr niedrigen Bereich. Anders als im Zellversuch führte hier also die Infektion mit zwei Viren nicht nur zu einem verstärkten Zellsterben der Zellen, es beeinflusste auch die Viruskinetik, v.a. von Reovirus. Sowohl für Reovirus als auch für NDV ist neben der onkolytischen Wirksamkeit durch direkte Zelllyse eine onkolytische Wirkung in vivo durch Aktivierung des spezifischen Immunsystems beschrieben. Mit Reovirus oder NDV infizierte Tumorzellen können besser durch dendritische Zellen erkannt und zerstört werden.

Diskussion

Um diesen Effekt nicht mit berücksichtigen zu müssen, wurden immuninkompetente SCID/NOD-Mäuse für unsere Versuche verwendet. Wie in vitro zuvor gezeigt führt die Doppelinfektion mit NDV plus Reovirus zu einem drastischeren Zelluntergang als nach Infektion mit nur Reovirus oder NDV alleine (Abbildung 43). Durch das schnellere Zellsterben kann Virus frühzeitiger als bei monoviral infizierten Zellen freigesetzt werden, was wiederum zu einer rascheren Infektion des umliegenden Tumorgewebes führt. Somit führt die Doppelinfektion mit Reovirus und NDV nicht durch direkte gegenseitige Einflussnahme der beiden Viren zu einem Konzentrationsanstieg der Viren. Vielmehr entsteht durch die raschere Virusfreisetzung für die entsprechenden Viren ein Replikationsvorteil, der zur Erhöhung der Rate infizierter Zellen und des Virustiters führt. Die Konzentration an NDV in monoviral oder kombiniert behandelten Tumoren war im Vergleich mit den Konzentrationen der in vitro Versuche äußerst niedrig. Ein Unterschied zwischen monoviral und kombiniert infizierten Zellen konnte nicht gefunden werden. Die niedrige Konzentration hängt mit dem verwendeten lentogenen Newcastle Disease Virusstamm zusammen; im Tumor produzierte Nachkommenviren sind hierbei nicht in der Lage, weitere Tumorzellen zu infizieren und zu zerstören. Deshalb erfolgte die intratumorale Virusapplikation nicht einmalig, sondern verteilt über drei Tage.

Eine vollständige Infektion des Tumors wurde weder nach Monoinfektion mit Reovirus noch mit NDV gesehen. Vor allem mit Reovirus oder NDV alleine infizierte Viren zeigten eine Clusterartige Verteilung infizierter Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass sich hauptsächlich im Bereich des Einstichkanals eine Infektionsstraße gebildet hat. Infolge des stärkeren Absterbens doppelinfizierter Zellen kommt es zu einer schnelleren Infektion des benachbarten Tumorgewebes und zu einem besseren Fortschreiten des Tumorsterbens. Hierdurch verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Tumorpheriferation und Tumorlyse zugunsten der Tumorlyse.

Ein weiteres wesentliches Ziel der Mausversuche war es, mögliche unvorhergesehene Nebenwirkungen auf gesundes Mausgewebe durch eine Doppelinfektion mit Reovirus und NDV zu erfassen. Klinisch konnten weder bei einzeln infizierten noch bei doppelinfizierten Tieren während der 12-tägigen Episode pathologische Symptome beobachtet werden. Bei SCID-Mäusen sind nach Behandlung mit Reovirus Erkrankungen des neuronalen Systems beschrieben. Die als „acute flaccid paralysis“ bezeichnete Erkrankung ist die Folge eines

Diskussion

reoviralen Befalls des 2. Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks und tritt erst in der zweiten bis dritten Woche nach Infektion auf¹⁴⁷. Da die Beobachtungsperiode unserer Versuche unter zwei Wochen lag, kann über eine eventuelle neuronale Beteiligung keine Aussage getroffen werden.

Zusätzlich zu klinischen Verhaltensauffälligkeiten wurde der direkte Einfluss einer kombinierten Infektion auf das übrige Mausegewebe untersucht. Die selektive Virusreplikation in Tumorzellen kann schon anhand der immunhistologisch untersuchten Tumorschnitte gesehen werden. Wie in Abbildung 45 erkennbar, ist das den Tumor umliegende gesunde Gewebe virusfrei - unabhängig davon, ob Reovirus alleine oder in Kombination eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse decken sich mit zuvor schon von Wilcox et al für Reovirus durchgeführten Mausversuchen und von¹³⁹ durchgeführten Versuchen mit NDV. Um die Replikation der Viren auch in anderen, vom Tumor weiter entfernten Geweben zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Viruslast von Reovirus und NDV in Leber und Blut. Reovirus ließ sich hierbei in Leber und Blut aller mit diesem Virus behandelten Mäusen nachweisen. Obwohl die Titerkonzentration des Tumorgewebes von kombiniert infizierten Mäusen ca. doppelt so hoch war als die monoviral behandelte Mäuse, konnte in Leber und Blut kein Unterschied zwischen beiden Gruppen gefunden werden. Ob das intrahepatisch nachgewiesene Reovirus durch die bevorzugte Aufnahme spezifischer Immunzellen im Rahmen der Eliminierung (beispielsweise Kupfer-Zellen) oder durch einen Befall hepatischer Funktionszellen zustande kommt, muss noch geklärt werden. Eine Beeinflussung durch eine Koinfektion mit NDV scheint allerdings nicht zu erfolgen. NDV konnte weder in Leber noch im Blut behandelte Mäuse nachgewiesen werden.

