

Klinik für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

Onkolytische Wirkung von Reoviren auf das Glioblastom

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von: Saladin Mahmud Helmut Alloussi
geb. am: 29.10.1978 in Homburg / Saar

Für meine Eltern, Schwestern, Freunde und das freie Denken

Mit großen Dank an:

**Barbara Gärtner, Dany Backes, Helga Appel
Stefanie Urbschat, Silke Prowald, Ulli Lehmann, Alexander Hoppe,
Norbert Graf**

1 Inhaltsverzeichnis:

1	Inhaltsverzeichnis:.....	3
2	Zusammenfassung:.....	5
3	Einleitung und Fragestellung:	7
3.1	Glioblastom:.....	7
3.1.1	Ätiologie:.....	7
3.1.2	Pathogenese:.....	8
3.1.3	Symptome:	8
3.1.4	Diagnostik:	9
3.1.5	Therapieoptionen:.....	9
3.1.6	Prognose:.....	9
3.2	RAS-Protein:	10
3.2.1	Aufbau:.....	10
3.2.2	Eigenschaften des RAS – Proteins:.....	12
3.2.3	Aktivierung zum Onkogen:.....	14
3.2.4	RAS-Protein und Glioblastom:	15
3.3	Reovirus:	16
3.3.1	Definition:	16
3.3.2	Klassifikation:	16
3.3.3	Replikationszyklus des Reovirus:	17
3.4	Fragestellung:	18
4	Material und Methodik:.....	19
4.1	Herstellernachweis und Zusammensetzung der verwendeten Materialien:	19
4.1.1	Zellkultur:.....	19
4.1.2	Immunhistochemische Färbung	20
4.1.3	RT-PCR:.....	21
4.1.4	Geräte:	21
4.2	Zellkulturen und Anzucht:	22
4.3	Qualitative Auswertung:	24
4.3.1	Definition des zytopathischen Effektes:.....	24
4.4	Quantitative Auswertung:	26
4.5	Aufbau der Versuchsreihen:.....	27
4.5.1	Algorithmus zur Haltung der Zellkulturen.....	27
4.5.2	Algorithmus zur Passagierung der Zellkulturen:	27
4.5.3	Virusreplikation:.....	28
4.5.4	Algorithmus zur Ultrazentrifugation:.....	29
4.6	RT-PCR-Extraktion.....	29
4.6.1	Etablierung der RT-PCR	30
4.7	Endverdünnungstitration im Kulturröhrchentest:.....	31
4.7.1	Vorbereitung:	32
4.7.2	Algorithmus zur Versuchsdurchführung:.....	32
4.7.3	Auswertung und Berechnung:.....	32
4.8	Immunhistochemischfluoreszierende Analyse:.....	33
4.8.1	Algorithmus zur Gewebepreparation:	33
4.8.2	Algorithmus zur Anfärbetechnik:.....	34
4.8.3	Methodikevaluierung:	36
4.9	Statistische Verfahren:	37
4.9.1	Median:.....	37

4.9.2	Korrektur der TCID ₅₀	37
5	Ergebnisse:	38
5.1	Quantifizierung der Virusstämme und Reproduzierbarkeit der Anzucht:	38
5.2	Qualitative Wirkung in vitro:	40
5.2.1	Verzellen:	41
5.2.2	U373 Glioblastomzellkultur:	43
5.2.3	T3095:	45
5.2.4	T6217:	47
5.2.5	T6208:	50
5.2.6	T3868:	53
5.2.7	T3564:	56
5.2.8	Vorhaut-Fibroblasten:	57
5.2.9	Zusammenfassung:	58
5.3	Quantitative Wirkung von verschiedenen Reovirus-Stämmen auf verschiedene Zellkultursysteme	58
5.3.1	Auswertung der Absterbekinetik der einzelnen Zellkulturen:	58
5.3.2	Virustypspezifisches Wirkungsprofil:	64
5.3.3	TCID ₅₀ in Abhängigkeit von Zellkultur und Virustyp:	66
5.4	Immunhistochemische RAS-Färbung:	68
6	Diskussion:	70
6.1	Besitzen sämtliche Reovirusstämme ein onkolytisches Potential?	70
6.2	Aufbau eines in vitro Testes zur standardisierten Messung der Reovirusaktivität ..	70
6.3	Ermittlung der Kinetiken des Zelluntergangs	71
6.4	Die Bestimmung der minimalen wirksamen Reoviruskonzentration, mit Evaluierung der qualitativen und quantitativen Effekte	72
6.5	Welcher Reovirusstamm besitzt die höchste effektive onkolytische Wirkung?	72
6.6	Welche unterschiedliche Wirkung zeigen die verschiedenen Reovirusstämme im Vergleich miteinander?	73
6.7	Welche unterschiedliche Wirkung besitzen diese Stämme auf RAS-positive und RAS-negative Zellkulturen mit besonderem Schwerpunkt auf Glioblastome?	73
6.8	Welche Aussichten bestehen für eine eventuelle klinische Anwendung?	74
6.8.1	Ergebnis der Phase I Studie für subkutane Tumoren:	75
6.8.2	Ergebnis der T2 Prostatakrebsstudie:	75
6.8.3	Ergebnis der Phase I Studie für rezidivierende maligne Gliome:	76
6.8.4	Ergebnis der systemischen Applikation von Reolysin® in einer Phase I Studie: 76	
6.9	Mögliche Optimierung des onkolytischen Effektes von Reovirus	76
6.10	Welche weiteren Ansätze gibt es in der viralen Therapie von malignen Erkrankungen?	78
6.10.1	Herpes simplex Virus:	78
6.10.2	Adenovirus:	79
6.10.3	Poliovirus:	81
6.10.4	Vakzinia – Virus:	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Publikationen	89
9	Auszeichnungen	89
10	Danksagung	89
11	Lebenslauf	90

2 Zusammenfassung:

Einführung:

Reoviridae sind nicht-humanpathogene Viren. Zur Familie der Reoviridae gehören 4 Subtypen. Eine onkolytische Wirkung konnte bereits für den Subtyp 3 Dearing nachgewiesen werden. Diese onkolytische Wirkung war von der RAS-Proteinexpression abhängig. Die Aufgabe dieser Studie war es zu klären, ob sämtliche Subtypen der Reoviridae ein onkolytisches Potential besitzen und welche unterschiedliche Wirkung diese Subtypen zeigen insbesondere auf das Glioblastom bezogen.

Material und Methodik:

Zur Bestimmung der onkolytischen Aktivität erfolgte nach Anzucht von Probenbiopsien aus fünf verschiedenen Glioblastomen die Beimpfung dieser Zellen durch die verschiedenen Subtypen. Der Ansatz hierfür erfolgte durch die Endverdünnungsmethode.

Zur Bestimmung der RAS-Aktivität erfolgte die Etablierung einer immunhistochemischen Färbung mit zusätzlicher Immunfluoreszenz der untersuchten Zelllinien.

Zur objektiven Quantifizierung der Viruslast wurde eine RT-PCR für die Subtypen des Reovirus etabliert.

Ergebnis:

Sämtliche Subtypen des Reovirus zeigten eine onkolytische Aktivität auf allen untersuchten Glioblastombiopsien. Diese onkolytische Wirkung korrelierte mit der RAS-Überexpression in den untersuchten Zellen. Alle untersuchten Glioblastome zeigten eine ausgeprägte RAS-Aktivität. Die quantitative onkolytische Wirkung unterscheidete sich sowohl in Abhängigkeit von den einzelnen Zelllinien sowie betreffend des verwendeten Subtypes.

Schlussfolgerung:

Dies ist die erste Studie, die eine onkolytische Aktivität sämtlicher Subtypen des Reovirus bestätigen konnte.

Sie zeigt unabhängig von bisherigen Veröffentlichungen die Korrelation von RAS-Überexpression und Vulnerabilität dieser Zellen auf das Reovirus.

Die Effektivität des Subtypes ist interindividuell verschieden und kann nicht vorausgesagt werden.

Abstract:

Introduction:

Reoviridae are non-humanpathogenic viruses. The family of reoviridae consists of 4 different subtypes. In several studies was proven, that subtype 3 Dearing shows an oncolytic potential. This potential is related to the RAS-proteinexpression in these cells.

The aim of this study was to show, if all subtypes have an oncolytic potential and if there are differences in their efficacy, in particular for high grade glioma.

Material and Methods:

For evaluating the oncolytic potential, we performed an in vitro head-to-head study for all reovirus subtypes in 5 cell cultures of high grade gliomas from patients.

The oncolytic activity was determined using end point titration with observation of the cytopathogenic effect.

For measurement of RAS-activity, we performed an immunofluorescent detection stain on all cell cultures.

For quantification of the virus, a RT-PCR-measurement for all subtypes was performed.

Results:

All reovirus subtypes showed oncolytic activity in the observed glioma biopsies. These observations were correlating with RAS-overexpression in the observed cells.

All glioma biopsies overexpressed RAS-protein. The quantitative oncolytic potential differed in relation to the single observed cell culture and in relation to the chosen reovirus subtype.

Conclusion:

This is the first study, which could show an oncolytic activity for all reovirus subtypes.

We could show independently of publications so far the relationship and correlation between RAS-protein overexpression and vulnerability of cells to reovirus.

Efficacy of the different subtypes is interindividually different and cannot be forecast.

3 Einleitung und Fragestellung:

3.1 Glioblastom:

Glioblastome gehören zu den diffus infiltrierenden, hochmalignen Gliomen und machen 20 % aller hirneigenen Neoplasien aus. Das Erkrankungsalter erstreckt sich von der Kindheit bis zum höheren Seniorenalter, wobei die Erkrankung im Kindesalter sehr selten ist.

3.1.1 Ätiologie:

Glioblastome entstehen durch pathologische Vermehrung von veränderten glialen Zellen. Von allen Gliomen ist das Glioblastom der aggressivste Tumor. Als genetische Alterationen sind Mutationen von Tumorsuppressorgenen p53 (>30%) und p16 (>50%), Deletionen im Chromosom 10 (>60%) und 19q (25%) sowie Amplifikationen des EGF-Rezeptor (>30%) und des RAS-p21, insbesondere in High grade Gliomen (>75%) [1] gefunden worden. Weitere genetische Merkmale sind Gegenstand aktueller Forschung.

Einteilung der Gliome:

Nach Grad:

Low grade Gliome sind gut differenziert (nicht anaplastisch), sie sind benigne und zeigen eine bessere Prognose für den Patienten.

High grade Gliome sind undifferenziert oder anaplastisch, sie sind maligne und besitzen die schlechteste Prognose.

WHO Gradeinteilung für Gliome:

Die Einteilung erfolgt nach der World Health Organization (WHO). Sie unterscheidet 4 Grade, wobei Grad I die niedrigste und Grad IV die höchste Malignität aufweist. Bei den Astrozytomen ergibt sich folgende Klassifikation:

WHO-Grad I — z.B. pilozytisches Astrozytom (typischer kindlicher Tumor)

WHO-Grad II — z.B. diffus wachsendes oder low grade Astrozytom

WHO-Grad III — z.B. anaplastisches (malignes) Astrozytom

WHO-Grad IV — Glioblastoma multiforme

Nach Lokalisation:

Gliome können ebenfalls nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden:

Infratentoriell: meist bei Kindern (70% bei Kindern)

Supratentoriell: meist bei Erwachsenen (70% bei Erwachsenen)

3.1.2 Pathogenese:

High grade Gliome sind hoch vaskularisierte, schnell wachsende Tumore mit der Tendenz zur Infiltration in das peritumoröse Gewebe. Sie zeigen dabei ausgeprägte Nekrosen mit hypoxämischen Bezirken.

Low grade Gliome wachsen dagegen langsam, oftmals über mehrere Jahre, wobei eine Therapie erst dann notwendig wird, sobald klinische Symptome auftreten.

Diese Symptomatik entsteht v.a. durch Kompression benachbarter Strukturen.

Gliome metastasieren nicht hämatogen, allerdings breiten sie sich über den cerebrospinalen Liquor aus und verursachen sogenannte Tropfmetastasen im Rückenmark.

Je maligner der Tumor, desto ausgeprägter ist die Reaktion des umgebenden Parenchyms in Form eines perifokalen Ödems, das ausgeprägt raumfordernd wirkt. Bei Blutung oder Verlegung des Liquorabflusses können noch Symptome eines Apoplexes oder Hydrozephalus hinzukommen.

3.1.3 Symptome:

Die Symptome des Glioblastoms sind abhängig von verschiedenen Faktoren.

1. Das biologische Verhalten des Tumors, insbesondere der Tumorstadiumsrate.
2. Lokalisation des Tumors.

Gliome verursachen häufig Kopfschmerz, Wesensänderung, Brechreiz bis zum morgendlichen Nüchternbrechen. In Abhängigkeit der Lokalisation kommen neurologische Ausfälle hinzu. Eine Abducensparese kann Hinweis auf einen gesteigerten Hirndruck sein. In knapp 50 % bildet sich eine Stauungspapille aus, die zu Sehstörungen und einer Opticusatrophie führen kann. Rückenmarksgliome verursachen Schmerz, Schwäche und Sensibilitätsstörung in den Extremitäten. Ein typisches Symptom im Kindesalter kann eine Skoliose oder Fehllagerung der Wirbelsäule sein.

3.1.4 Diagnostik:

Glioblastome lassen sich hervorragend durch die Kernspintomographie darstellen.

Kalzifikationen (Verkalkungen) stellen sich am besten in der Computertomographie dar.

Zusammen mit der Lokalisation, den radiologischen tumorspezifischen Besonderheiten und dem Erkrankungsalter lässt sich häufig bereits eine Verdachtsdiagnose stellen.

Das CT zeigt ein Glioblastoma multiforme als eine inhomogene, in 85% zystische Läsion mit wenigen Verkalkungen und nekrotischen Arealen. In der Angiographie erscheint eine pathologische Vaskularisation mit arterio-venösen Kurzschlüssen und einer verfrühten venösen Drainage.

Erst die histopathologische Untersuchung beweist die Diagnose. Neben der Histologie ist immer die Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen notwendig. So ist heute bekannt, dass das epigenetische Modifizieren (silencing) des MGMT-DNA-Reparaturgens (= O6-methylguanine-DNA methyltransferase) durch eine Promotor-Methylierung, die DNA-Reparatur beeinträchtigt. Dieser Vorgang bewirkt, dass das Reparaturgen inaktiv ist und methylierende Substanzen wie Temozolomid den Tumorzelltod bewirken. Ein solcher Befund findet sich bei Deletionen im Bereich von 10q26 wegen der dortigen Lokalisation des MGMT-Gens. Zudem scheinen auch die Deletion von CDKN2A und CDKN2B ein Indikator für eine schlechtere Prognose mit allerdings guter Ansprechbarkeit auf Temozolomid zu sein [71].

3.1.5 Therapieoptionen:

Die Therapieoptionen sind beim Glioblastom sehr beschränkt und rein palliativ. Neben der Radikaloperation ist eine bloße Tumorverkleinerung oftmals sinnvoll. Eine anschließende Bestrahlung ist obligatorisch. Von einer adjuvanten Chemotherapie können besonders jüngere Patienten mit gutem Allgemeinzustand profitieren. Die allgemein eingesetzten Chemotherapeutika sind Cisplatin, Ifosfamid, Etoposid und Temozolamid.

3.1.6 Prognose:

Die Prognose des Glioblastoms ist sehr ungünstig. Die Patienten überleben meistens nur wenige Monate, selten länger als 1 Jahr. Hierbei zeigen großzellige Glioblastome eine geringfügig bessere Prognose als kleinzellige.

Momentan kann man mit den zu Verfügung stehenden Optionen keine langfristige Heilung erzielt werden.

Diese ausweglose Situation muss daher mit neuen innovativen Therapieansätzen erfolgreich angegangen werden.

3.2 RAS-Protein:

Die RAS-Proteine sind für ihre essenzielle Funktion bei der Übertragung von extrazellulären Signalen zur Regulierung des Zellwachstums, -überlebens und der Zelldifferenzierung wichtig.

Die RAS-Familie wurde ursprünglich in den 60er Jahre identifiziert als transformierendes Element des Harvey und Kirsten Stammes des *rat sarcoma virus*, wobei genauere wissenschaftliche Untersuchungen der Proteinprodukten ab Anfang der 80er Jahre vorgenommen wurden, als mutierte Allele des zellulären RAS-Proteins als dominantes Onkogen in einer Anzahl menschlicher Tumore entdeckt wurden.

Die RAS-Familie besteht aus drei Mitgliedern: H-RAS, K-RAS und N-RAS, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind.

Das H-RAS und das K-RAS sind die zellulären Gegenstücke des viralen Harvey und Kirsten Genes, das N-RAS Gen ist aus einer Neuroblastomlinie abgeleitet worden.

3.2.1 Aufbau:

Die Anatomie der RAS-Proteine basiert auf einer engverwandten GTPase mit 188 (K-RAS-B), bzw. 189 (H-RAS, K-RAS-A und N-RAS) Aminosäuren.

Die Einteilung in A und B beim K-RAS ist bedingt durch Splicing des vierten Exons dieses Genes [5], sowie durch die wesentlich höhere Menge an Transkripten des K-RAS-B, im Gegensatz zur Menge an Transkripten beim K-RAS-A.

Allerdings sind sämtlichen kritischen Domänen zur Regulierung der GTPase-Funktion (z.B. Nukleotidbindung und GTP-Hydrolyse) auf den 165 N-terminalen Aminosäuren lokalisiert [36].

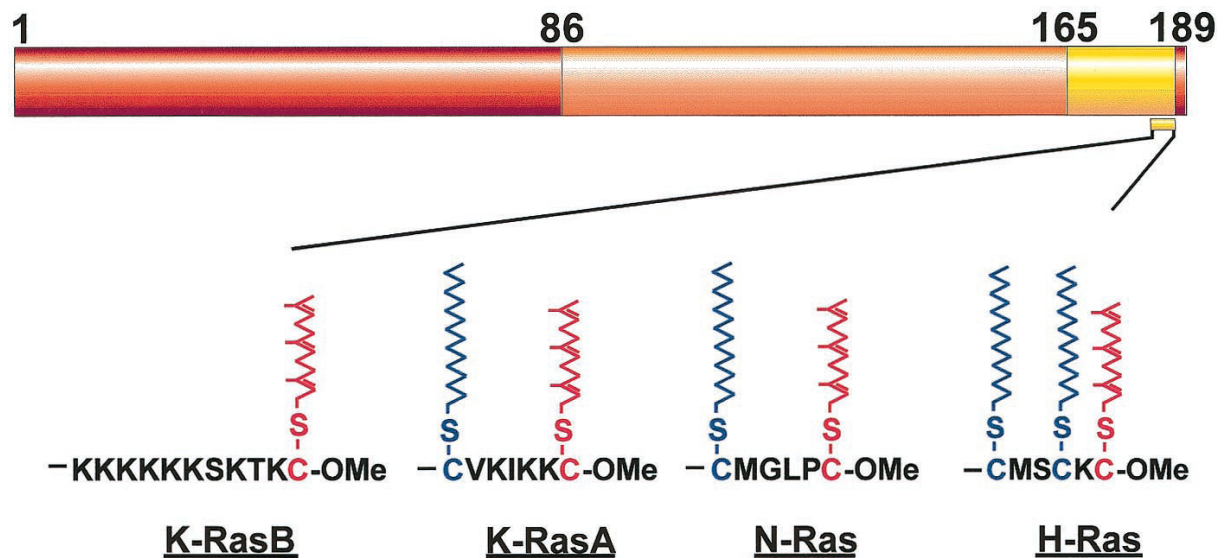


Abb. 1. Sequenzen der unterschiedlichen RAS-Proteine. Identische Sequenzen sind als gelb über orange bis rot dargestellt. Die Andockungsregion zur zellulären Membran ist mit den posttranslatatorischen Veränderungen dargestellt. Der farnesylierte Cysteinrest, welcher bei allen RAS-Proteinen vorhanden ist, besitzt die rote Farbe. Palmitoylierte Cysteinreste sind blau dargestellt [36].

Im Vergleich zeigen die RAS-Proteine 3 unterschiedliche Regionen.

Der erste Abschnitt umfasst die N-terminalen 86 Aminosäuren, welche zu 100% in den verschiedenen RAS-Proteinen übereinstimmen.

Zusätzlich lokalisiert sind in diesem Abschnitt die RAS-Rezeptor-Domänen (Aminosäure 32 bis 40), welche für die kritische Interaktion aller bekannten Kaskaden der RAS-Proteine verantwortlich sind.

Die folgenden 80 Aminosäuren bilden die zweite Region und unterscheiden sich nur geringfügig bei den verschiedenen RAS-Proteinen. 85% der Sequenz ist dabei homolog.

Das abschließende C-terminale Ende, auch als hypervariable Region bekannt, beginnt bei Aminosäure 165 und zeigt keine Übereinstimmung bei den verschiedenen Proteinsubformen, mit Ausnahme der abschließenden CAAX-Frequenz (C: Cystein; A: kettenförmige Aminosäure; X: Methionin oder Serin), welche bei allen Unterformen gleich ist [11].

Darausfolgend müssten die Sequenzen mit konsekutiv unterschiedlichem Effekt der einzelnen RAS-Proteine auf der hypervariablen Region lokalisiert sein.

Während einige funktionelle Studien dies unterstützen, zeigen andere wiederum, dass dieser Erklärungsansatz zu einfach konstruiert ist.

Die vier verschiedenen RAS-Proteine stimmen zu 85% miteinander überein, alle besitzen die charakteristische CAAX-Region am C-terminalen Ende.

Die anderen homologen Regionen beinhalten die 4 Areale für GTP-Bindung und Hydrolyse [6]:

1. Aminosäure 10-17
2. Aminosäure 57-62
3. Aminosäure 113-120
4. Aminosäure 143-147

3.2.2 Eigenschaften des RAS – Proteins:

Die RAS-Proteine sind wichtige molekulare Schalter für ein weites Spektrum an Signalkaskaden, welche essenziell für den zytoskeletalen Aufbau, die Zellproliferation, Zelladhäsionen, Apoptosis und Zellmigration sind.

Bei malignen Erkrankungen sind diese Proteine oft dereguliert, was zur erhöhten Invasivität und Metastasierung bei erniedrigter Apoptosefähigkeit führt [34].

RAS ist ein G-Protein, welches regulatorisch durch eine GTP-Hydrolase aktiviert (RAS-GTP) bzw. inaktiviert wird (RAS-GDP).

Aktiviert wird RAS durch guanin exchange Faktoren (GEF, z.B. CDC25, SOS1 + 2), welche durch mitogene Signale und Rückkopplungsmechanismen des RAS aktiviert werden.

Inaktiviert wird RAS durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP, z.B. RAS-GAP), welche die GTP-Hydrolyse-Rate erhöht und damit RAS in die inaktive RAS-GDP-Form bringt.

Die Bindung an die Zellmembran erfolgt mittels Isoprenylierung oder Lipidation durch Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase. Dadurch besitzt RAS im gesunden Zustand eine zentrale Rolle bei der Regelung vieler Kaskaden.

Molekularbiologisch wird zunächst das C-terminale CAAX-Ende an der Cystein Stelle im Zytosol farnesyliert, anschließend wird es in das endoplasmatische Retikulum transportiert.

Das Tripeptid (AAX) wird vom C-Ende durch eine Endoprotease abgespalten, das neue C-Ende wird durch eine Methyltransferase methyliert. Das so veränderte RAS wird nun zur Plasmamembran transportiert.

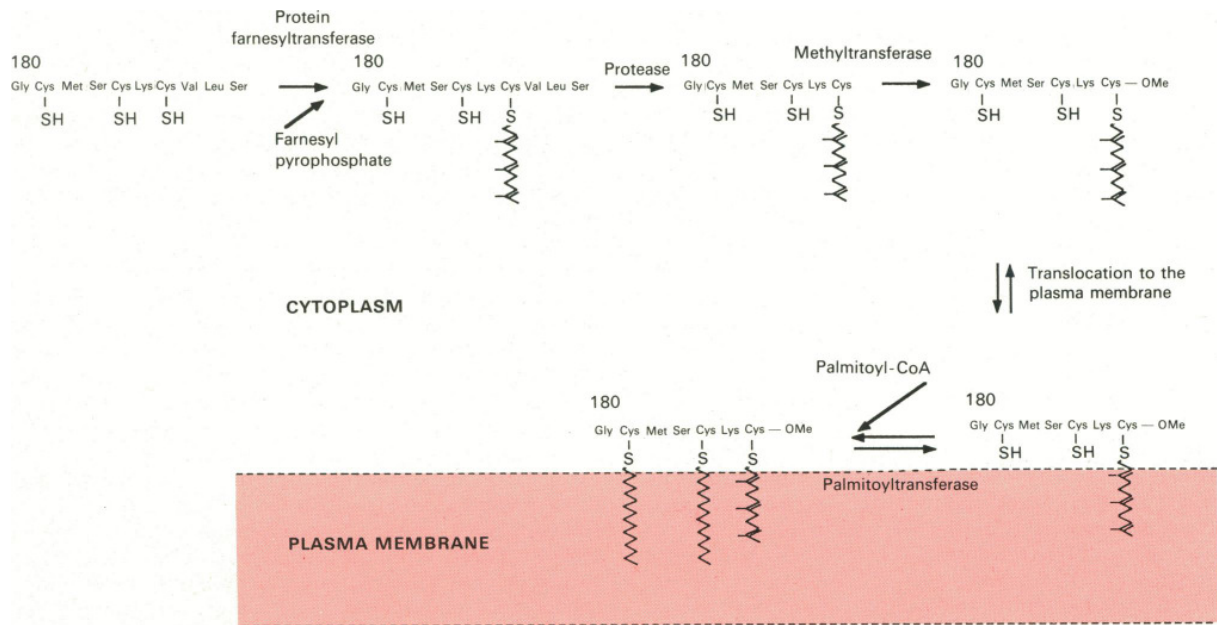


Abb.2: Posttranslationsmodifikation des C-Restes des H-RAS-Proteins. Die Aminosäuresequenz des C-Endes mit ihren 9 Aminosäuren ist aufgezeigt. Die beteiligten Enzyme sind ebenfalls benannt [24].

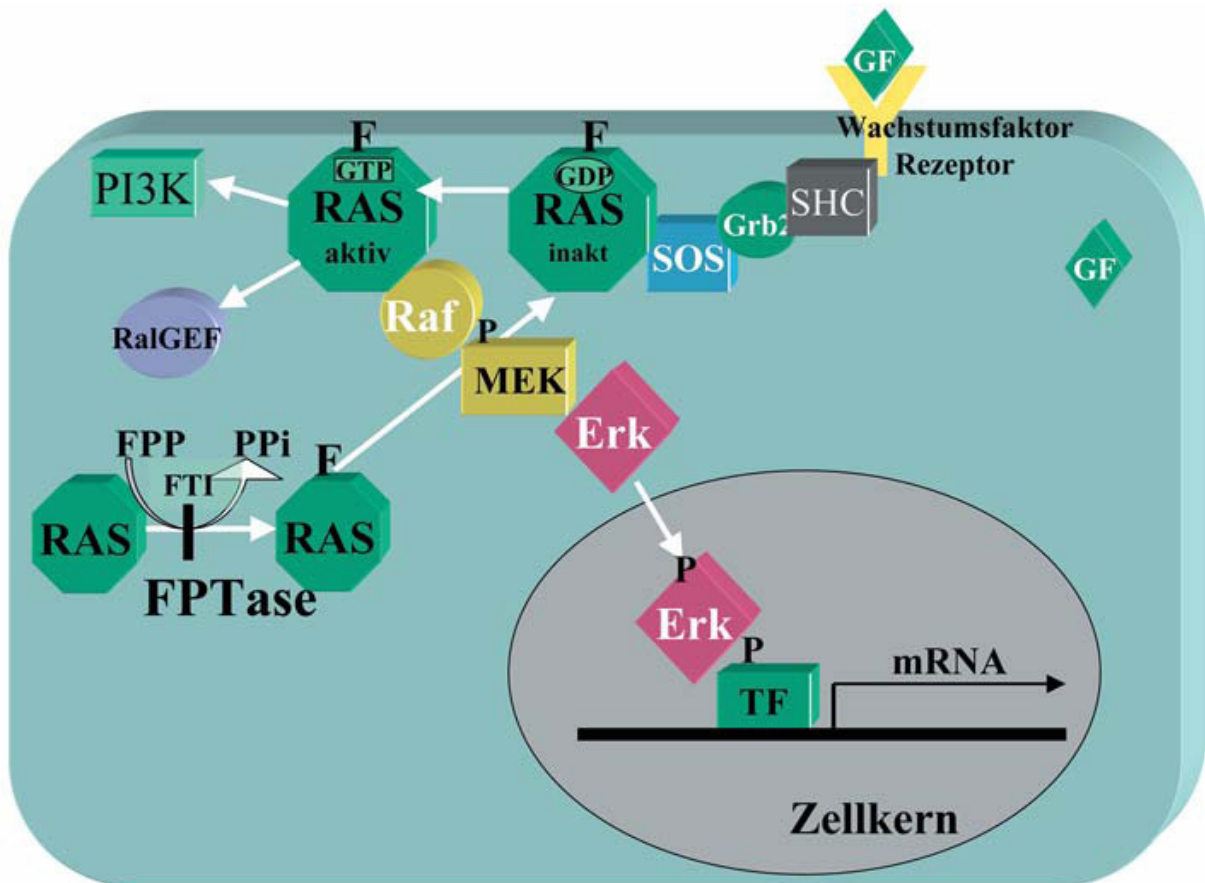


Abb. 3: Übersicht der Signaltransduktion der Tyrosinkinase-Rezeptoren über das RAS-Protein und der Raf/Erk-Kaskade. Zusätzlich aufgezeigt ist eine mögliche Hemmung der RAS-Farnesylierung durch Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI). FPTase: Farnesyl-Protein-Transferase; GF: Wachstumsfaktor; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, TF: Transkriptionsfaktoren, z.B. RNA – aktivierte Proteinkinase R (PKR) [20].

3.2.3 Aktivierung zum Onkogen:

Ursächlich für die Transformation in ein Onkogen sind Mutationen bei verschiedenen Genen, sowie bei RAS selbst.

Onkogene wie z.B. p210BCR-ABL oder der Wachstumsrezeptor erbB sind dem RAS vorgeschaltet, sodass bei andauernder Aktivierung das RAS ebenfalls aktiviert wird.

Das Tumorsuppressorgen NF1 kodiert die RAS-GAP, dessen Mutation bei Neurofibromatose RAS aktiv lässt, eine Amplifikation des RAS ist ebenfalls möglich.

Zuletzt kann durch Punktmutation das Onkogen aktiviert werden, wodurch die GTPase-Reaktion nicht länger durch GAP stimuliert werden kann, wodurch die Halbwertszeit des aktiven RAS-GTP-Mutanten deutlich verlängert wird [58].

3.2.4 RAS-Protein und Glioblastom:

Biochemische Analysen von Tumormaterial haben ergeben, dass die RAS-Proteinkaskade für die Entstehung von Glioblastomen mitverantwortlich ist.

Sie beeinflusst Zellwachstumsprozesse, indem es die mitogene Antwort der Zelle induziert.

Das RAS-Protein ist im Zentrum eines Multikomponentenkomplexes zur Signalkaskade gelegen, welches über verschiedene Aktivierungswege und Feedbackschleifen bei der zellulären Ausreifung, Entwicklung und Proliferation, sowie bei Apoptose,

Membrantransporten und Lipidmetabolismus Einfluss hat. Als Antwort auf extrazelluläre Signale werden intrazelluläre Prozesse durch einen konstanten Kreislauf aus aktivierten, GTP-gebundenen und inaktivierten, GDP-gebundenen Status von RAS aufrechterhalten.

Aufgrund dieser zentralen Bedeutung führt eine dauerhafte Aktivierung, z.B. durch Punktmutation zum unkontrollierten Wachstum, Transformation bis hin zur malignen Entartung. Schlüsselregulationskaskaden sind hierbei die durch RAS aktivierten Signalwege PI3K, Raf/Erk und RalGEF.

Aktivierter PI3K beeinflusst Zellüberleben, Genexpression, zytoskeletale Organisation und zelluläre Metabolismen durch Phosphorylierung von Phosphoinositiden. Diese wiederum aktivieren Schlüsselproteine, z.B. Glykogensynthase und antiapoptotische Eiweiße.

Der Raf/Erk Signalweg ist direkt mit dem RAS-Protein verbunden und kodiert die Zellproliferation, -reifung und Apoptose. Auch die mitogen aktivierende Proteinkinase K (MAPK) wird durch die RAS-Raf/Erk-Kaskade beeinflusst. Hierdurch werden u.a. Mitose, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert.

Der RalGEF Signalweg ist noch am wenigsten erforscht. Aktivierung beeinflusst ebenfalls die MAPK.

Bei Glioblastomen zeigen sich je nach Publikation, RAS-Modifikationen von 0 – 80 %.

Unsere klinikinternen Statistiken zeigen ebenfalls bei 80% der biopsierten Glioblastome RAS-Protein-Expressionen.

Diese Arbeit beschränkt sich auf den Nachweis des H-RAS-Proteins, da dieses am häufigsten im Gehirn nachzuweisen ist. Daneben tritt es gehäuft im Muskel und in der Haut auf, am wenigsten in der Leber.

K-RAS lässt sich am häufigsten im Darm, in der Lunge und im Thymus nachweisen, die Haut zeigt die niedrigste Rate.

N-RAS tritt am meisten im Hoden und im Thymus auf [6].

3.3 Reovirus:

3.3.1 Definition:

Das Reovirus ist ein doppelsträngiges RNA-Virus, das ubiquitär vorkommt. Es gehört der Familie der Orthoreoviridae an, und wurde 1956 von Albert Sabin entdeckt. Der Name wurde gebildet aus Respiratory-, Entero-, Orphan-Virus.

Als Wirt dienen ihm sämtliche Säugetiere, wobei der Mensch nicht der primäre Wirt ist [68]. Es ist ein zytopathogenes Virus, das beim Menschen aber nur eine milde Symptomatik auslöst (respiratorische Symptome, Diarrhoe) Der Teilname ‚Orphan‘ leitet sich davon ab, dass es ein verwaistes Virus ist, weil keine Erkrankung dazu beschrieben wurde. [65].

Bei immundefizienten Patienten und bei Neugeborenen kann diese Symptomatik stärker ausgebildet sein, vereinzelt wurde auch von letalen Ausgängen nach einer Infektion mit Reovirus berichtet. Diese sind allerdings äußerst selten. Zusätzlich konnte bei diesen Patienten nicht eindeutig geklärt werden, ob das Reovirus ursächlich für den letalen Ausgang verantwortlich.

Obwohl die meisten Menschen mit Reovirus im Laufe ihres Lebens infiziert wurden, kommt es nur zu geringen bis keinen klinischen Symptomen, sodass dieser Virus als nicht humanpathogen gelten kann [67].

3.3.2 Klassifikation:

Es gibt vier Subtypen des Virus.

- 1.) Typ I Lang
- 2.) Typ II Jones
- 3.) Typ III Dearing
- 4.) Typ III Abney

Die Einteilung erfolgt aufgrund des Unterschiedes im Protein $\sigma - 1$ – Proteins und aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des Genoms.