Diskussion

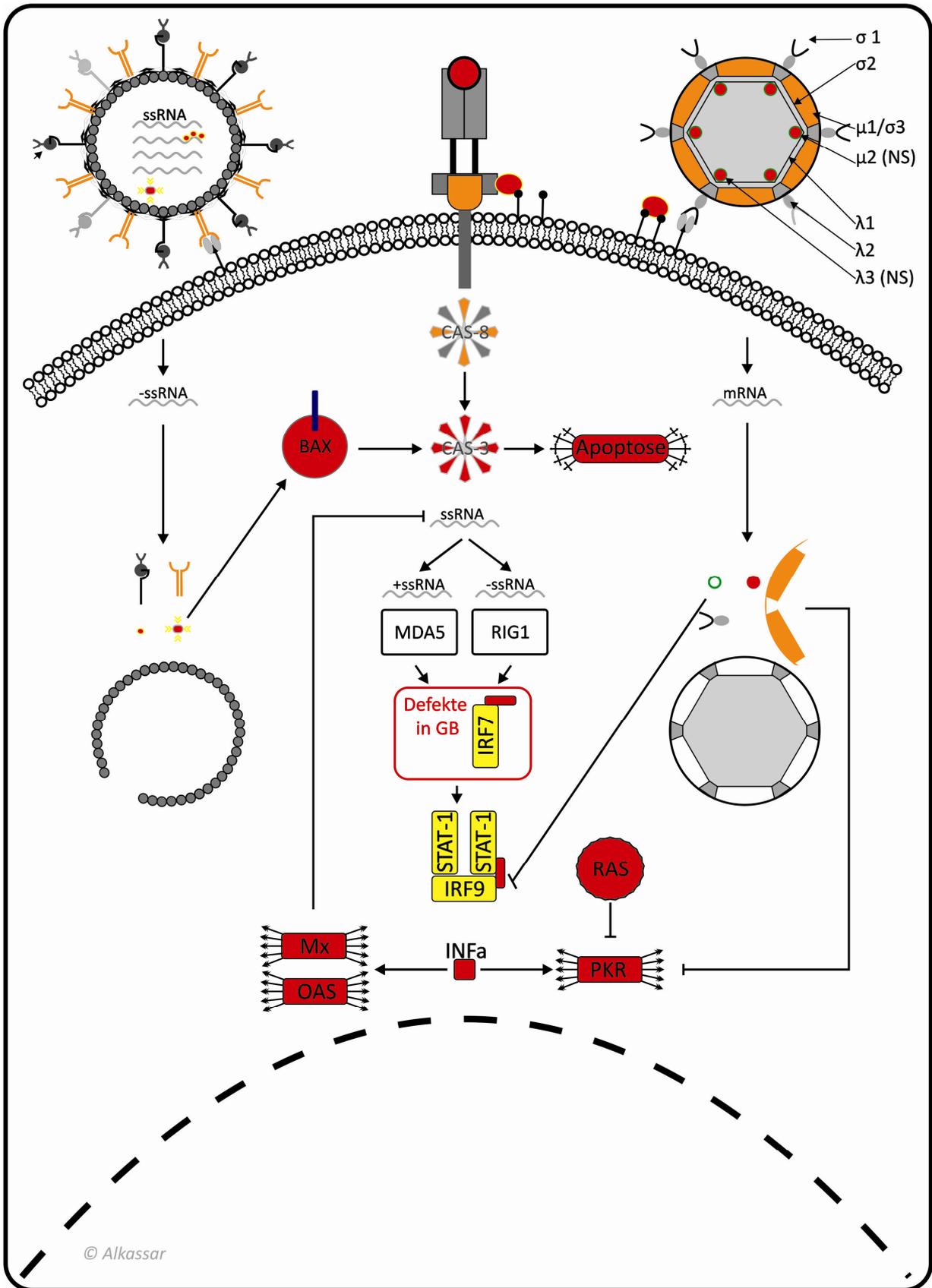


Abbildung 47: Beeinflussung der Apoptose durch kombinierte Infektion von Reovirus plus NDV

IV.3 Folgen einer Infektion von Glioblastomzellen mit Reovirus plus Parvov. (Abbildung 48)

Die Kombination von Reovirus und Parvovirus führt ebenfalls zu einer verbesserten Onkolyse in beiden untersuchten Zelllinien. Anders als nach Kombination mit NDV, in der die Virustiter der beiden Viren unbeeinflusst bleiben, bewirkt die Kombination von Reovirus plus Parvovirus eine Erhöhung des Gesamtanteils an Zellen mit parvoviraler Replikation. Der Anteil Reovirus-infizierter Zellen hingegen bleibt unverändert. Ein Grund hierfür könnte in der Beeinflussung des Zellzyklus durch Reovirus zu finden sein. Schon 1969 konnte beobachtet werden, dass Zellen, die mit Reovirus infiziert waren, eine Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase herbeiführten¹⁴⁸. In späteren Untersuchungen fand man heraus, dass das Reovirusprotein Sigma 1 vermutlich durch Hemmung des Zellzyklusregulators CDC2 eine Arretierung in der S-Phase des Zellzyklus bewirkt¹⁴⁹. Die Arbeiten von Poggioli zeigten allerdings auch eine Arretierung infizierter Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus¹⁵⁰. Abhängig von den zu infizierenden Zellen und vom verwendeten Virustyp können Reoviren infizierte Zellen bevorzugt in der S-Phase oder in der G2/M-Phase arretieren. Einer der Hauptfaktoren zur erfolgreichen Replikation von Parvovirus H1 ist eine Zellarretierung in der in der frühen S-Phase des Zellzyklus. Essentielle Zellfaktoren, die für eine erfolgreiche zelluläre Gegenstrangsynthese in der S-Phase benötigt werden und durch E2F induziert werden, benötigt das Parvovirus H1 zur eigenen Replikation (Abbildung 8).

Untersuchungen zur Auswirkungen der Reovirusinfektion auf den Zellzyklus bei Glioblastomzellen und insbesondere bei den uns verwendeten Zelllinien sind uns nicht bekannt. Sollte die Infektion von Glioblastomzellen mit Reovirus eine Arretierung des Zellzyklus in der frühen S-Phase bewirken, so begründet das zum einen den gesteigerten Anteil von mit Parvovirus infizierten Zellen in beiden Zelllinien. Zum anderen lässt sich damit auch die Angleichung des Infektionsmusters zwischen U373 und U87 erklären. Vor der kombinierten Infektion zeigten sich U87-Zellen deutlich sensitiver für eine Infektion mit Parvovirus als U373-Zellen (Tabelle 11). Die höhere Infektionsrate durch Kombination mit Reovirus kann auch durch einen signifikanten Anstieg des Virustiters von Parvovirus in beiden Zelllinien gemessen werden (Abbildung 39). Somit trägt der Anstieg infizierter Zellen durch die kombinierte Behandlung mit Reovirus plus Parvovirus, im Gegensatz zur Kombination Reovirus plus NDV, aktiv zur Ausbildung der synergistischen Verstärkung des Zellsterbens behandelter U87 und U373-Zellen bei. Allerdings trägt wahrscheinlich auch bei dieser Kombination die Aktivierung unterschiedlicher zelltoxischer Mechanismen durch zwei

Diskussion

verschiedene Viren wesentlich zum verstärkten Zellsterben bei. Parvovirus nutzt andere Verfahren als Reovirus, um den Zelltod infizierter Zellen zu induzieren. Obwohl der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist, scheinen sowohl eine direkte Zellzerstörung durch Nekrose als auch eine Aktivierung der Apoptose durch BAX und somit der intrinsischen Apoptose mit Parvovirus infizierte Tumorzellen zu zerstören. Wie schon zuvor ausführlich besprochen bevorzugt Reovirus, infizierte Zellen durch Aktivierung der extrinsischen Apoptose zu töten.

Parvovirus ist wie Reovirus und NDV auf das tubuläre System des Zytoskeletts angewiesen, anders als das NDV benötigt es ein funktionierendes tubuläres System, um von der Oberfläche in den Kern gelangen zu können. Trotz der Umstrukturierung durch das Reovirus scheint eine gemeinsame Replikation mit Parvovirus in einer infizierten Zelle ohne weiteres möglich. Nicht verwunderlich ist auch hier die stärkere Onkolyse der Zelllinie U87 nach Infektion mit Reo- und Parvovirus.