Die Stämme Lang und Dearing stellen die am besten untersuchten Subtypen dar, die Stämme Abney und Jones spielen in wissenschaftlichen Untersuchungen bisher nur eine untergeordnete Rolle [29].

Isolierte wissenschaftliche Untersuchungen von Jones und Abney bzw. vergleichende Studien zu den anderen Stämmen existieren z.Zt. nicht.

3.3.3 Replikationszyklus des Reovirus:

1992 entdeckten die kanadischen Forscher Damu Tang und Patrick Lee die Verbindung zwischen Reovirus und der Zelllyse bei Fibroblasten NIH3T3-Zellkultur [64].

Es konnte gezeigt werden, dass das RAS-Protein und die, durch RAS-Protein und dessen nachfolgenden Enzymen induzierte RNA-aktivierte Proteinkinase R (PKR) für die Translation des Virusgenoms und der dadurch bedingten Replikation des Virus essentiell notwendig ist.

Nach Infektion kommt es in der gesunden Zelle zur zellinduzierten Apoptose nach Reovirusinfektion, getriggert über den eukaryonten Inhibitorfaktor eIF α mit nachfolgender Einleitung der Apoptose. In der RAS-überexprimierenden Zelle verhindert die RNA-aktivierte Proteinkinase R durch Phosphorylierung die Aktivierung von eIF α . Stattdessen läuft der Zellzyklus weiter mit Bildung von Viruspartikel und anschließendem Zelltod mit Freisetzung von Virus [73].

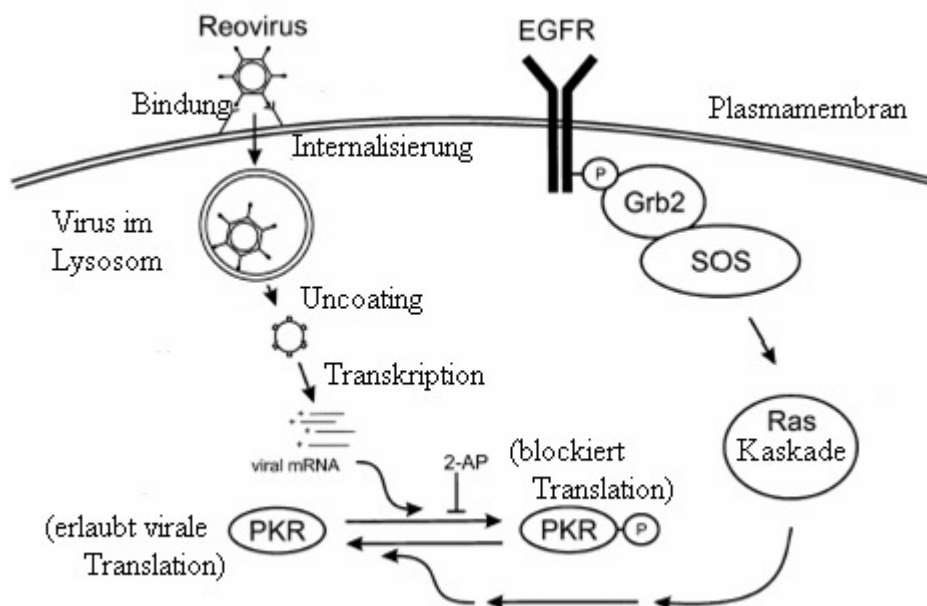


Abb. 4: Der Gebrauch der RAS-Kaskade in der Reovirusreplikation.

Die Blockung der Aktivierung der PKR und somit Förderung der Anfälligkeit der Zelle auf Reovirus kann durch knock out des PKR-Genes oder durch Blockung der Phosphorylierung durch 2-Aminopurin (2-AP) provoziert werden [63].

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass RAS-transformierte Zellen eine deutlich höhere Virusreplikationsrate mit erhöhter Infektionseigenschaften der freigelassenen Partikel und erhöhter Freisetzungsraten besitzen, die bis zum 10- bis 50-fachen der normalen Freisetzung

sein kann, neben dem Verlust der zelleigenen Schutzmechanismen durch das mutierte RAS-Protein [39].

Besonderen Einfluss auf Anfälligkeit auf Reovirus zeigt hierbei die durch RAS kodierte Kaskade RasGEF. Bei Ausfall dieser Kaskade ist die Anfälligkeit auf das Reovirus interessanterweise verringert. Hierbei scheint besonders die p38-MAPK eine besondere Bedeutung in der Abwehr auf Reovirus zu haben [49].

3.4 Fragestellung:

In dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Besitzen sämtliche Reovirusstämme ein onkolytisches Potential?
- 2) Welche unterschiedliche Wirkung zeigen die verschiedenen Reovirusstämme im Vergleich miteinander?
- 3) Welche Einflussfaktoren auf die onkolytische Aktivität lassen sich dabei erkennen?
- 4) Welche unterschiedliche Wirkung besitzen diese Stämme auf RAS-Protein positive und RAS-Protein negative Zellkulturen mit besonderem Schwerpunkt auf Glioblastome?

Zur Beantwortung dieser Fragen war es notwendig, ein in vitro-Test zur standardisierten Messung der Reoviruskonzentration für alle Reovirusstämme zu etablieren und zu evaluieren.

4 Material und Methodik:

4.1 *Herstellernachweis und Zusammensetzung der verwendeten Materialien:*

4.1.1 Zellkultur:

- Minimal Essential Medium (MEM)
Nach EAGLE (1959) mit L-Glutamin und NaHCO_3
PAA Laboratories

- Phosphate-buffered Saline (PBS)
Nach DULBECCO und VOGT (1954): NaCl 8000 mg/l, KCl 200 mg/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ 2898 mg/l, KH_2PO_4 200mg/l, $\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, CaCl_2 100 mg/l

- PBS deficient (PBS def)
Entspricht PBS ohne CaCl_2 und MgCl_2
PAA Laboratories

- Trypsin
1 : 250 (w/v) in PBS def.
PAA Laboratories

- Trypsin-EDTA
0,05% / 0,02% in PBS def.
PAA Laboratories

- Penicillin/Streptomycin
PAA Laboratories

- Aminoacids non essential
PAA Laboratories

- Fetales bovines Serum (FBS)

- PAA Laboratories
- Zellkulturflasche,
Greiner Bio-One
- QuadriPERM, Steril
Greiner Bio-One
- Wachstumsmedium für sämtliche Zellkulturen:
10 % FKS, 90% MEM

4.1.2 Immunhistochemische Färbung

- ImmunoCruz® Staining System IgG Mouse (Sc-2050)
Santa Cruz Biotech.
- Anti-c-H-RAS Mouse RAS Antibody (F235-1.71)
Conc.: 0,1 mg/ml, Cat.#: OP23
Calbiochem
- Rhodamine Red-X goat anti-mouse IgG antibody/pH 8.0
Invitrogen
- Vectashield Mounting Medium for fluorescence H-1000
Vector Lab Inc.
- Fluoreszenz Mikroskop Olympus BX61/BX62
mit Quecksilberlampe U-LH 100 HGAP0
Olympus
- Software ISIS V.4.1.8. und FISH-Imager V.4.1.8
Metasystems Altlußheim
- Virustypen:
1) Typ I Lang: VR-230

- 2) Typ II Jones: VR-231
- 3) Typ III Dearing: VR-824
- 4) Typ III Abney: VR-232

Sämtliche Virustypen wurden käuflich bei der ATCC erworben.

4.1.3 RT-PCR:

- MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit
Cat.No: 3038505
Roche
- Forward-Primer: Reo-fw,
Sequenz: 5'-gAATgCAGAACATgATTCAgCAT,
TIB MOLBIOL
- Backward-Primer: Reo-rev
Sequenz: 5'TAgCAGTATgCTCAgTAgAggTgg,
TIB MOLBIOL
- Hybridisierungs sonden:
Reo-FL:
Sequenz: 5'gATTCTTTTTCTCCAaggTAACgATTTTACTCATAT - FL
Reo-LC:
Sequenz: 5'LC Red640-ACTACCACTTTCCCgTCAaggTTCAAC-PH
TIB MOLBIOL

4.1.4 Geräte:

- LightCycler®
Roche
- Fluoreszenz Mikroskop Olympus BX61/BX62
mit Quecksilberlampe U-LH 100 HGAPO

Olympus

- Ultrazentrifuge Centrikon T-2060
Kontron®

4.2 Zellkulturen und Anzuchtang:

- Verozellen: gestellt durch das Institut für Virologie

Die Verozellen wurden alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium.
Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen und 5% CO₂ Atmosphäre angezüchtet.

- U373 Glioblastomzellkultur: freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Rube, Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Die Glioblastomzellkultur U373 wurde alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium.
Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- KH6268: isoliert und gestellt durch das Institut für Humangenetik.

Das Kopfhautbiopsat KH6268 wurde alle fünf Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium.
Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- Fibroblasten: aus der Vorhaut eines 5jährigen Jungens isoliert und gestellt durch das Institut für Virologie

Diese Fibroblasten wurden alle fünf Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium.
Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- T3868: gestellt durch das Institut für Humangenetik und die Abteilung für Neurochirurgie

49jährige weibliche Patientin, Histologie: partiell astroglial differenziertes, ansonsten anaplastisches Gliom hoher Malignität, WHO-Grad IV rechts temporal

Die Glioblastombiopsie T3868 wurde alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium. Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- T3564: gestellt durch das Institut für Humangenetik und die Abteilung für Neurochirurgie

54jährige weibliche Patientin, Histologie: Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV, Ponstumor

Die Glioblastombiopsie T3564 wurde alle vier Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium. Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- T6217: gestellt durch das Institut für Humangenetik und die Abteilung für Neurochirurgie

70jähriger männlicher Patient, Histologie: diffus manifestiertes, astrozytär differenziertes Gliom mit riesenzelliger Komponente, WHO-Grad IV rechts temporal mit Hemipares links

Die Glioblastombiopsie T6217 wurde alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium. Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- T6208: gestellt durch das Institut für Humangenetik und die Abteilung für Neurochirurgie

53jähriger männlicher Patient, Histologie: diffuses high-grade Gliom, WHO-Grad IV, negative intranukleäre Immunreaktion auf p21, gleichzeitig intracytoplasmatische Reaktion in einem Teil der Zellen

Die Glioblastombiopsie T6208 wurde alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium. Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezüchtet.

- T3095: gestellt durch das Institut für Humangenetik und die Abteilung für Neurochirurgie

52jähriger männlicher Patient, Histologie: Glioblastoma multiforme WHO Grad IV links okzipital

Die Glioblastombiopsie T3095 wurde alle drei Tage nach mikroskopischer Kontrolle gesplittet.

Sie wurden im Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 1 ml Zellsuspension zu 5 ml Wachstumsmedium. Sämtliche Kulturen wurden in 75 cm² Kulturflaschen angezchtet.

Sämtliche biopsierten Glioblastome sind freundlicherweise vom Institut für Humangenetik durch Priv. Doz. Dr. rer. nat. Stefanie Urbschat und Dr. rer. nat. Silke Prowald zur Verfügung gestellt worden.

4.3 Qualitative Auswertung:

4.3.1 Definition des zytopathischen Effektes:

Die Zelle erleidet durch die Virusmultiplikation, Reifung und Freisetzung in vielen Fällen typische morphologische Veränderungen, die als zytopathischer Effekt bezeichnet werden (CPE).

Der CPE kann man am deutlichsten bei Zellen erkennen, die sich abkugeln und von der Unterlage ablösen. Manchmal erkennt man eine Vakuolisierung des Zytoplasmas der Zellen, andere lassen Einschlusskörperchen an den Bildungsorten der Viren oder deren Bestandteile auftreten.

Die Morphologie des CPE hängt von der Virusvermehrung in der Kultur ab. Je nachdem, ob das Virus über die flüssige Phase oder nur von Zelle zu Zelle sich ausbreitet, ergeben sich verschiedene Bilder der virusbedingten Zelldegeneration.

Zur Untersuchung in dieser Arbeit wurde der zytopathische Effekt (CPE) mittels lichtmikroskopischer Untersuchung bestimmt, dabei wurde der Effekt auf die im nachfolgenden einzeln besprochenen CPE-Arten bestimmt.

Bei subjektiv unsicherem positivem Befund wurde das Ergebnis als negativ deklariert.

Nur ein eindeutiger CPE der Stufe 2 wurde als positiver Effekt des Virus auf die jeweilige Zellkultur gewertet.

Diffuse rundzellige Zelldegeneration:

Es bilden sich kleine Herde, in denen zwischen normal aussehenden, am Boden haftenden Zellen abgekugelte Rundzellen eingestreut sind, die beim Verschieben der Bildebene in typischer Weise aufgrund ihres Sammellinsencharakters leuchten. Dieser Anfangseffekt wird Stufe 1 genannt. Im weiteren Verlauf breitet sich die rundzellige Degeneration über den gesamten Zellrasen aus, der damit löchrig wird und zahlreiche auffallend gleich große Rundzellen enthält. Dies ist die Stufe 2.

Stufe 3 ist die komplette Ablösung des Zellrasens vom Grund, wobei einzeln haftende Rundzellen noch vorkommen können.

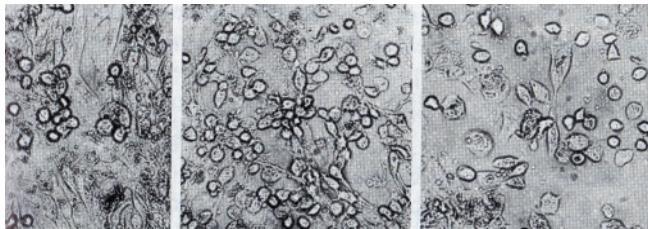


Abb. 5: diffuse rundzellige Zelldegeneration im Verlauf von 3 Beobachtungstagen (Abb. 5-9 aus [8])

Diffuse polymorphzellige Zelldegeneration:

Sie ähnelt der vorangehend beschriebenen Degenerationsform. Der wesentlichste Unterschied besteht in der unterschiedlichen Größe der auftretenden Rundzellen.

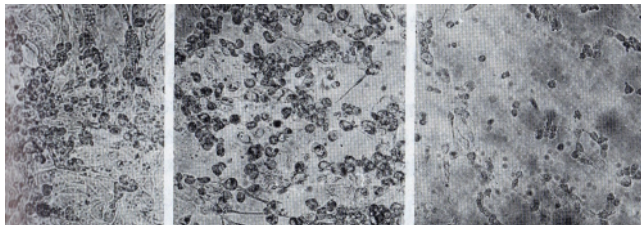


Abb. 6: diffuse polymorphzellige Zelldegeneration im Verlauf von 3 Beobachtungstagen

Traubenförmige, rundzellige Zelldegeneration:

Sie kommt besonders bei Zell-zu-Zell-Übertragung vor. Er beginnt mit rundzelliger Degeneration, in dessen Mitte schon die Zellen abgelöst sind und dadurch ein Loch bilden. Um das Loch sind traubenförmig angesammelte Rundzellen. Dies ist Stufe 1. Stufe 2 erreicht man bei weiterem Fortschreiten der Degeneration, wobei es mehr Rundzellen als gesund aussehende Zellen gibt. Bei Stufe 3 existieren nur noch vereinzelte Zellstränge.

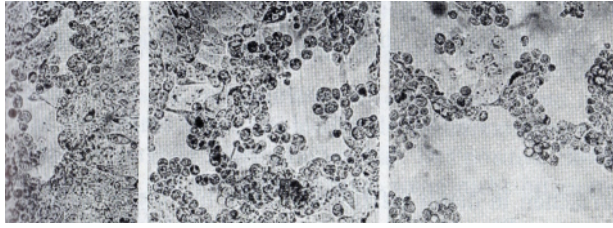


Abb. 7: traubenförmige rundzellige Zelldegeneration im Verlauf von 3 Beobachtungstagen

Degeneration mit Riesenzellen:

Sie enthalten zahlreiche Kerne, die sowohl zentral in Form eines Klumpens, oder peripher in Form eines Ringes angeordnet sind. Die Riesenzellen entstehen durch Fusion schon vorhandener Zellen.

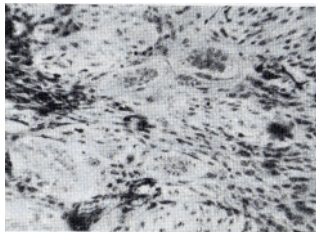


Abb. 8: Degeneration mit Riesenzellen

Vakuolige Degeneration:

Die Degeneration beginnt mit kleinen gleichmäßigen Vakuolen im Zytoplasma der Zelle. Im späteren Stadium greift die vakuolige Degeneration auf die Nachbarzellen über, wobei die einzelnen Vakuolen auch verschieden groß sein können. Im Endstadium besteht dann der gesamte Zellrasen nur noch aus vakuoligen Zellen, die allerdings noch am Boden haften können.

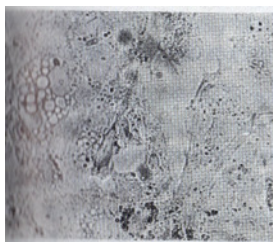


Abb. 9: Vakuolige Degeneration

4.4 Quantitative Auswertung:

Die quantitative Auswertung erfolgte durch lichtmikroskopische Untersuchung der Zellen. Hierbei wurde der Objektträger systematisch abgefahren und der Anteil der losgelösten Zellen aus dem Zellverband festgestellt.

Da keine Garantie für die absolute korrekte Anzahl der losgelösten Zellen gegeben werden konnte, wurde unterschieden zwischen 0-5%, 5-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95% und 95-100% Ablösungsquote. Mithilfe dieser Einteilung konnten mathematisch die quantitativen Veränderungen der Zellkulturen bestimmt werden.