Diskussion

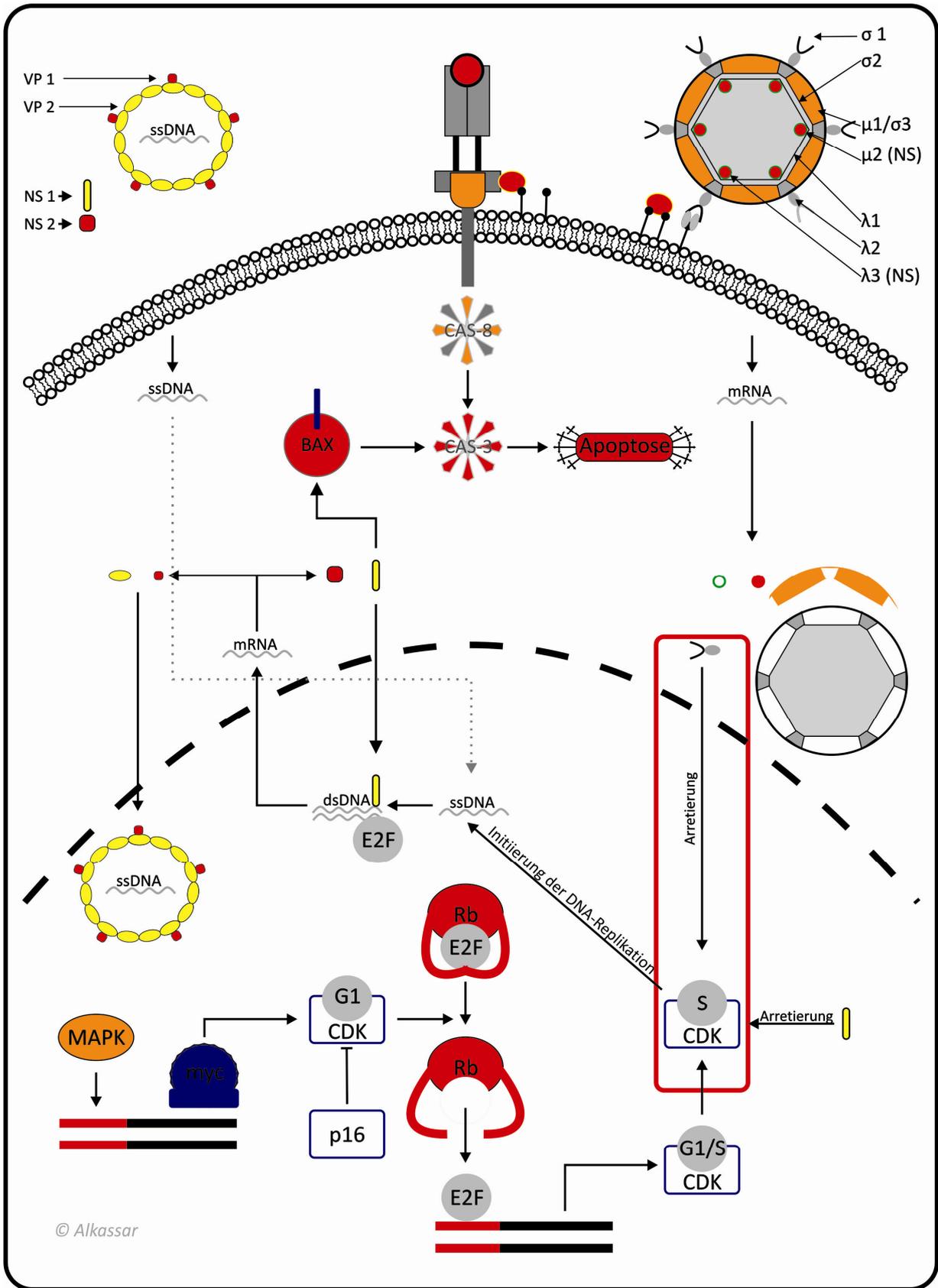


Abbildung 48: Auswirkungen einer Kombination von Reovirus plus Parvovirus

IV.1.4 Folgen einer Infektion von Glioblastomzellen mit Parvovirus plus NDV

Eine Hemmung der parvoviralen Replikation konnte durch eine gleichzeitige Infektion mit NDV bewirkt werden. Die Kombination NDV plus Parvovirus hatte in beiden Zelllinien lediglich einen geringen Einfluss auf die Anzahl mit NDV infizierter Zellen sowie die virale Virusfreisetzung. Allerdings konnte eine drastische Reduktion mit Parvovirus infizierter Glioblastomzellen gesehen werden. Dementsprechend passend ist der Abfall des Parvovirus-Titers. Da dieses Phänomen sowohl bei U87 als auch bei U373 gesehen werden konnte, scheint prinzipiell die Infektion von NDV eine Koinfektion derselben Zelle mit Parvovirus zu verhindern. Wie dies zustande kommt, ist noch völlig ungeklärt. Allerdings zeigen aktuelle Studien von Wan et al ¹⁵¹, dass eine Infektion mit NDV zu einer deutlichen Reduzierung an Zellen in der S-Phase führt. Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben ist Parvovirus hingegen, um erfolgreich replizieren zu können, auf aktivierte Faktoren aus der S-Phase angewiesen. Daraus folgt in umgekehrter Schlussfolgerung zur Kombination Reovirus plus Parvovirus eine Verringerung parvoviraler Replikationsfähigkeit in NDV-infizierten Zellen.

IV.1.5 Zusammenfassung/Ausblick

Diese Arbeit ist unseres Wissens die erste wissenschaftliche Untersuchung, die die Auswirkungen einer kombinierten Infektion von Tumorzellen mit zwei unterschiedlichen onkolytischen Viren beschreibt. Wegen der ausgeprägten Heterogenität seiner Defekte und seiner starken Fähigkeit zur Entwicklung von Therapie-Resistenzen wurde das Glioblastom zur Erforschung der Kombinationstherapien verwendet.

Die Kombinationen Reovirus plus NDV und Reovirus plus Parvovirus führten zu einer signifikanten Verstärkung ihrer zytotoxischen Wirksamkeit in den Glioblastomzellen U87 und U373. Wir konnten nachweisen, dass es sich bei beiden Kombinationen um einen synergistischen und nicht etwa additiven Effekt handelte. Dabei ließ sich zeigen, dass die gesteigerte Zelllyse durch die Kombination Reovirus plus NDV auf eine intrazelluläre Interaktion zurückzuführen ist, und wir haben postuliert, dass die Induktion unterschiedlicher Apoptosewege ausschlaggebend für diese Steigerung ist. Ähnliche Ergebnisse waren schon zuvor für Leukämiezellen nach Co-Aktivierung der intrinsischen und extrinsischen Apoptose beschrieben worden. Durch die Kombination Reovirus plus Parvovirus ließ sich hingegen die Rate an mit Parvovirus infizierten Zellen signifikant steigern. Hier trägt wahrscheinlich der Anstieg des Anteils Parvovirus-infizierter Zellen entscheidend zum erhöhten Zellsterben bei. Dennoch ist anzunehmen, dass auch bei dieser Kombination die gemeinsame Aktivierung von zwei unterschiedlichen zytotoxischen Mechanismen ausschlaggebend ist für das verstärkte Tumorsterben.

Es konnten somit gleich zwei Kombinationen onkolytischer Viren ausfindig gemacht werden, die in der Therapie des Glioblastoms sehr erfolgversprechend sind. Wie einleitend dargestellt, war es weder durch Einsatz von konservativen Therapien noch durch Einsatz von onkolytischen Viren in Monotherapie gelungen, Resistenzen zu vermeiden. Ausgangspunkt resistenter Zellen sind sogenannte Tumorstammzellen, die v.a. Gegenmechanismen zur Chemotherapie- bzw. Radiotherapie-induzierten Apoptose entwickeln. Obwohl onkolytische Viren durchaus auch Tumorstammzellen erfolgreich infizieren und zerstören können, entwickeln sich virenresistente Tumorzellen. Bei der Suche nach geeigneten Kombinationen zur Erschwerung der Resistenzbildung müssen Therapeutika, die auf unterschiedliche Angriffspunkte abzielen, kombiniert werden. Wegen der sehr verschiedenen Tumorerkennungsmechanismen der einzelnen Viren, die meist auf der Überexpression

Diskussion

weniger tumorspezifischer Faktoren beruhen, bieten sich diese als ideale Agenzien für eine Kombinationstherapie an. Dies wird unterstützt durch die ausgeprägte Vielzahl an überexprimierten Faktoren infolge von Defekten in unterschiedlichen Zellinstanzen von Glioblastomzellen. Unser Ziel war es, den Vorteil mindestens einer Viruskombination in der Therapie des Glioblastoms nachzuweisen. Hierfür gilt es einerseits die Verbesserung der Tumorlyse als auch andererseits die langfristige Vermeidung einer Resistenz nachzuweisen.

In unseren Versuchen konnten wir zwei Kombinationen onkolytischer Viren ausfindig machen, die in der Lage sind, die tumorderstrierende Wirkung ihrer einzelnen Viren vielfach zu verstärken.