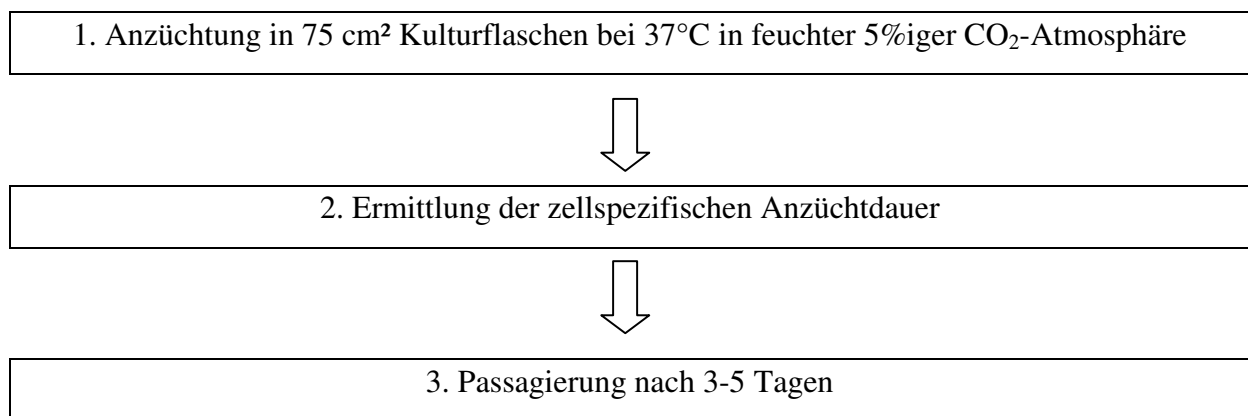
4.5 Aufbau der Versuchsreihen:

Die Versuchsreihen wurden nach dem nachfolgenden Algorithmus durchgeführt.

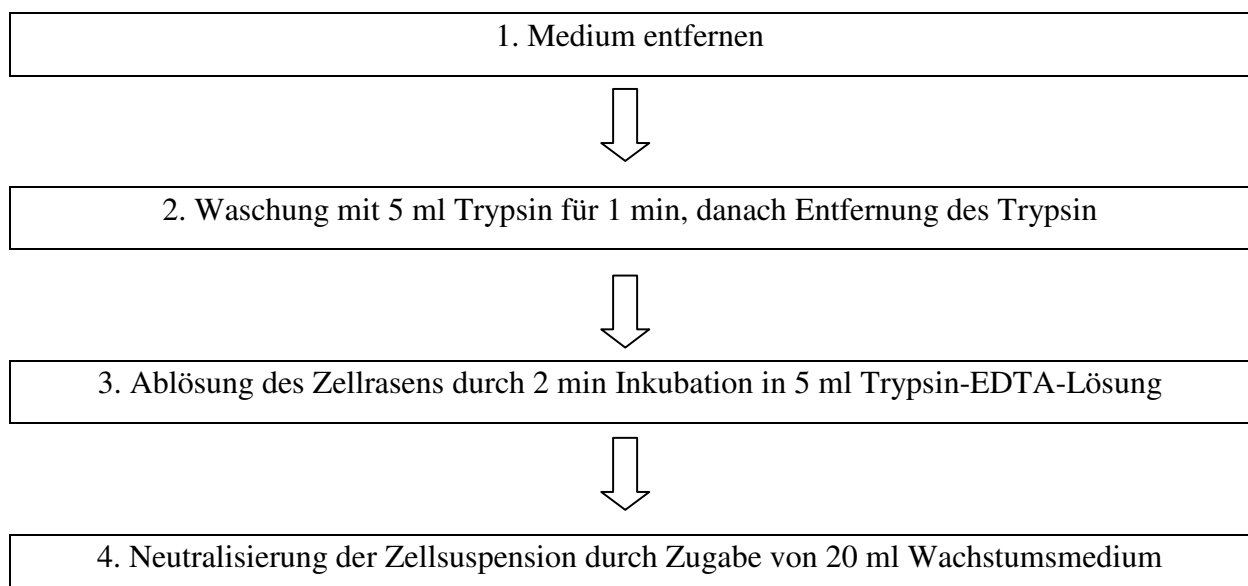
Die benutzten Konzentrationen sind in dem Algorithmus danach genannt.

Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen in Raumtemperatur durchgeführt.

4.5.1 Algorithmus zur Haltung der Zellkulturen



4.5.2 Algorithmus zur Passagierung der Zellkulturen:





5. Verteilung von 5 ml Zellsuspension in neue Kulturflasche
Zugabe von 20 ml Wachstumsmedium

4.5.3 Virusreplikation:

Laut Anleitung der ATCC, wurde das Reoviruslysate auf kultivierte Verozellen titriert. Nach 3-5 Tagen hatte sich das Virus in den Verozellen repliziert. Dies wurde durch den zytopathischen Effekt verifiziert.

Die Gewinnung von neuem Virusmaterial erfolgte nach folgendem Algorithmus.

1. Verozellenanzüchtung in 25 ml Wachstumsmedium in 75 cm² Kulturflasche mit täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle



2. Injektion von 0,5 ml konzentriertem Virusmaterial, erworben von der ATCC



3. Tägliche lichtmikroskopische Kontrolle und Bewertung des zytopathischen Effektes



4. Bei CPE Stufe 3, Entfernung der Zellfragmente vom Viruslysate, 2malige Zentrifugation für 10 min bei 1000 U/min, Isolierung des Überstandes, Verwerfen des Zellfragmentplatelet



5. Injektion von 5 ml neugewonnenem Viruslysate in Verozellenkultur mit 20 ml Wachstumsmedium



6. Tägliche lichtmikroskopische Kontrolle und Bewertung des zytopathischen Effektes



Bei CPE Stufe 3, weitermachen bei Punkt 4

4.5.4 Algorithmus zur Ultrazentrifugation:

1. Entfernung der Zellfragmente vom Viruslysate, 2malige Zentrifugation für 10 min bei 1000 U/min, Isolierung des Überstandes



2. Ultrazentrifugation des gereinigten Viruslysates für 2 h bei 4°C bei 80 000 g



3. Verwerfung des Überstandes, Loslösung des Virusplatelet mit 1 ml PBS def. bei 4°C für 24 h



4. Aliquotierung des neugewonnenen Ultrazentrifugats in Portionen à 1 ml

Die Konzentration in dem Ultrazentrifugat wurde mittels Realtime-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) quantitativ bestimmt.

Es zeigte sich hierbei, dass sämtliche Virusstämme unterschiedliche Konzentrationen aufwiesen, wobei der Mittelwert aus drei, zu verschiedenen Zeiten produzierten, Ultrazentrifugaten berechnet wurde.

Dieser Mittelwert wurde in die spätere Auswertung und in die Statistik mit eingebunden.

4.6 RT-PCR-Extraktion

Die Extraktion der Virus-RNA erfolgte streng nach Protokoll des Roche™ MagNA Pure LC Nucleic Acid Isolation Kit®. Die so gewonnene virale RNA wurde in der nachfolgenden RT-PCR als Real-Time PCR auf dem LightCycler amplifiziert.

Manuelle RNA-Isolierung mittels MagNA Pure Isolation Kit®



LightCycler®-RNA Amplification Kit: Vorbereiten der Virusproben und Reagenzien:
10µl Mastermix aus 4µl LC-RT-Puffer (5x Konz.), 1,7µl Wasser,
2,4µl MgCl₂ (6 mM), 1µl Primermix (0,5 µM), 0,5µl Sondenmix (0,3 µM), 0,4µl RT-
Enzymmix + 10µl Eluat des Virusultrazentrifugat



RT-PCR Amplifikation als 3fach-Ansatz



Programmierung des LightCycler®:
Reverse Transkription: 30 min, 55°C
Initiale Denaturation: 60 s, 95°C
60 Zyklen mit 1.) Denaturierung: 3s, 95°C; Annealing: 10s, 60°C; Extension: 8s, 72°C
Schmelzkurve zur Sicherung der Spezifität: von 50°C bis 80°C in 0,1°C/s-Schritten
Cooling 40 C für 30s

Die Auswertung erfolgte durch das angeschlossene Computerprogramm mittels second derivative Methode des LightCycler®.

Mittels RT-PCR besteht die Möglichkeit, sowohl qualitativ als auch quantitativ, Reovirus nachzuweisen. Die notwendige Primer wurde bereits in früheren Studien etabliert und eingesetzt, in unserer Arbeitsgruppe erfolgte der Gebrauch derselben Primer [63].

4.6.1 Etablierung der RT-PCR

Bisher existierte kein Protokoll für die RT-PCR zum Nachweis des Reovirus. Deshalb erfolgte die Etablierung eines Protokolls mit Modifizierung der Annealing Temperatur.

Annealing Temperatur

Zur Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur wurden verschiedene Temperaturen getestet: 55°C, 57°C, 60°C und 62°C mit jeweils drei Proben des Ultrazentrifugates der einzelnen Virussubtypen.

Die Primer wurden zunächst auf den Subtyp Dearing optimiert.

Der ct-Wert ist definiert als Übertritt der Fluoreszenzemission über den Schwellenwert.

Die optimale Temperatur wurde bei 60°C gefunden.

Annealing Temperatur °C	55	57	60	62
Lang	32.86	30.14	26.4	n.d.
Jones	34.13	33.87	32.09	n.d.
Abney	36.39	34.33	28.92	n.d.
Dearing	29.72	28.96	26,04	35.11

Tab. 1: Mittelwerte der ct-Wert bei verschiedenen Annealing Temperaturen

4.7 Endverdünnungstitration im Kulturröhrchentest:

Sämtliche Reovirusstämme wurden mittels Endverdünnungsmethode unter Beobachtung des zytopathischen Effekts (CPE) titriert.

Als Zellkontrollen wurden jedes Mal 10 nicht infizierte Röhrchen mitgeführt.

Pro Verdünnungsstufe wurden 10 Röhrchen angelegt.

Alle Reagenzien wurden auf 20°C vorgewärmt.

	Menge an Wachstumsmedium	Menge an Reovirus, Konzentration (gelöst in 0,4 ml Wachstumsmedium)
Röhrchen 1	3,6 ml	10^{-1} ml
Röhrchen 2	3,6 ml	10^{-2} ml
Röhrchen 3	3,6 ml	10^{-3} ml
Röhrchen 4	3,6 ml	10^{-4} ml
Röhrchen 5	3,6 ml	10^{-5} ml
Röhrchen 6	3,6 ml	10^{-6} ml
Röhrchen 7	3,6 ml	10^{-7} ml
Röhrchen 8	3,6 ml	10^{-8} ml
Röhrchen 9	3,6 ml	10^{-9} ml

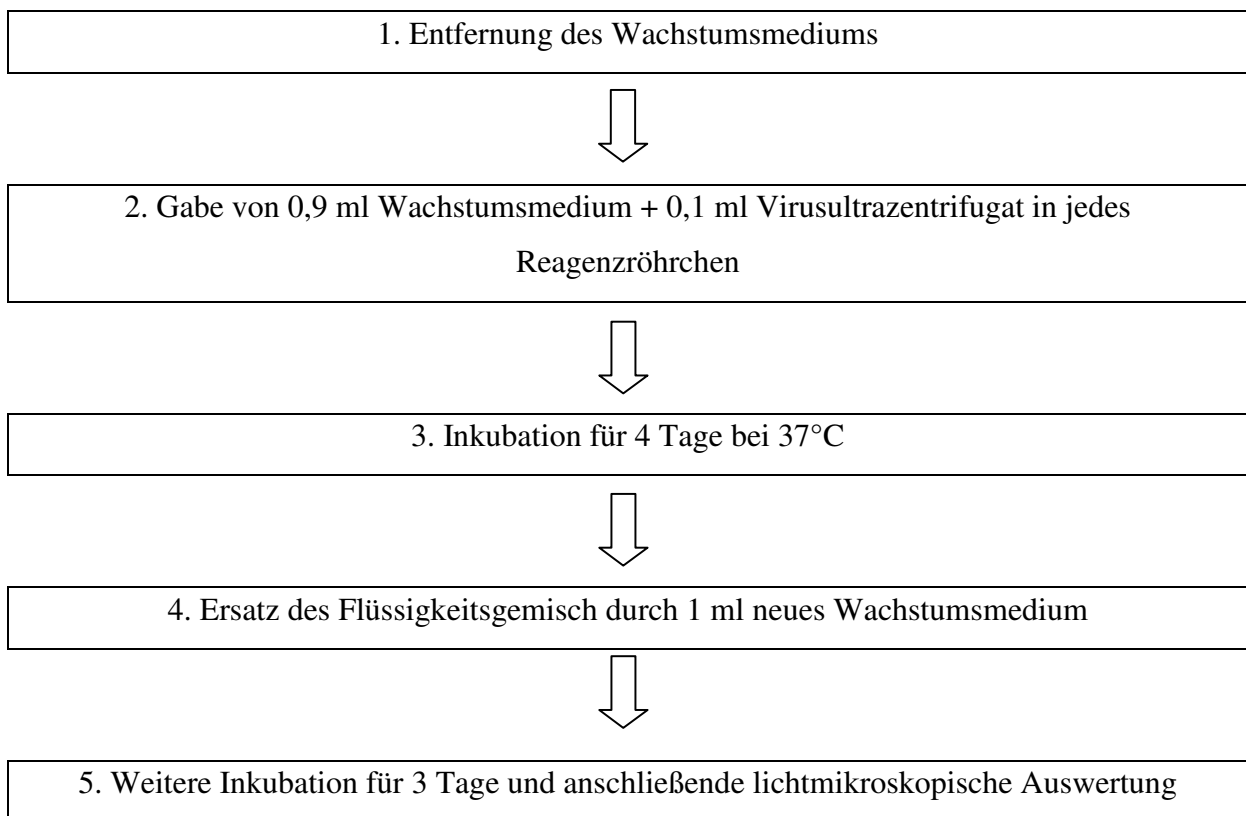
Röhrchen 10	3,6 ml	10^{-10} ml
-------------	--------	---------------

Tab.2: Aufbau der Endverdünnungsmethode

4.7.1 Vorbereitung:

Vor Versuchsbeginn wurden alle Röhrchen auf Intaktheit untersucht, damit sie später gasdicht verschlossen werden konnten und so ein Alkalisieren durch Abrauchen von CO₂ nicht möglich war. In jedes Röhrchen wurde 1,5 ml Wachstumsmedium mit 0,5 ml der verschiedenen Zellkulturen pipettiert und bei 37°C und feuchter 5%igen CO₂-Atmosphäre 2-4 Tage stationär inkubiert, bis der Zellrasen konfluent war.

4.7.2 Algorithmus zur Versuchsdurchführung:



4.7.3 Auswertung und Berechnung:

Die Röhrchen wurden täglich auf ihren zytopathische Effekt untersucht. War ein virusspezifischer zytopathische Effekt nachweisbar, so wurde dieses Röhrchen in die

Berechnung der TCID₅₀ (tissue culture infectious dose, Titer bei dem noch 50% der Röhren infiziert werden) als positiv einbezogen.

Die TCID₅₀ wurde nach der Methode von REED und MUENCH (1938) berechnet. Die Ergebnisse sind als TCID₅₀/0,1 ml Virusultrazentrifugat angegeben.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch lichtmikroskopische Bestimmung der Ablösungsrate der Zellen.

Hierbei erfolgte zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine Zählung der Zellen mit Vergleich zum Vortag. Dabei wurden am Boden haftende Zellen, auch bei morphologisch bereits zu erkennenden Veränderung als nicht abgelöst definiert.

Somit konnte eine exakte Ablösungsrate zu jedem Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden.

Als Referenzzelllinie dienten Verozellen, die auch als Anzuchtmedium für das Reovirus von der ATCC vorgeschlagen worden. Die Gewinnung des Ultrazentrifugats erfolgte durch ausschließliche Vermehrung auf Verozellen womit ein gewisser Standard etabliert werden konnte.

Sämtliche Untersuchungsergebnisse aus anderen Zelllinien wurden im Vergleich zu Verozellen gesetzt.

Die notwendige Viruskonzentration zum Erreichen eines CPE wurde gegen die Konzentration bei Verozellen verglichen, der als Standard 1 gesetzt wurde, d.h. die absolut gemessene Viruskonzentration bei Verozellen wurden als Konzentration 1 gesetzt und sämtliche Ergebnisse daraufhin korrigiert.

4.8 Immunhistochemischfluoreszierende Analyse:

4.8.1 Algorithmus zur Gewebepräparation:

1. Auftragen von 1 ml der Zellsuspension auf sterile Objektträger



2. Inkubation in QuadriPERM für 24 h bei 37°C, 5%ige Atmosphäre



3. Waschung mit PBS def. für 10 min



4. Fixierung in -20°C Methanol für 10 min und anschließender Lufttrocknung



5. 3 – malige Waschung für 3 min in PBS def. bei 80 U/min



6. Inkubation mit Peroxidaseblock für 10 min



7. 2 – malige Waschung in PBS def. für 3 min mit 80 U/min

4.8.2 Algorithmus zur Anfärbetechnik:

Die Bearbeitung der Reagenzien wurde nach Anleitung des beigelegten Immunoperoxidase Staining – Protokolls von Santa Cruz Biotech. durchgeführt.

Die fixierten Objektträger wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bearbeitet.