Dies konnte allerdings auch schon in ähnlicher Form für Kombinationen onkolytischer Viren mit Chemotherapeutika oder Strahlentherapie nachgewiesen werden. Eine Vermeidung von Resistenzen wird allerdings durch eine Kombination, die nicht auf eine gezielte Erkennung mehrerer tumorspezifischer Faktoren gleichzeitig abzielt, nicht möglich sein. Aufgabe kommender Untersuchungen wird es sein, den Nutzen beider Kombinationen für die langfristige Vermeidbarkeit von Resistenzen zu eruieren. Die prinzipielle Wirksamkeit in primären und sekundären Glioblastomen wurde durch Erfolge der Kombinationsversuche in den beiden Zelllinien U87 und U373 gezeigt. Eine weitere Therapietestung in primären Zelllinien sollte zur Untermauerung dieser Ergebnisse durchgeführt werden.

Es handelt sich unserer Ansicht nach um eine vielversprechende neue Therapieoption, die künftig möglicherweise zur Heilung eines heute noch unheilbaren Tumors beitragen könnte.

Referenzen/Literatur

1. Denysenko, T. et al. Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies. *Cell Biochem Funct* **28**, 343-51.
2. Louis, D.N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109 (2007).
3. Benjamin, R., Capparella, J. & Brown, A. Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics. *Cancer J* **9**, 82-90 (2003).
4. Blumenthal, D.T. & Schulman, S.F. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother* **5**, 683-90 (2005).
5. Krex, D. et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* **130**, 2596-606 (2007).
6. Rickert, C.H. et al. Pediatric high-grade astrocytomas show chromosomal imbalances distinct from adult cases. *Am J Pathol* **158**, 1525-32 (2001).
7. Bleau, A.M., Huse, J.T. & Holland, E.C. The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle* **8**, 2936-44 (2009).
8. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67 (1990).
9. Adhikary, S. & Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 635-45 (2005).
10. Pavletich, N.P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-8 (1999).
11. Bell, S.P. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**, 333-74 (2002).
12. Conlon, I. & Raff, M. Size control in animal development. *Cell* **96**, 235-44 (1999).
13. Ciuffreda, L., Di Sanza, C., Incani, U.C. & Milella, M. The mTOR pathway: a new target in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **10**, 484-95.
14. Abounader, R. Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **9**, 235-45 (2009).

Referenzen

15. Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-31 (1997).
16. Vousden, K.H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604 (2002).
17. Harrison, J.C. & Haber, J.E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* **40**, 209-35 (2006).
18. Chiarugi, V. & Ruggiero, M. Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process. *Tumori* **82**, 205-9 (1996).
19. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-36 (1995).
20. Holland, E.C. Brain tumor animal models: importance and progress. *Curr Opin Oncol* **13**, 143-7 (2001).
21. Yamasaki, L. & Pagano, M. Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 623-8 (2004).
22. Watanabe, K. et al. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* **6**, 217-23; discussion 23-4 (1996).
23. Humphrey, P.A. et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4207-11 (1990).
24. Bigner, S.H. et al. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* **50**, 8017-22 (1990).
25. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-9 (1997).
26. Jiang, B.H., Aoki, M., Zheng, J.Z., Li, J. & Vogt, P.K. Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2077-81 (1999).
27. Furnari, F.B., Lin, H., Huang, H.S. & Cavenee, W.K. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12479-84 (1997).

Referenzen

28. Steck, P.A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-62 (1997).
29. Plate, K.H., Breier, G., Farrell, C.L. & Risau, W. Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Lab Invest* **67**, 529-34 (1992).
30. Fulci, G., Ishii, N. & Van Meir, E.G. p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* **8**, 599-613 (1998).
31. Brat, D.J. & Van Meir, E.G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* **84**, 397-405 (2004).
32. Pieper, R.O. Defined human cellular systems in the study of glioma development. *Front Biosci* **8**, s19-27 (2003).
33. Mishima, K. et al. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res* **61**, 5349-54 (2001).
34. Li, J.Y. et al. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase correlates with histologic grade and EGFR expression in diffuse gliomas. *J Neurooncol* **88**, 11-7 (2008).
35. Gomez-Manzano, C. et al. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res* **56**, 694-9 (1996).
36. Jaganathan, J., Petit, J.H., Lazio, B.E., Singh, S.K. & Chin, L.S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in established and primary glioma cell lines. *Neurosurg Focus* **13**, ecp1 (2002).
37. Choi, C., Jeong, E. & Benveniste, E.N. Caspase-1 mediates Fas-induced apoptosis and is up-regulated by interferon-gamma in human astrocytoma cells. *J Neurooncol* **67**, 167-76 (2004).
38. Meijer, D.H., Maguire, C.A., LeRoy, S.G. & Sena-Esteves, M. Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN-beta. *Cancer Gene Ther* **16**, 664-71 (2009).
39. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. & Roos, W.P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* **6**, 1079-99 (2007).

Referenzen

40. Inciura, A. & Juozaityte, E. [Concomitant chemo-radiation treatment of malignant tumors: biological bases]. *Medicina (Kaunas)* **38**, 1042-9; quiz 1051 (2002).
41. Krakstad, C. & Chekenya, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* **9**, 135.
42. Hamburger, A.W. & Salmon, S.E. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**, 461-3 (1977).
43. Barber, G.N. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* **8**, 113-26 (2001).
44. Malmgaard, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 439-54 (2004).
45. Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 425-33 (2007).
46. Grimm, D. et al. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6806-11 (2007).
47. Gantier, M.P. & Williams, B.R. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 363-71 (2007).
48. Jacobs, B.L. & Langland, J.O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-49 (1996).
49. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents (2001).
50. Olofsson, S. & Bergstrom, T. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann Med* **37**, 154-72 (2005).
51. Morrison, T.G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 73-84 (2003).
52. Brown, K.E., Anderson, S.M. & Young, N.S. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-7 (1993).
53. Espert, L., Gongora, C. & Mechti, N. [Interferon : antiviral mechanisms and viral escape]. *Bull Cancer* **90**, 131-41 (2003).
54. Zwiebel, J.A. Cancer gene and oncolytic virus therapy. *Semin Oncol* **28**, 336-43 (2001).