1. Inkubation des Objektträgers mit 100 μl Serumblock für 20 min



2. Aspiration des Serumblocks



3. Inkubation mit 4 μl primärer Ras-Protein Antikörper gelöst in 76 μl Serumblock für 2 h bei 37°C in 5%iger CO_2 – Atmosphäre



4. 3 – malige Waschung in PBS def. für je 3 min mit 40 U/min



5. Aspiration der restlichen Flüssigkeit



6. Abdunkelung des Experimentierfeldes



7. Inkubation mit 0,8 µl sekundärer Antikörper Rhodamin – Anti – Mouse – IgG, gelöst in 79,2 µl Serumblock für 60 min bei 37°C in 5%iger Atmosphäre



8. Einmalige Waschung in PBS def. für je 3 min mit 40 U/min



9. Einmalige Waschung in Aqua dest. für 3 min mit 40 U/min



10. Einmalige Waschung mit 70%igem Ethanol für 3 min mit 40 U/min



11. Einmalige Waschung mit 80%igem Ethanol für 3 min mit 40 U/min



12. Einmalige Waschung mit 99,8%igem Ethanol für 3 min mit 40 U/min



13. Lufttrocknung für 24 h bei 4°C



14. Fixierung mit Mounting Medium und Gegenfärbung mit DAPI (1 : 10 Verdünnung in PBS def.)

Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenz Mikroskop Olympus BX61/BX62 mit Quecksilberlampe U-LH 100 HGAP0, die Software ISIS V.4.1.8. und

FISH-Imager V.4.1.8. von Metasystems Altlußheim, freundlicherweise vom HNO-Labor der Universität des Saarlandes bereitgestellt.

4.8.3 Methodikevaluierung:

Zum qualitativen Nachweis von RAS – Protein wurde eine eigene immunhistochemischfluoreszierende Färbung etabliert.

Zur verbesserten Darstellung wurde immunhistochemische mit immunfluoreszierender Färbung kombiniert, als Kontrollreferenz dienten RAS-positive Kopfhautzellen, die auch in der Literatur als positive Kontrolle benutzt werden.

Als RAS-negative Kontrolle wurden Fibroblasten aus der Vorhaut benutzt, welche auch nicht mit Reovirus interagierten. Durch die hier benutzte Färbung konnte diese RAS-Negativität qualitativ bestätigt werden.

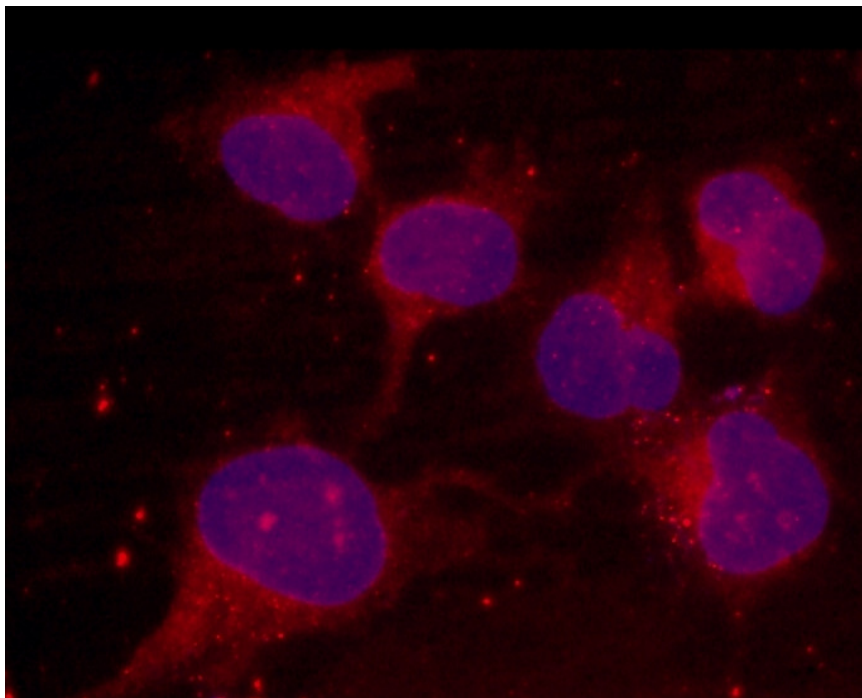


Abbildung 10: Kopfhautzellen, die laut übereinstimmenden Herstellerangaben H-RAS-positiv

4.9 Statistische Verfahren:

4.9.1 Median:

Als Lagemaß wurde der Median benutzt, weil die Originaldaten nicht normalverteilt waren. In fast allen Testreihen waren sogenannte Ausreißer zu finden, die zu einer Verzerrung der Ergebnisse bei Gebrauch des arithmetischen Mittels geführt hätten.

4.9.2 Korrektur der TCID₅₀

Bisher wurde noch keine Standardisierung zum Wirkungsgrad bei Reovirus durchgeführt. Hierfür wurde mit Hilfe der RT-PCR die quantitative Menge an Virusgenom bestimmt. Als Standardreferenz diente die gewonnene Virusmenge nach Anzucht auf Verozellen. Anschließend erfolgte in Abhängigkeit vom Ergebnis der RT-PCR und der Anzahl der Zyklen zum quantitativen Nachweis des Reovirus die Korrektur der festgestellten TCID₅₀ auf die Primärkulturen.

Hierbei wurde die Tatsache berücksichtigt, dass 3 Zyklen in der RT-PCR-Messung des LightCycler® als 1 logarithmische Potenz angesehen werden [43, 57].

Sämtliche dezimalen Werte im Ergebnisteil sind nach dieser Methode korrigiert worden.

5 Ergebnisse:

5.1 Quantifizierung der Virusstämme und Reproduzierbarkeit der Anzuchtung:

In den Hauptversuchen sollte die onkolytische Eigenschaft verschiedener Reoviren überprüft werden. Hierzu waren Vorversuche notwendig, um die Ausgangsmenge an Virus exakt zu quantifizieren. Dies wurde mittels RT-PCR durchgeführt.

Dazu wurde von jedem Virustyp für drei, zu verschiedenen Zeitpunkten produzierten, Ultrazentrifugaten durch Hilfe der RT-PCR die Menge an Virusgenom quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 aufgeführt.

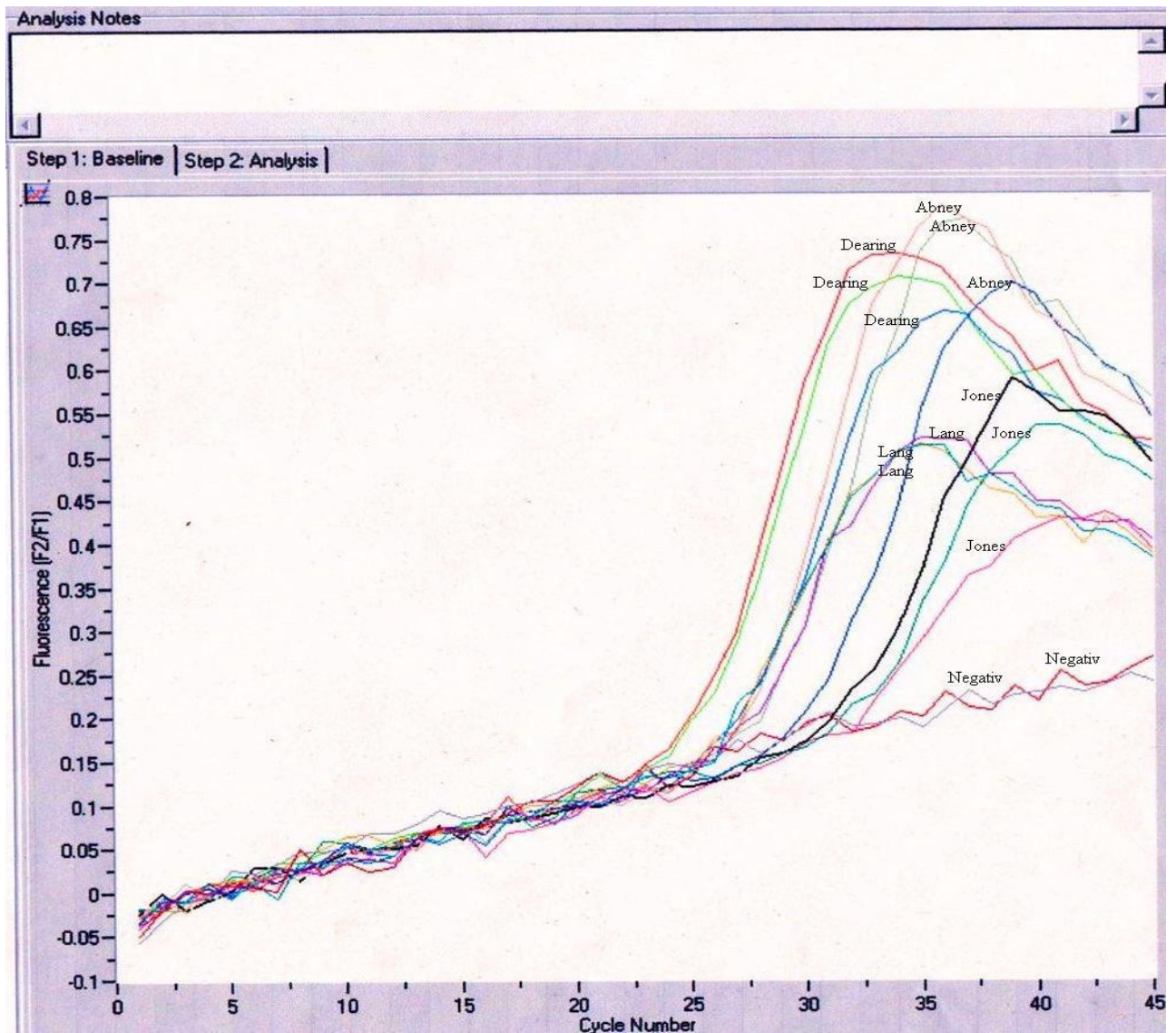


Abbildung 1: Ergebnis der RT-PCR zur Quantifizierung von Virus-RNA für die verschiedenen Subtypen. In dieser Grafik aufgeführt sieht man die Anzahl der Zyklen, die der LightCycler® benötigt, um die jeweilige Virus-RNA nachzuweisen. In der nachfolgenden Tabelle ist die absolute Anzahl der Zyklen angegeben. Man erkennt, dass z.B. Jones nach ca. 32 Zyklen nachgewiesen, im Gegensatz dazu benötigt Dearing nur ca. 26 Zyklen. Dies bedeutet, dass die Konzentration an Virus bei Dearing höher ist als bei Jones, somit mehr Virus im Ultrazentrifugat vorhanden ist. Das heißt, dass bei der Anzüchtung mehr Virus bei Dearing freigesetzt wurde als bei Jones. Zusätzlich lief zur Evaluierung eine Negativkontrolle. Hier wurde erwartungsgemäß kein Virusmaterial nachgewiesen.

Anzumerken ist, dass bei Subtyp Abney in einer Probe ein relativ niedriger Wert (ct: 30,41) gemessen wurde, der allerdings noch im akzeptablen Rahmen ist.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass in allen Versuchsansätzen die Viruskonzentration individuell für jeden Subtyp sehr konstant war.

Zwischen den Subtypen gab es allerdings signifikante Unterschiede, die niedrigste Replikationsrate konnte bei Jones festgestellt werden, während die Replikationsrate bei Lang und Dearing um ungefähr den Faktor 100 höher war.

Diese Viruskonzentration wurde in der späteren Auswertung und in der Berechnung der Wirksamkeit miteinbezogen und so der Wirkungsgrad für jeden einzelnen Subtyp korrigiert.

Virus	Anzahl der PCR-Zyklen bis Nachweis	Datum der Erstellung der Probe
Lang Probe 1	27.09	31.3.05
Lang Probe 2	26.19	4.1.05
Lang Probe 3	25.92	25.12.04
Mittelwert Lang	26.4	
Jones Probe 1	32.01	31.3.05
Jones Probe 2	31.84	2.8.05
Jones Probe 3	32.41	31.3.05
Mittelwert Jones	32.09	

Dearing Probe 1	27.20	4.1.05
Dearing Probe 2	25.53	2.8.05
Dearing Probe 3	25.39	31.3.05
Mittelwert Dearing	26.04	
Abney Probe 1	30.41	5.1.05
Abney Probe 2	28.71	25.12.04
Abney Probe 3	27.63	31.3.05
Mittelwert Abney	28.92	

Tabelle 3: Absolute Anzahl der Zyklen bis zum Nachweis des Reovirus-Subtypes

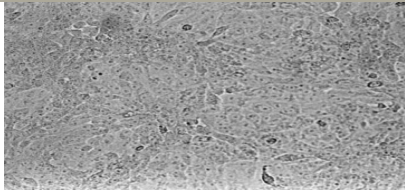
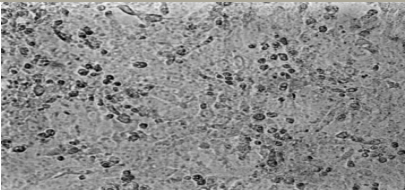
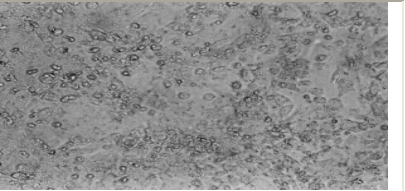
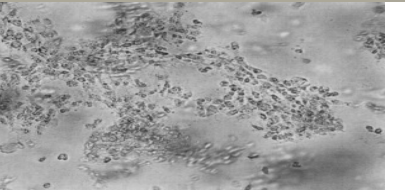
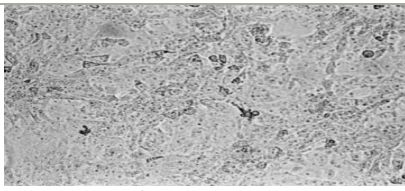
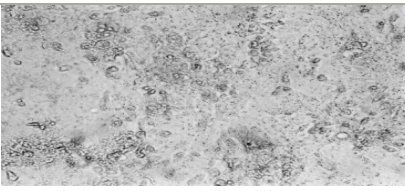
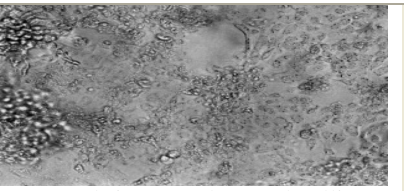
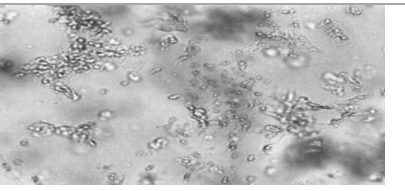
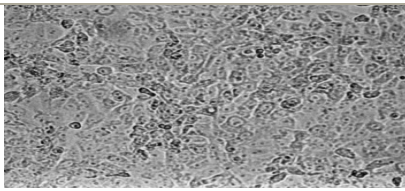
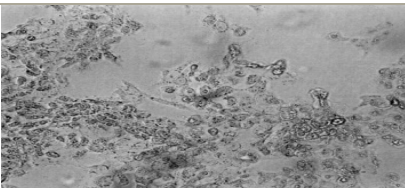
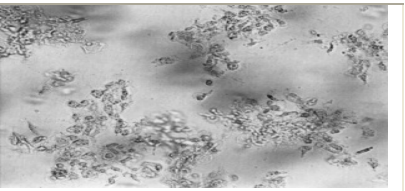
5.2 Qualitative Wirkung in vitro:

Bei den verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche CPE festgestellt, diese wurden morphologisch alle 24 h lichtmikroskopisch bewertet und dokumentiert. Sämtliche qualitative Unterschiede in Bezug auf Morphologie und CPE werden im Folgenden für die einzelnen Zelllinien tabellarisch aufgelistet.

Zusätzlich ist die Anzüchtungsdauer bis zur Bildung eines zellichten Rasens angegeben.

5.2.1 Verozellen:

Anzüchtungszeit: 3-4 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	t = 96 h
Lang	 keine Änderungen	 Leichtgradige polymorphzellige Degeneration CPE: Grad I	 Deutliche polymorphzellige Degeneration CPE: Grad I	 Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III
Jones	 Verstärkt auftretende Zellgrenzen	 Deutliche polymorphzellige Degeneration, vereinzelte Zellagglutinationen, noch erkennbare Zellverbandsstruktur CPE: Grad I	 Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, diffus-schwache Zellverbandsablösung, intrazellulär deutliches Hervortreten von Zellorganellen und Nucleus CPE: Grad II	 Generalisierte polymorphzellige Degeneration, Ablösung der meisten Zellen CPE: Grad III
Dearing	 Hervortreten des Zytoplasma Verdunkelung der Zelle mit verstärkt auftretenden Zellgrenzen → polymorphzellige Degeneration Grad I, Agglutinationen von Zellorganellen	 Deutliche traubenförmige polymorphzellige Degeneration, Zellgruppenablösung, Hervortreten des Nucleus und Zellorganellen mit Konglomeratbildung; CPE: Grad I	 Generalisierte polymorphzellige Degeneration, Ablösung mehrerer Zellgruppen CPE: Grad III	n.d.