Referenzen

55. Roberts, M.S., Lorence, R.M., Groene, W.S. & Bamat, M.K. Naturally oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther* **8**, 314-21 (2006).
56. Rosen, L., Hovis, J.F., Mastrotta, F.M., Bell, J.A. & Huebner, R.J. Observations on a newly recognized virus (Abney) of the reovirus family. *Am J Hyg* **71**, 258-65 (1960).
57. Urbano, P. & Urbano, F.G. The Reoviridae family. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **17**, 151-61 (1994).
58. Xu, P., Miller, S.E. & Joklik, W.K. Generation of reovirus core-like particles in cells infected with hybrid vaccinia viruses that express genome segments L1, L2, L3, and S2. *Virology* **197**, 726-31 (1993).
59. Joklik, W.K. Virus synthesis and replication: reovirus vs. vaccinia virus. *Yale J Biol Med* **53**, 27-39 (1980).
60. Schiff, L.A. Reovirus capsid proteins sigma 3 and mu 1: interactions that influence viral entry, assembly, and translational control. *Curr Top Microbiol Immunol* **233**, 167-83 (1998).
61. Alain, T. et al. The oncolytic effect in vivo of reovirus on tumour cells that have survived reovirus cell killing in vitro. *Br J Cancer* **95**, 1020-7 (2006).
62. Joklik, W.K. & Roner, M.R. Molecular recognition in the assembly of the segmented reovirus genome. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **53**, 249-81 (1996).
63. Taraporewala, Z.F. & Patton, J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* **101**, 57-66 (2004).
64. Wehrfritz, J.M., Boyce, M., Mirza, S. & Roy, P. Reconstitution of bluetongue virus polymerase activity from isolated domains based on a three-dimensional structural model. *Biopolymers* **86**, 83-94 (2007).
65. O'Donnell, S.M., Hansberger, M.W. & Dermody, T.S. Viral and cellular determinants of apoptosis induced by mammalian reovirus. *Int Rev Immunol* **22**, 477-503 (2003).
66. Guglielmi, K.M., Johnson, E.M., Stehle, T. & Dermody, T.S. Attachment and cell entry of mammalian orthoreovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **309**, 1-38 (2006).
67. Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D. & Lee, P.W. Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol Ther* **15**, 1522-30 (2007).

Referenzen

68. Norman, K.L., Hirasawa, K., Yang, A.D., Shields, M.A. & Lee, P.W. Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11099-104 (2004).
69. Rudd, P. & Lemay, G. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J Gen Virol* **86**, 1489-97 (2005).
70. Clarke, P. et al. Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation. *Viral Immunol* **18**, 89-115 (2005).
71. Strong, J.E., Coffey, M.C., Tang, D., Sabinin, P. & Lee, P.W. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *Embo J* **17**, 3351-62 (1998).
72. Ortega, L.G. et al. Mechanism of interferon action. Biochemical and genetic evidence for the intermolecular association of the RNA-dependent protein kinase PKR from human cells. *Virology* **215**, 31-9 (1996).
73. Smakman, N., van den Wollenberg, D.J., Borel Rinkes, I.H., Hoeben, R.C. & Kranenburg, O. Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D. *J Virol* **79**, 14981-5 (2005).
74. Lomniczi, B. et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* **143**, 49-64 (1998).
75. Ozai, Y. et al. Pathogenicity of Newcastle disease viruses (NDV) isolated from pigeons, chickens and pheasants, and the protective effect of vaccination of NDV strain B1. *Nippon Juigaku Zasshi* **49**, 523-5 (1987).
76. Cross, G.M. Newcastle disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21**, 1231-9 (1991).
77. de Leeuw, O.S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N. & Peeters, B.P. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* **86**, 1759-69 (2005).
78. Schirrmacher, V., Griesbach, A. & Ahlert, T. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *Int J Oncol* **18**, 945-52 (2001).
79. Seal, B.S., King, D.J. & Sellers, H.S. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* **24**, 257-68 (2000).

Referenzen

80. Schirmmacher, V. et al. Tumor stimulator cell modification by infection with Newcastle Disease Virus: analysis of effects and mechanism in MLTC-CML cultures. *Int J Oncol* **14**, 205-15 (1999).
81. Zaitsev, V. et al. Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion. *J Virol* **78**, 3733-41 (2004).
82. Bousse, T.L. et al. Biological significance of the second receptor binding site of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *J Virol* **78**, 13351-5 (2004).
83. Speir, R.W. & Southam, C.M. Interference of Newcastle disease virus with neuropathogenicity of oncolytic viruses in mice. *Ann N Y Acad Sci* **83**, 551-63 (1960).
84. Southam, C.M. Present status of oncolytic virus studies. *Trans N Y Acad Sci* **22**, 657-73 (1960).
85. Csatory, L.K. et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol* **67**, 83-93 (2004).
86. Csatory, K.L. & Bakacs, T. [Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in a high-grade glioblastoma patients]. *Orv Hetil* **140**, 2950 (1999).
87. Schirmmacher, V. et al. Immunization with virus-modified tumor cells. *Semin Oncol* **25**, 677-96 (1998).
88. Sinkovics, J.G. & Horvath, J.C. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol* **16**, 1-15 (2000).
89. Kumagai, Y. et al. Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* **27**, 240-52 (2007).
90. Smith, E.J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A. & Levy, D.E. IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* **276**, 8951-7 (2001).
91. Iwamura, T. et al. PACT, a double-stranded RNA binding protein acts as a positive regulator for type I interferon gene induced by Newcastle disease virus. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 515-23 (2001).
92. Elankumaran, S. et al. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol* **84**, 3835-44.