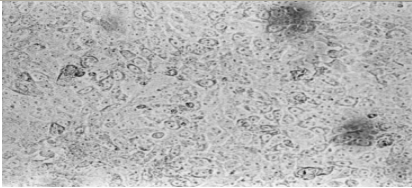
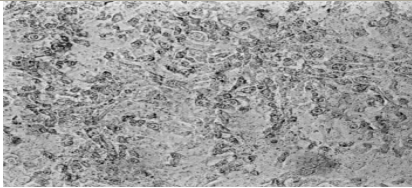
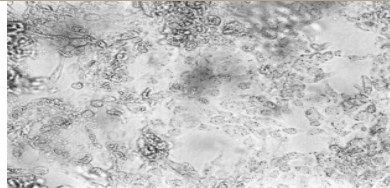
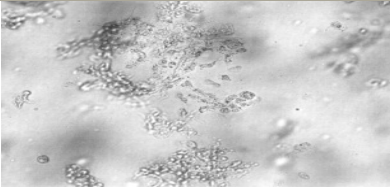
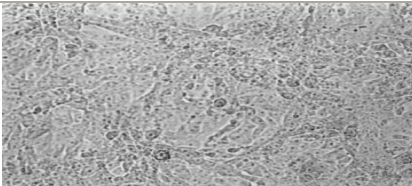
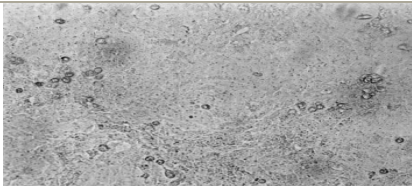
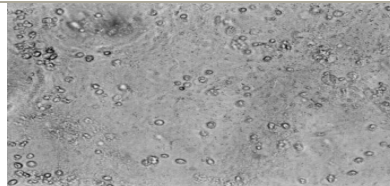
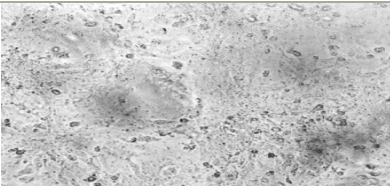
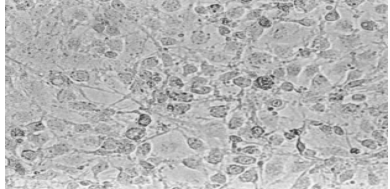
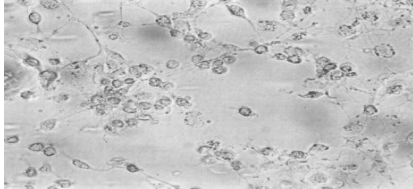
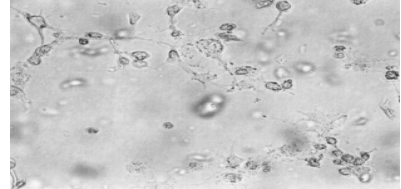
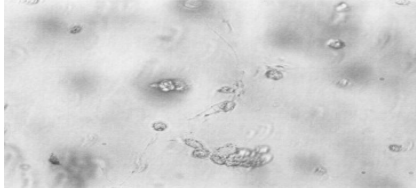
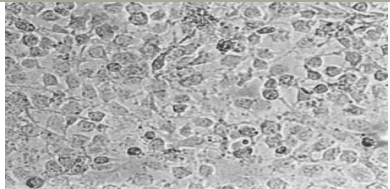
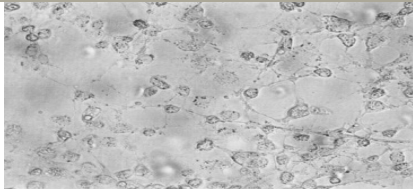
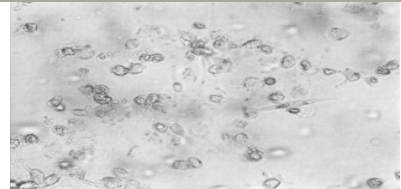
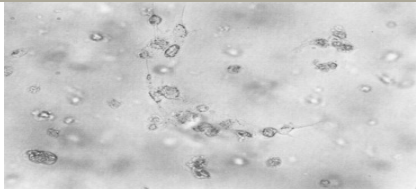
Abney	 <p>verstärkt auftretende Zellgrenzen</p>	 <p>Rundzellige Zelldegeneration CPE: Grad I</p>	 <p>Fortgeschrittene rundzellige Degeneration, diffus-schwache Zellverbandsablösung, intrazellulär deutliches Hervortreten von Zellorganellen und Nucleus CPE: Grad II</p>	 <p>Generalisierte rundzellige Degeneration, Ablösung der meisten Zellen CPE: Grad III</p>
Kontrolle				

Tabelle 4: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur Verozellen vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 96$ h

Durch diese Zellreihe konnte bestätigt werden, dass das Reovirus zytotoxisch und zytolytisch auf Verozellen in vitro wirkt.

5.2.2 U373 Glioblastomzellkultur:

Anzüchtungsdauer: 3-4 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	t = 96 h
Lang	 <p>Hervortreten des Zytoplasma mit deutlicher Zellabgrenzung</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, auflösen interzelluläre Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als Konglomerate und des Nucleus, diffuse großflächige Zellablösung CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Leichte morphologische Strukturänderungen mit Zelldeformation mit deutlicher Zellabgrenzung, vereinzelt Zellablösung, vereinzelt intrazelluläres Auftreten der Zellorganellen als Konglomerate</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, vereinzelte Zellagglutinationen, noch vorhandene Strukturierung des Zellverbandes CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als Konglomerate und des Nucleus, diffuse großflächige Zellablösung CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, großflächige Zellablösung CPE: Grad III</p>

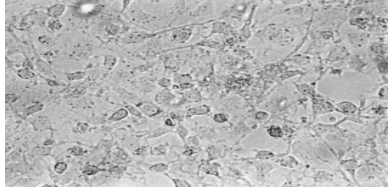
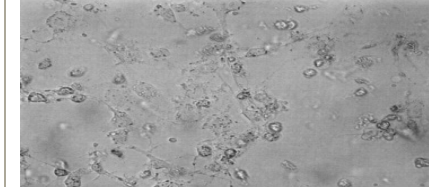
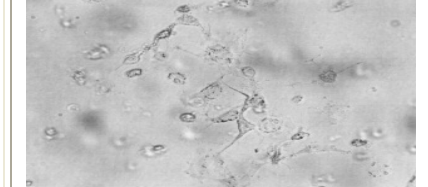
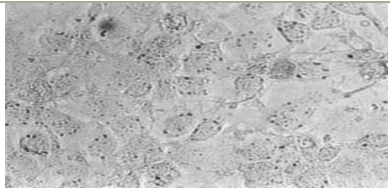
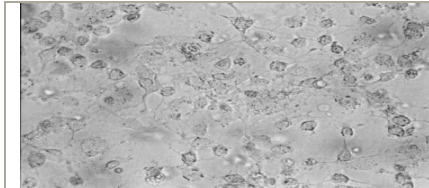
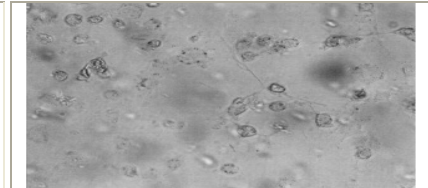
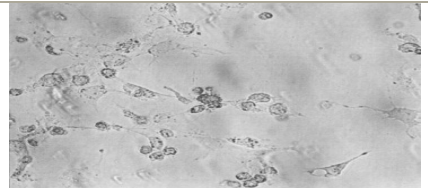
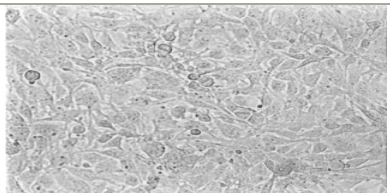
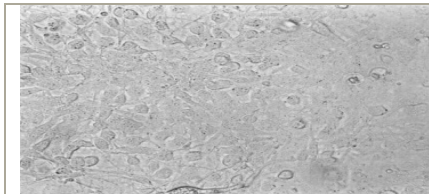
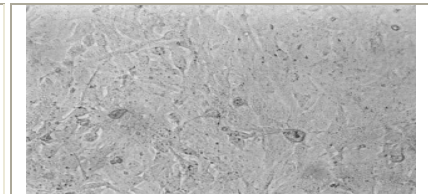
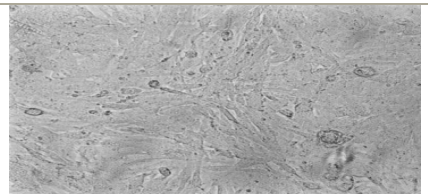
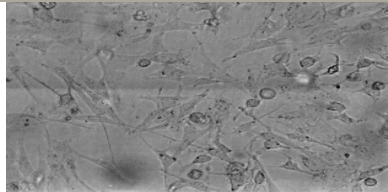
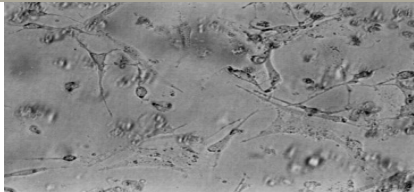
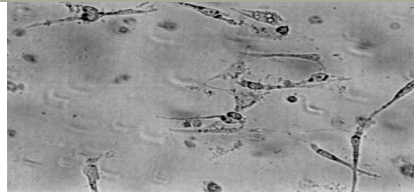
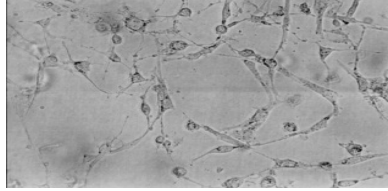
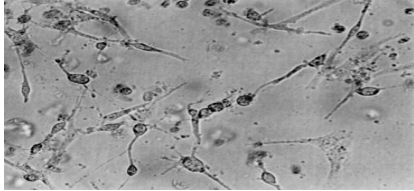
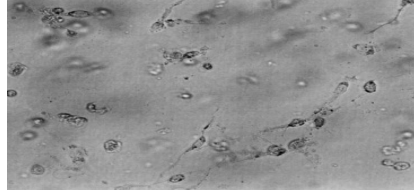
Dearing	 <p>Hervortreten des Zytoplasma mit Verdunkelung der Zelle, deutliche Zellabgrenzung → Polymorphzellige Degeneration Grad I, Agglutinationen von Zellorganellen</p>	 <p>Deutliche polymorphzellige Degeneration, ausgeprägte Zellablösung, vereinzelte Zellgrüppchen ohne interzelluläre Verbindungen, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als ausgeprägte Konglomerate und des Nucleus CPE: Stufe II</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als ausgeprägte Konglomerate und des Nucleus, großflächige Zellablösung CPE: Grad III</p>	<p>n.d.</p>
Abney	 <p>Zelldeformation mit deutlicher Zellabgrenzung, vereinzelte Zellablösung, Agglutination von Zellorganellen als Konglomerate, noch keine generalisierte Zelldegeneration</p>	 <p>Rundzellige Zelldegeneration CPE: Grad I</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten von Zellorganellen als Konglomerate und des Nucleus, diffus vereinzelte Zellablösung CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, großflächige Zellablösung CPE: Grad III</p>
Kontrolle				

Tabelle 5: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur U373 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 96$ h

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die etablierte Glioblastomzelllinie U373 durch das Reovirus in vitro zerstört wird.

5.2.3 T3095:

Anzüchtungsdauer: 3 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
Lang	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, persistierende interzelluläre Verbindungen, intrazellulär Auftreten der Zellorganelle als ausgeprägte Konglomerate und des Nucleus CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomeratenbildung, Verkleinerung der Zellkörper, diffuse großflächige Zellablösung mit vereinzelt persistierenden Zellen mit frei flottierenden Dendriten CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als deutliche Konglomerate und des Nucleus, persistierende interzelluläre Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, Verkleinerung der Zellkörper, diffuse großflächige Zellablösung mit vereinzelt persistierenden Zellen mit frei flottierenden Dendriten CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>

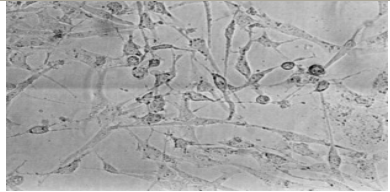
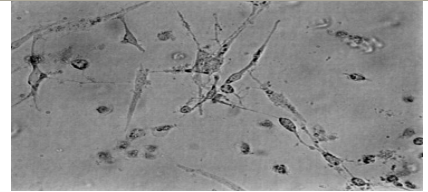

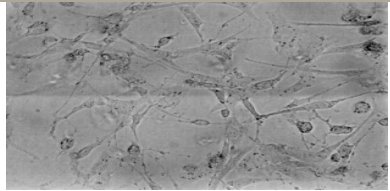

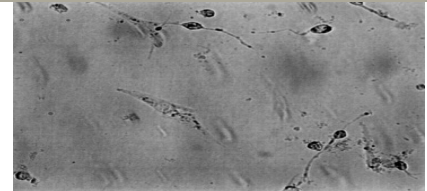
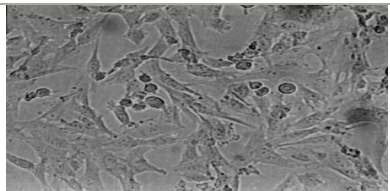
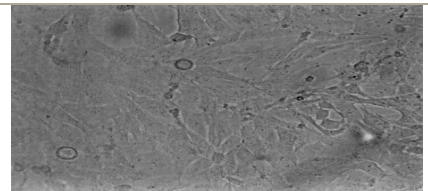
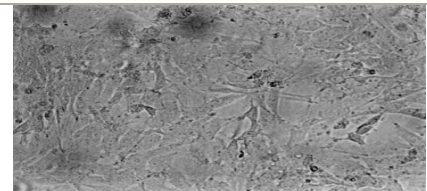
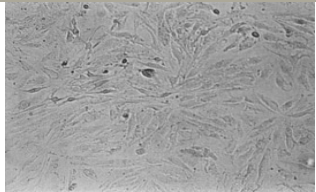
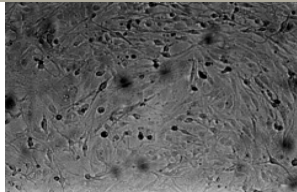
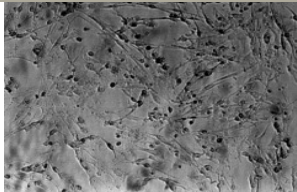
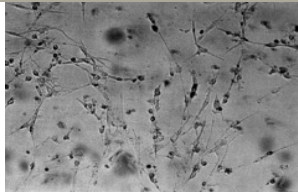
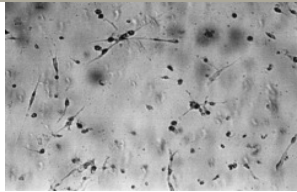
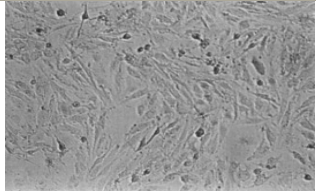
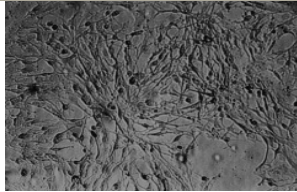
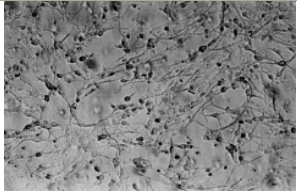
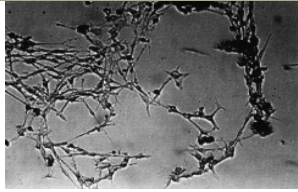
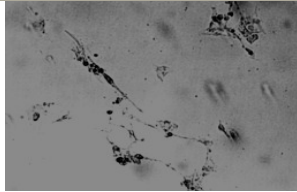
<p>Dearing</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als deutliche Konglomerate und des Nucleus, persistierende interzelluläre Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, Verkleinerung der Zellkörper, diffuse großflächige Zellablösung mit vereinzelt persistierenden Zellen mit frei flottierenden Dendriten CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>
<p>Abney</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten der Zellorganellen als deutliche Konglomerate und des Nucleus, deutlich persistierende interzelluläre Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, Verkleinerung der Zellkörper, diffuse großflächige Zellablösung mit vereinzelt persistierenden Zellen mit frei flottierenden Dendriten CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>
<p>Kontrolle</p>			

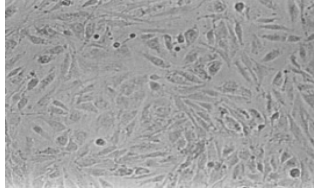
Tabelle 6: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur T3095 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 72$ h

5.2.4 T6217:

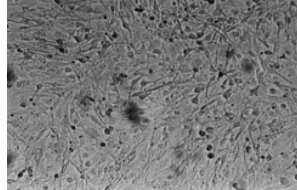
Anzüchtungszeit: 5 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	t = 96 h	t = 120 h
Lang	 <p>Vereinzelt hervortretende Zellgrenzen</p>	 <p>Leichtgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten von Zellorganellen, vereinzelte Auflösung interzelluläre Verbindungen mit Divergenztendenz der Zellen CPE: Grad I</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Konglomeratbildung und Auftreten des Nucleus, mäßig-diffuse Zellablösung, Persistenz von vitalen Zellen ohne morphologische Veränderungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, ausgeprägte Zellablösung, Ausbildung eines retikulären Netzwerkes der verbliebenen Zellen CPE: Grad II</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Vereinzelt hervortretende Zellgrenzen</p>	 <p>Leichtgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten von Zellorganellen, vereinzelte Auflösung interzelluläre Verbindungen CPE: Grad I</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Konglomeratbildung und Auftreten des Nucleus, diffuse Zellablösung CPE: Grad I-II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazelluläre Konglomerate, ausgeprägte Zellablösung, Ausbildung eines retikulären Netzwerkes der verbliebenen Zellen, vereinzelte Zellgruppierung CPE: Grad II</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration CPE: Grad III</p>

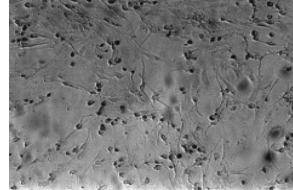
Dearing



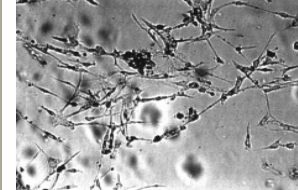
Vereinzelt hervortretende Zellgrenzen



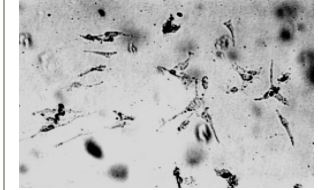
Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten der Zellorganellen als Konglomerate und des Nucleus, Auflösen interzellulärer Verbindungen
CPE: Grad I-II



Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomeratbildung, beträchtliche diffuse Zellablösung
CPE: Grad II

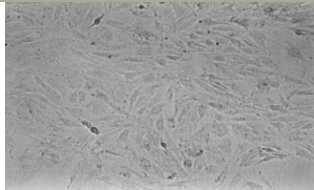


Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, ausgeprägte Zellablösung, Ausbildung eines retikulären Netzwerkes der verbliebenen Zellen, vereinzelte Ausbildung von Zellgruppierung
CPE: Grad II-III