Referenzen

93. Wilden, H., Fournier, P., Zawatzky, R. & Schirmmacher, V. Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol* **34**, 971-82 (2009).
94. Honda, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7 (2005).
95. Ravindra, P.V. et al. Time course of Newcastle disease virus-induced apoptotic pathways. *Virus Res* **144**, 350-4 (2009).
96. Molouki, A., Hsu, Y.T., Jahanshiri, F., Rosli, R. & Yusoff, K. Newcastle disease virus infection promotes Bax redistribution to mitochondria and cell death in HeLa cells. *Intervirology* **53**, 87-94.
97. Berns, K.I. & Giraud, C. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 1-23 (1996).
98. Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-6 (1965).
99. McPherson, R.A., Rosenthal, L.J. & Rose, J.A. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* **147**, 217-22 (1985).
100. Spalholz, B.A. & Tattersall, P. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**, 937-43 (1983).
101. Okochi, K., Mori, R., Miyazaki, M., Cohen, B.J. & Mortimer, P.P. Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *Lancet* **1**, 160-1 (1984).
102. Kishore, J. & Kapoor, A. Erythrovirus B19 infection in humans. *Indian J Med Res* **112**, 149-64 (2000).
103. Rhode, S.L., 3rd & Paradiso, P.R. Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J Virol* **45**, 173-84 (1983).
104. Cotmore, S.F., Sturzenbecker, L.J. & Tattersall, P. The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* **129**, 333-43 (1983).
105. Tattersall, P., Cawte, P.J., Shatkin, A.J. & Ward, D.C. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J Virol* **20**, 273-89 (1976).

Referenzen

106. Astell, C.R., Chow, M.B. & Ward, D.C. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J Virol* **54**, 171-7 (1985).
107. Cotmore, S.F. & Tattersall, P. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **58**, 724-32 (1986).
108. Cotmore, S.F. & Tattersall, P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* **33**, 91-174 (1987).
109. Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K. & Hirt, B. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* **59**, 564-73 (1986).
110. Labieniec-Pintel, L. & Pintel, D. The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J Virol* **57**, 1163-7 (1986).
111. Kollek, R., Tseng, B.Y. & Goulian, M. DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro. *J Virol* **41**, 982-9 (1982).
112. Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S. & Rommelaere, J. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* **73**, 3877-85 (1999).
113. Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J. & Willwand, K. Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5522-7 (2000).
114. Corbau, R., Salom, N., Rommelaere, J. & Nuesch, J.P. Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **259**, 402-15 (1999).
115. Op De Beeck, A. et al. NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J Virol* **75**, 11071-8 (2001).
116. Richards, R.G. & Armentrout, R.W. Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J Virol* **30**, 397-9 (1979).
117. Rommelaere, J. & Cornelis, J.J. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* **33**, 233-51 (1991).
118. Dupressoir, T., Vanacker, J.M., Cornelis, J.J., Duponchel, N. & Rommelaere, J. Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **49**, 3203-8 (1989).

Referenzen

119. Faisst, S., Schlehofer, J.R. & zur Hausen, H. Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J Virol* **63**, 2152-8 (1989).
120. Telerman, A. et al. A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8702-6 (1993).
121. Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S. & Caillet-Fauquet, P. The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**, 4671-8 (1997).
122. Truyen, U. et al. Detection of canine parvovirus DNA in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed B* **41**, 148-52 (1994).
123. Takahashi, T., Ozawa, K., Takahashi, K., Asano, S. & Takaku, F. Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood* **75**, 603-10 (1990).
124. Segovia, J.C., Gallego, J.M., Bueren, J.A. & Almendral, J.M. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **73**, 1774-84 (1999).
125. Kilham, L. & Olivier, L.J. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7**, 428-37 (1959).
126. Chen, Y.Q. et al. Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res* **46**, 3574-9 (1986).
127. Lu, Y.S., Lin, D.F., Lee, Y.L., Liao, Y.K. & Tsai, H.J. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in ducklings in Taiwan. *Avian Dis* **37**, 591-6 (1993).
128. Galli, R. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**, 7011-21 (2004).
129. Capper, D. et al. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol* **117**, 445-56 (2009).
130. Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A. & Lee, P.W. Oncolytic reovirus effectively targets breast cancer stem cells. *Mol Ther* **17**, 972-9 (2009).
131. Dey, M., Ulasov, I.V., Tyler, M.A., Sonabend, A.M. & Lesniak, M.S. Cancer stem cells: the final frontier for glioma virotherapy. *Stem Cell Rev* **7**, 119-29.

Referenzen

132. Pandha, H.S. et al. Synergistic effects of oncolytic reovirus and cisplatin chemotherapy in murine malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **15**, 6158-66 (2009).
133. Wittwer, C.T., Fillmore, G.C. & Garling, D.J. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem* **186**, 328-31 (1990).
134. Alkassar. (2008).
135. Kellogg, D.E. et al. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* **16**, 1134-7 (1994).
136. Birch, D.E. Simplified hot start PCR. *Nature* **381**, 445-6 (1996).
137. Chou, T.C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**, 27-55 (1984).
138. Wilcox, M.E. et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst* **93**, 903-12 (2001).
139. Zulkifli, M.M. et al. Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurol Res* **31**, 3-10 (2009).
140. Rommelaere, J. et al. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 185-95.
141. Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A. & Lee, P.W. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* **282**, 1332-4 (1998).
142. Salsman, J., Top, D., Boutilier, J. & Duncan, R. Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol* **79**, 8090-100 (2005).
143. Zhou, H. et al. Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* **13**, 2344-53 (2007).
144. Short, S.C., Woodcock, M., Marples, B. & Joiner, M.C. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* **79**, 99-105 (2003).
145. Cartee, L. et al. Synergistic induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by phorbol 12-myristate 13-acetate and flavopiridol proceeds via activation of both the intrinsic and tumor necrosis factor-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Pharmacol* **61**, 1313-21 (2002).

Referenzen

146. Improta, T. & Pine, R. Susceptibility to virus infection is determined by a Stat-mediated response to the autocrine effect of virus-induced type I interferon. *Cytokine* **9**, 383-93 (1997).
147. Goody, R.J., Schittone, S.A. & Tyler, K.L. Experimental reovirus-induced acute flaccid paralysis and spinal motor neuron cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 231-9 (2008).
148. Ensminger, W.D. & Tamm, I. The step in cellular DNA synthesis blocked by reovirus infection. *Virology* **39**, 935-8 (1969).
149. Saragovi, H.U. et al. A G1 cell cycle arrest induced by ligands of the reovirus type 3 receptor is secondary to inactivation of p21ras and mitogen-activated protein kinase. *DNA Cell Biol* **18**, 763-70 (1999).
150. Poggioli, G.J., Dermody, T.S. & Tyler, K.L. Reovirus-induced sigma1s-dependent G(2)/M phase cell cycle arrest is associated with inhibition of p34(cdc2). *J Virol* **75**, 7429-34 (2001).
151. Wan, X.Q. et al. [Effects of Newcastle disease virus on the expression of survivin and cell cycle in human tongue squamous carcinoma TSCCa cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **28**, 558-61 (2008).

Eigene Publikationen

Alkassar, M., B. Gartner, et al. (2011) "The combined effects of oncolytic reovirus plus Newcastle disease virus and reovirus plus parvovirus on U87 and U373 cells in vitro and in vivo." J Neurooncol.

Alkassar, M., S. Gottschling, et al. (2009). "Metastatic choriocarcinoma in a 17-year old boy." Klin Padiatr 221(3): 179.

Alloussi, S. H., M. Alkassar, et al. (2011) "All reovirus subtypes show oncolytic potential in primary cells of human high-grade glioma." Oncol Rep 26(3): 645-9.

Furtwangler, R., N. Nourkami, et al. "Update on relapses in unilateral nephroblastoma registered in 3 consecutive SIOP/GPOH studies - a report from the GPOH-nephroblastoma study group." Klin Padiatr 223(3): 113-9.

Nourkami, N., R. Furtwangler, et al. (2009). "Secondary neoplasms after Wilms' tumor in Germany." Strahlenther Onkol 185 Suppl 2: 11-2.

Wittmann, S., B. Zirn, et al. (2007). "Loss of 11q and 16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence, and poor prognosis." Genes Chrom. Canc. 46(2): 163-70.

Danksagung

Mein tiefer Dank gilt Herrn Prof. Friedrich Grässer und Herrn Prof. Norbert Graf für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Rahmenbedingungen sowie der engagierten Betreuung und ständigen Diskussionsbereitschaft jeglicher Art.

Frau Prof. Barbara Gärtner danke ich für die anregenden Ideen sowie ihrer Unterstützung in den vielen kleinen und großen Dingen des Laboralltags.

Herrn Prof. Klaus Römer danke ich für die anregenden Ideen, sowie seiner Unterstützung bei der richtigen Auswertung der erzielten Erkenntnisse.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die angenehme, immer hilfsbereite Atmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt an Barbara Best; Nord, Ruth und Helga Appel, die mir halfen die vielen kleinen Tücken des Laboralltags erfolgreichen zu meistern.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. Marlies Sauter danken, die eine Durchführung der Mausversuche im virologischen Labor ermöglichte und bei vielen Fragestellungen stets gerne beratend zur Seite stand.

Im Besonderen danke ich meiner Frau Hadia, die mir in allen Phasen meiner Arbeit unterstützend und beratend zur Seite stand.

Meinen Brüdern Ammar, Eyad und Manar möchte ich für ihre stete Unterstützung und den vielen wissenschaftlichen Disputen, die mein Interesse für spannende wissenschaftliche Fragestellungen erst entstehen ließen, danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich die gesamte Zeit über mit Geduld unterstützt haben und voll Interesse meinen beruflichen und privaten Weg begleitet haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

| | |
|------------|-----------------------------------|
| Name | Muhannad Alkassar |
| Geburtstag | 2. November 1979 in Aachen |
| Adresse | Tannenweg 5, D-66424 Homburg/Saar |
| Email | kimalk@uniklinikum-saarland.de |

Berufliche Laufbahn

| | |
|-----------------|--|
| Seit Nov 05 | Wissenschaftlicher und ärztlicher Mitarbeiter in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinik Saarland |
| Nov 05 – Mär 07 | Studienassistent der SIOP/GPOH-Nephroblastomstudie |
| Seit Nov 05 | Facharztausbildung für Kinder- und Jugendmedizin |

Diplomarbeit/Promotion

| | |
|-----------------|---|
| Mär 07 – Mär 08 | Diplomarbeit, Titel "The oncolytic effect of parvovirus, reovirus and NDV in the glioblastoma cell line U373" (Note: 1,3) |
| Seit Mär 07 | Naturwissenschaftliche Promotionsarbeit im Virologischen Institut, Universität des Saarlandes, Titel „ Auswirkungen der Kombination von Reovirus plus Newcastle Disease Virus und Reovirus plus Parvovirus auf die onkolytische Wirksamkeit in vitro und in vivo “ |

Studium

| | | |
|-----------------|---|------------|
| Mär 08 | Abschluss Diplombiologie | (Note 2,0) |
| Nov 05 | Staatsexamen Medizin | (Note 1,9) |
| Okt 99 – Mär 08 | Biologiestudium an der Universität des Saarlandes | |
| Okt 99 – Nov 05 | Medizinstudium an der Universität des Saarlandes | |

Schulbildung

| | | |
|-----------------|----------------------------------|--------|
| Sep 86 - Jun 90 | Grundschule Homburg/Saar | |
| Aug 90 - Jun 99 | Christian von Mannlich Gymnasium | Abitur |