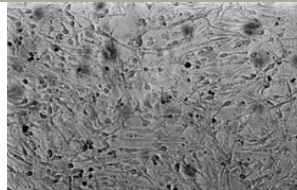


Generalisierte polymorphzellige Degeneration
CPE: Grad III

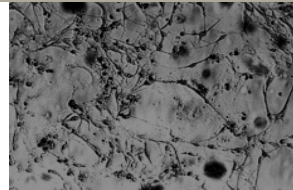
Abney



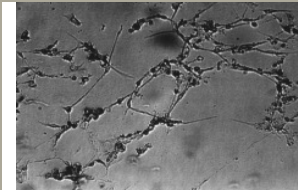
Vereinzelt hervortretende Zellgrenzen



Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten der Zellorganellen als Konglomerate und des Nucleus, Auflösen interzellulärer Verbindungen
CPE: Grad I-II



Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomeratbildung, beträchtliche diffuse Zellablösung
CPE: Grad II



Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, ausgeprägte Zellablösung, Ausbildung eines retikulären Netzwerkes der verbliebenen Zellen, vereinzelte Ausbildung von Zellgruppierung
CPE: Grad II-III



Generalisierte polymorphzellige Degeneration
CPE: Grad III

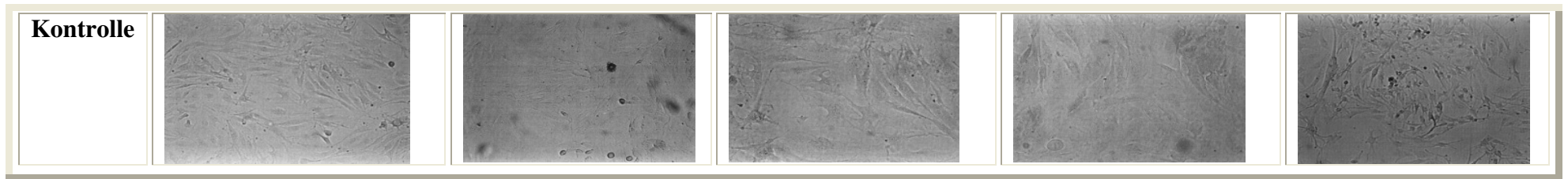
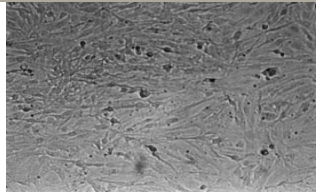
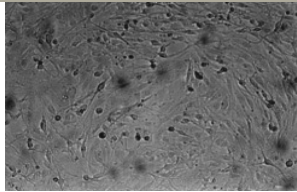
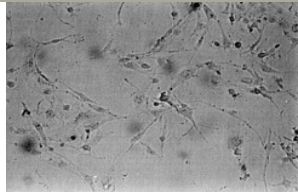
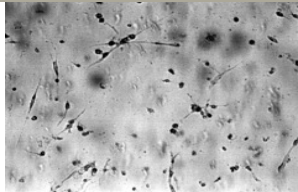
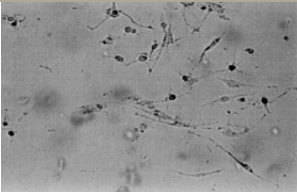
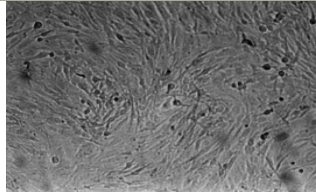
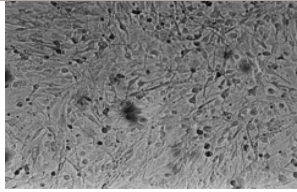
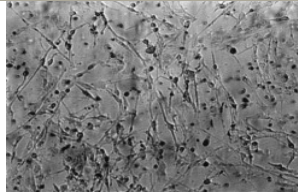
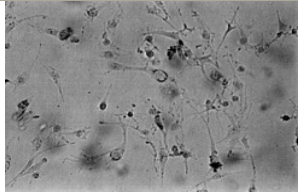
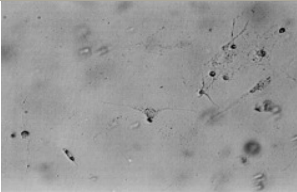


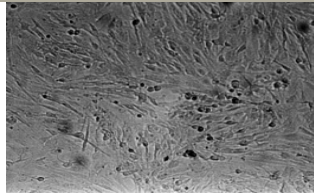
Tabelle 7: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur T6217 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 120$ h

5.2.5 T6208:

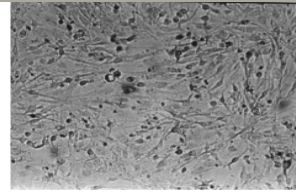
Anzüchtungszeit: 4 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	t = 96 h	t = 120 h
Lang	 <p>Leichte sichtbare morphologische Zellkörperänderungen. Vereinzelte Einzelzellisolierung mit deutlicher Zellabgrenzung</p>	 <p>Leichtgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten von Zellorganellen, beginnendes Auflösen interzellulärer Verbindungen CPE: Grad I</p>	 <p>Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Auftreten von Konglomeraten aus Zellorganellen und des Nucleus, beträchtlich-diffuse Zellablösung, CPE: Grad II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, großflächig-diffuse Zellablösung CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, vereinzelt persistierende Zelle mit CPE - Veränderung CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Leichte sichtbare morphologische Zellkörperänderungen. Vereinzelte Einzelzellisolierung mit deutlicher Zellabgrenzung</p>	 <p>Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten von Zellorganellen und des Nucleus, beginnendes Auflösen interzellulären Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Ausbildung von Konglomerate aus Zellorganellen, rudimentär ausgeprägte interzelluläre Verbindungen, gering-diffuse Zellablösung CPE: Grad II</p>	 <p>Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, diffus-großflächige Zellablösung, vereinzelt persistierende retikuläre interzelluläre Verbindungen CPE: Grad II-III</p>	 <p>Generalisierte polymorphzellige Degeneration, vereinzelt persistierende Zelle mit CPE-Veränderung CPE: Grad III</p>

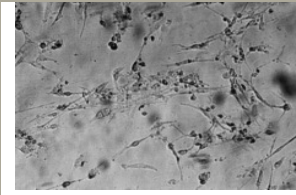
Dearing



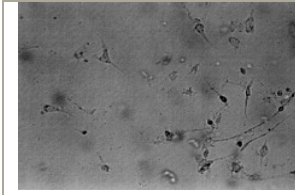
Leichte sichtbare morphologische Zellkörperänderungen. Vereinzelte Einzelzellisolierung mit deutlicher Zellabgrenzung



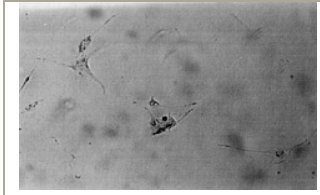
Mittelgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten von Zellorganellen und des Nucleus, beginnendes Auflösen interzellulären Verbindungen
CPE: Grad I-II



Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Ausbildung von Konglomerate aus Zellorganellen, gering-diffuse Zellablösung, noch vital ausgebildete interzelluläre Verbindungen
CPE: Grad II

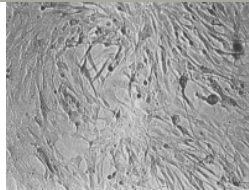


Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, diffus-großflächige Zellablösung, vereinzelt persistierende retikuläre interzelluläre Verbindungen
CPE: Grad II-III

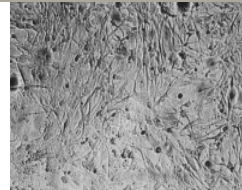


Generalisierte polymorphzellige Degeneration, vereinzelt persistierende Zelle mit CPE-Veränderung
CPE: Grad III

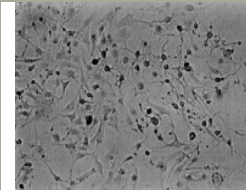
Abney



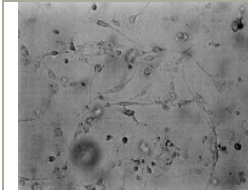
Leichte sichtbare morphologische Zellkörperänderungen. Vereinzelte Einzelzellisolierung mit deutlicher Zellabgrenzung



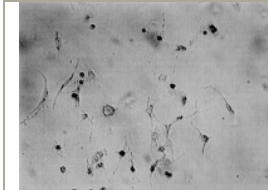
Leichtgradige polymorphzellige Degeneration, intrazelluläres Auftreten von Zellorganellen und des Nucleus, beginnendes Auflösen interzellulären Verbindungen
CPE: Grad I



Ausgeprägte polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Ausbildung von Konglomerate aus Zellorganellen, gering-diffuse Zellablösung, nur noch vereinzelt bestehende rudimentär ausgebildete interzelluläre Verbindungen
CPE: Grad II



Fortgeschrittene polymorphzellige Degeneration, intrazellulär Verstärkung der Konglomerate, diffus-großflächige Zellablösung
CPE: Grad II-III



Generalisierte polymorphzellige Degeneration, vereinzelt persistierende Zelle mit CPE-Veränderung
CPE: Grad III

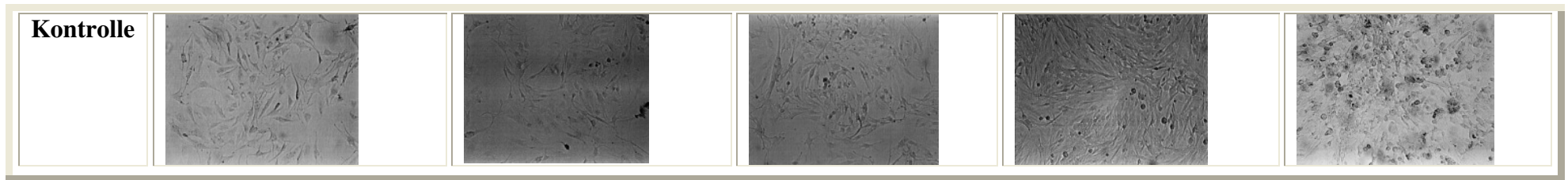


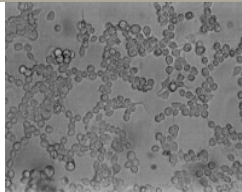
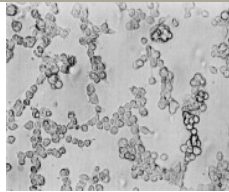
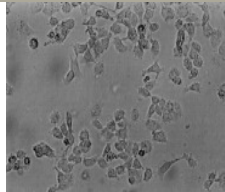
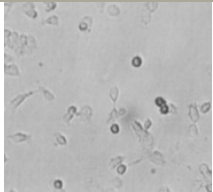
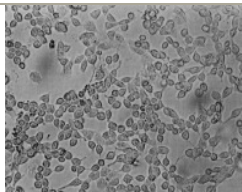
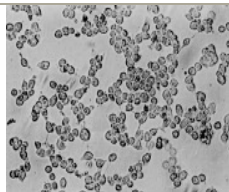
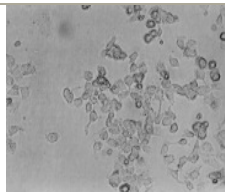
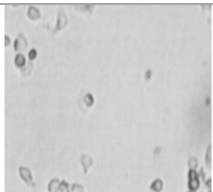
Tabelle 8: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur T6208 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 120$ h

Diese kultivierte Probenbiopsie T6208 zeigt eine sehr ungeordnete Strukturierung. Sie ist morphologisch der vorherig besprochenen Probenbiopsie T6217 sehr ähnlich.

Die interzellulären Verbindungen sind nicht kontinuierlich vorhanden, dennoch ist ein regelrechter Zellverband erkennbar.

5.2.6 T3868:

Anzüchtungszeit: 3 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h	t = 96 h
Lang	 <p>leichte Änderungen in der Verbandsstruktur mit perlenartiger Zell-zu-Zell-Verbindungen</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband mit perlenartigen Zell-zu-Zell-Verbindungen. Deutliche Ablösungstendenz CPE: Grad I-II</p>	 <p>Verstärkung des Strukturverlustes mit verstärkter Apoptose Fragmentierungsprozessen Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst. Vereinzelte vitale Zellen CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, diffuse Zell-zu-Zell-Verbindungen</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, grüppchenartige Zell-zu-Zell-Verbindungen, Zellablösungstendenz CPE: Grad I-II</p>	 <p>Strukturverlust mit Ablösung aus dem Zellverband, Bildung von Zellinseln, vereinzelt verbunden, verstärkte Apoptose z.T. Fragmentierung, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst. Vereinzelte vitale Zellen CPE: Grad III</p>

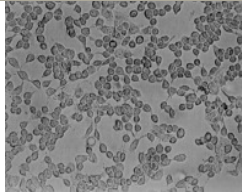
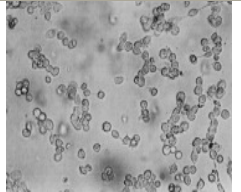
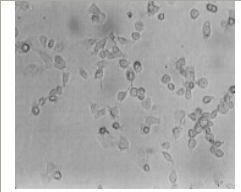
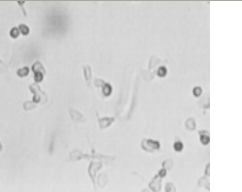
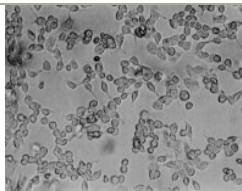
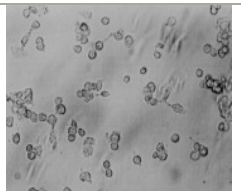
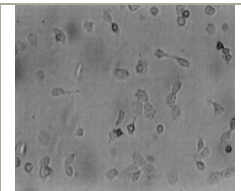
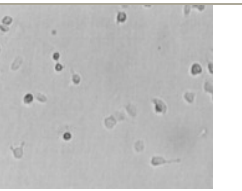
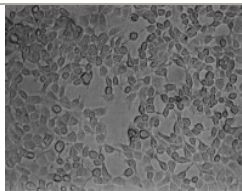
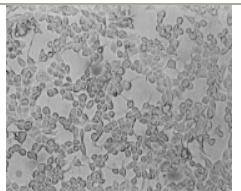
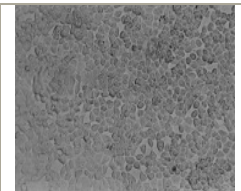
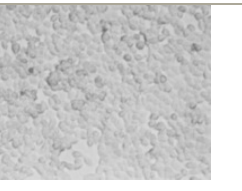
Dearing	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, perlenartige Zell-zu-Zell-Verbindungen</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, grüppchenartige Zell-zu-Zell-Verbindungen, verstärkte Apoptose und Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, diffuse Ablösung mit vereinzelt Zell-zu-Zell-Verbindungen, verstärkte Apoptose und Fragmentierung CPE: Grad II-III</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst. Vereinzelt vitale Zellen CPE: Grad III</p>
Abney	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, perlenartige Zell-zu-Zell-Verbindungen</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, perlen- und grüppchenartige Zell-zu-Zell-Verbindungen, leichte Apoptose und Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad I-II</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, verstärkte Apoptose und Fragmentierung der Zellen CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst, vereinzelt vitale Zellen CPE: Grad III</p>
Kontrolle				

Tabelle 9: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur T3868 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 96$ h

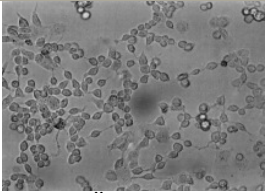
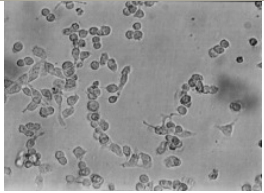
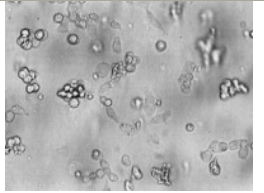
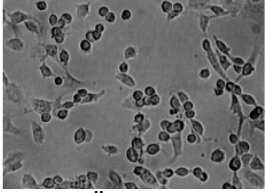
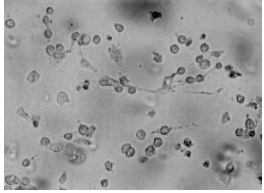
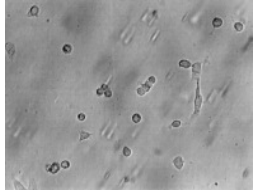
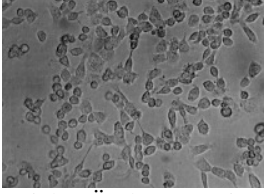
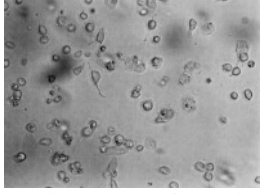
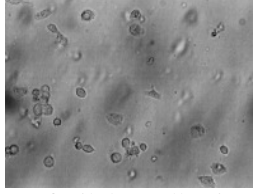
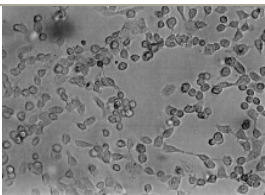
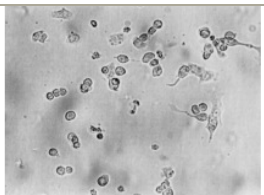
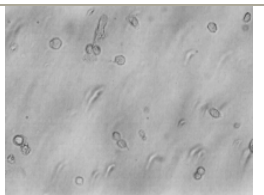
Diese kultivierte Probebiopsie besitzt mikroskopisch eine andere Morphologie als die bisher beschriebenen Zellkulturen. Im Gegensatz zum einheitlichen Zellverband der anderen Zelllinien, sind hier die Zellen auch im nativen Präparat gut voneinander abzugrenzen. Nur vereinzelt existieren Zellgruppen von ungefähr 10 bis 20 Zellen, die eine Art von Zellgruppenunterverband ausbilden.

Die hauptsächlich schon ellipsoiden bis runden Zellen zeigen bereits lichtmikroskopisch eine starke Brechung, sodass eine Beurteilung des CPE anhand der Änderung der Zellmorphologie nur eingeschränkt möglich ist.

Die Beurteilung erfolgte deshalb anhand der Ablösungskinetik.

5.2.7 T3564:

Anzüchtungszeit: 3 Tage

	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
Lang	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, grüppchenförmige Ablösung, perlenartige CPE: Grad I</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, verstärkte Apoptose und Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst, deutliche apoptotische Änderungen CPE: Grad III</p>
Jones	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, diffuse Ablösung, perlenartige Zell-zu-Zellendriten-Verbindungen CPE: Grad I-II</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, verstärkte Apoptose und Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen abgelöst, deutliche apoptotische Änderungen CPE: Grad III</p>
Dearing	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, grüppchenförmige Ablösung, perlenartige Zell - zu - Zellausläufern - Verbindungen CPE: Grad I - II</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, verstärkte Apoptose und Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst, deutliche apoptotische Änderungen CPE: Grad III</p>
Abney	 <p>Leichte Änderungen in Verbandsstruktur, grüppchenförmige Ablösung, perlenartige Zell - zu - Zellausläufern - Verbindungen CPE: Grad I</p>	 <p>Strukturverlust im Zellverband, verstärkte Apoptose und teilweise Fragmentierung der Zellen, Auftreten von Zellorganellen und Nukleus CPE: Grad II</p>	 <p>Großteil der Zellen ist abgelöst, deutliche apoptotische Änderungen CPE: Grad III</p>

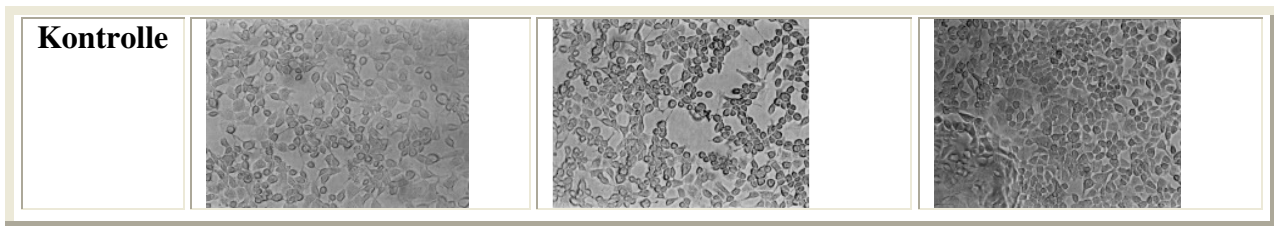


Tabelle 10: Entwicklung des zytopathischen Effektes der Zellkultur T3564 vom Zeitpunkt $t = 24$ h bis $t = 72$ h

Auch diese kultivierte Probenbiopsie besitzt mikroskopisch eine andere Morphologie vergleichbar mit der Morphologie der biopsierten Probe T3868. Der Unterschied zwischen diesen beiden Proben war in der Wachstumsgeschwindigkeit und in der Reaktion auf das Reovirus zu erkennen. Sie wuchs langsamer, anstatt nach 3 Tagen konnte erst nach 5 Tagen eine Passagierung durchgeführt werden.

Eine Beurteilung des CPE war bei den hauptsächlich schon ellipsoiden bis runden Zellen mit schon lichtmikroskopisch starker Brechung nur eingeschränkt möglich, sodass die Bewertung des CPE anhand der Änderung der Zellverbandsmorphologie erfolgte.

Allerdings haften die Zellen am Boden und das bunte native Zellbild erlaubt vereinzelt eine Bewertung des CPE.

5.2.8 Vorhaut-Fibroblasten:

Anzüchtungszeit: 4-5 Tage

Diese Kultur zeigte keinerlei Reaktion auf die Beimpfung mit Reovirus.

Selbst nach Injektion von 3 ml Ultrazentrifugat, konnte kein Effekt festgestellt werden.

Zusammenfassend scheinen die hier verwendeten Vorhaut-Fibroblasten nicht mit Reovirus infizierbar zu sein.

5.2.9 Zusammenfassung:

	Zeitlich	Morphologisch
Hohe Effektivität	T3564, T3095	T3095
Durchschnittliche Effektivität	Vero, U373, T3868	Vero, U373, T3868, T3564, T6208
Niedrige Effektivität	T6217, T6208	T6217

Tabelle 11: Empfindlichkeit der untersuchten Zellkulturen auf Reovirus

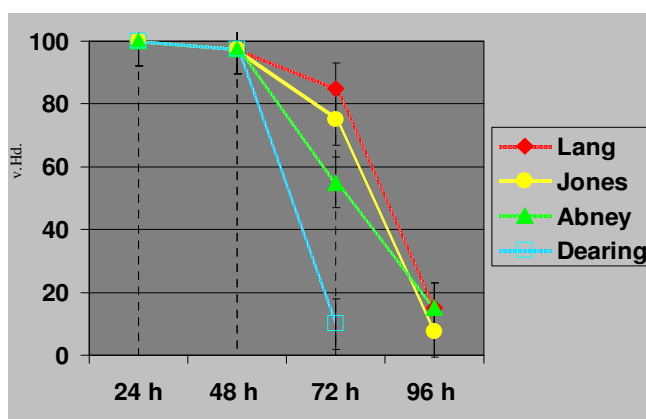
5.3 Quantitative Wirkung von verschiedenen Reovirus-Stämmen auf verschiedene Zellkultursysteme

Es sollte geklärt werden, ob die verschiedenen Reovirusstämme eine unterschiedliche Absterbekinetik der Zellen in den einzelnen Zellkulturen induzieren.

Hierzu wurden die Stämme Lang, Jones, Abney und Dearing lichtmikroskopisch auf den Zellkulturen Verozellen, U373, T3095, T6217, T6208, T3868 und T3564 untersucht. Die Kinetiken wurden zu den Zeitpunkten 24h, 48h, 72h, 96h und 120h analysiert.

5.3.1 Auswertung der Absterbekinetik der einzelnen Zellkulturen:

Verozellen:

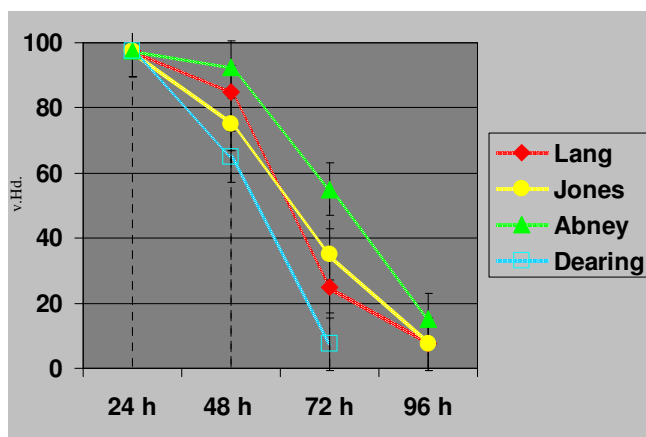


Virus	24h	48h	72h	96h
Lang	0%	0-5%	10-20%	80-90%
Jones	0%	0-5%	20-30%	90-95%
Abney	0%	0-5%	20-30%	90-95%
Dearing	0%	10-20%	90-95%	X

Abbildung 2: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 48h erkannt werden, dabei zeigte Dearing das deutlichste lytische Potential, Lang das Geringste, die Unterschiede zwischen Abney, Jones und Lang waren ähnlich.

U373:

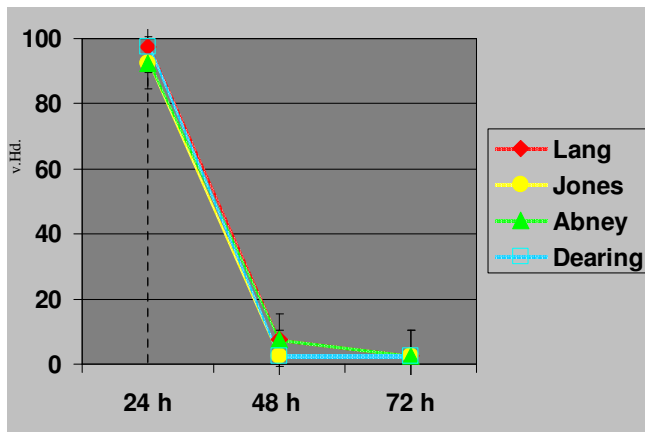


Virus	24h	48h	72h	96h
Lang	0-5%	10-20%	70-80%	90-95%
Jones	0-5%	20-30%	60-70%	90-95%
Abney	0-5%	5-10%	40-50%	80-90%
Dearing	0-5%	30-40%	90-95%	>95%

Abbildung 3: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 48h erkannt werden, dabei zeigte Dearing das deutlichste lytische Potential, Abney das Geringste, die Unterschiede zwischen Jones und Lang waren unerheblich.

T3095:

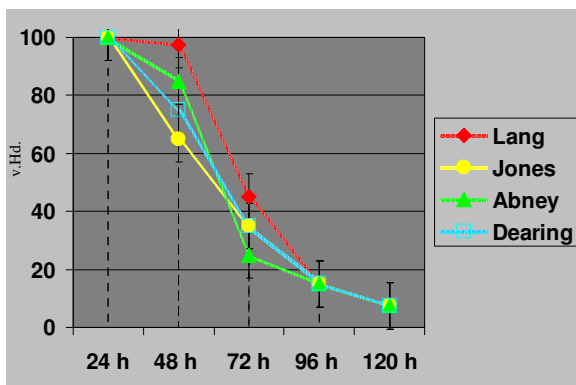


Virus	24h	48h	72h
Lang	0-5%	90-95%	>95%
Jones	5-10%	>95%	X
Abney	5-10%	90-95%	>95%
Dearing	0-5%	>95%	X

Abbildung 4: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 24h erkannt werden, dabei zeigten Dearing und Jones das deutlichste lytische Potential, Abney und Lang das Geringste.

T6217:

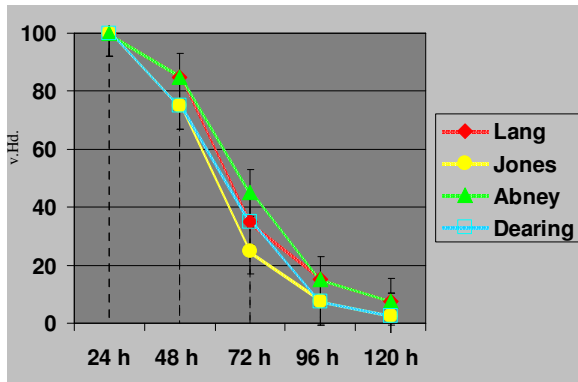


Virus	24h	48h	72h	96h	120h
Lang	0%	5-10%	50-60%	80-90%	90-95%
Jones	0%	30-40%	60-70%	80-90%	90-95%
Abney	0%	10-20%	70-80%	80-90%	90-95%
Dearing	0%	20-30%	60-70%	80-90%	90-95%

Abbildung 5: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 48h erkannt werden, dabei zeigte Abney und Jones das deutlichste lytische Potential, Lang das Geringste. Der zu beobachtende Effekt zeigte die Unterschiede nur bis 72h, danach waren die Unterschiede zwischen allen Stämmen nur unerheblich.

T6208:

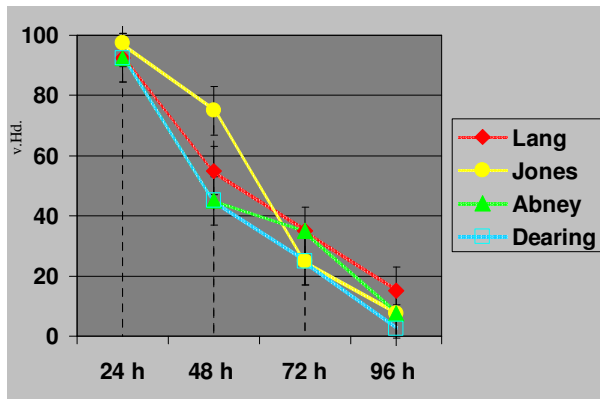


Virus	24h	48h	72h	96h	120h
Lang	0%	10-20%	60-70%	80-90%	90-95%
Jones	0%	20-30%	70-80%	90-95%	>95%
Abney	0%	10-20%	50-60%	80-90%	90-95%
Dearing	0%	20-30%	60-70%	90-95%	>95%

Abbildung 6: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 48h erkannt werden, dabei zeigte Dearing und Jones das deutlichste lytische Potential, Lang und Abney das Geringste.

T3868:

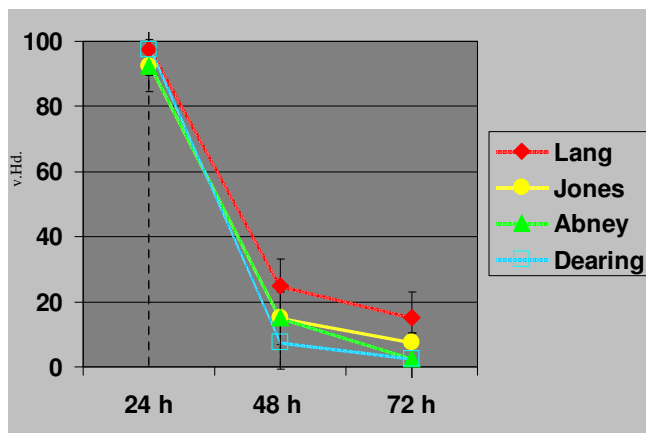


Virus	24h	48h	72h	96h
Lang	5-10%	40-50%	60-70%	80-90%
Jones	0-5%	20-30%	70-80%	90-95%
Abney	0-5%	50-60%	60-70%	90-95%
Dearing	5-10%	50-60%	70-80%	>95%

Abbildung 7: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 24h erkannt werden, dabei zeigte Dearing das deutlichste lytische Potential, Lang das Geringste, die Unterschiede zwischen Jones und Lang waren unerheblich. Allerdings gab es im Beobachtungsverlauf Unterschiede, hier zeigte Abney nach 48h eine schnellere Absterbekinetik, die allerdings nach 72h durch Jones aufgeholt wurde.

T3564:



Virus	24h	48h	72h
Lang	0-5%	70-80%	80-90%
Jones	5-10%	80-90%	90-95%
Abney	5-10%	80-90%	>95%
Dearing	0-5%	90-95%	>95%

Abbildung 8: Prozentsatz der vitalen Zellen in Abhängigkeit von der Wirkungsdauer nach Reovirusinjektion in %, relative Werte in Tabelle (Fehlerbalken entsprechend des Prozentsatzes, Tabelle rot: höchste Rate, grün: niedrigste Rate).

Ein erster zytopathischer Effekt konnte nach 24h erkannt werden, dabei zeigten Dearing, Jones und Abney das deutlichste lytische Potential, Lang das Geringste.

Zusammenfassung

	Hohe Effektivität	Durchschnittliche Effektivität	Niedrige Effektivität
Verozellen	Dearing	Jones, Abney	Lang
U373	Dearing	Jones, Lang	Abney
T3095 (52j Mann, GBM IV)	Jones, Dearing	Abney, Lang	X
T6217 (70j Mann, diffuses GBM IV, Riesenzellen)	X	Lang, Jones, Abney, Dearing	X
T6208 (53j Mann, diffuses GBM IV, p21-negativ)	X	Jones, Dearing	Lang, Abney
T3868 (49j Frau, GBM IV)	Dearing	Jones, Abney	Lang
T3564 (54j Frau, GBM IV, Pons)	Dearing, Abney	Jones	Lang

Tabelle 12: Quantitative Empfindlichkeit nach lichtmikroskopischer Observation der einzelnen Zellkulturen für Reovirusstypen

5.3.2 Virustypspezifisches Wirkungsprofil:

Morphologisch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Virustypen im CPE.

In der Absterbekinetik der Zellen zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Virussubtypen.

Typ I Lang:

Zelllinie	Effekt nach t = 24 h (%)	Effekt nach t = 48 h (%)	Effekt nach t = 72 h (%)	Effekt nach t = 96 h (%)	Effekt nach t = 120 h (%)
U373	0-5	10-20	70-80	90-95	-
T6217	X	5-10	50-60	80-90	90-95
T6208	X	10-20	60-70	80-90	90-95
T3868	5-10	40-50	60-70	80-90	90-95
T3564	0-5	70-80	80-90	90-95	-
T3095	0-5	90-95	>95	-	-
Vero	X	0-5	10-20	80-90	90-95

Tabelle 13: Ablösungsrate der einzeln getesteten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zeit bei Typ I Lang, Rot markiert: höchste Rate, grün markiert: niedrigste Rate

Typ II Jones:

Zelllinie	Effekt nach t = 24 h (%)	Effekt nach t = 48 h (%)	Effekt nach t = 72 h (%)	Effekt nach t = 96 h (%)	Effekt nach t = 120 h (%)
U373	0-5	20-30	60-70	90-95	-
T6217	X	30-40	60-70	80-90	90-95
T6208	X	20-30	70-80	90-95	>95
T3868	0-5	20-30	70-80	90-95	-
T3564	5-10	80-90	90-95	-	-
T3095	5-10	>95	-	-	-
Vero	X	0-5	20-30	90-95	-

Tabelle 14: Ablösungsrate der einzeln getesteten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zeit bei Typ II Jones, Rot markiert: höchste Rate, grün markiert: niedrigste Rate

Typ III Abney:

Zelllinie	Effekt nach t = 24 h (%)	Effekt nach t = 48 h (%)	Effekt nach t = 72 h (%)	Effekt nach t = 96 h (%)	Effekt nach t = 120 h (%)
U373	0-5	5-10	40-50	80-90	-
T6217	X	10-20	70-80	80-90	90-95
T6208	X	10-20	50-60	80-90	90-95
T3868	0-5	50-60	60-70	90-95	-
T3564	5-10	80-90	>95	-	-
T3095	5-10	90-95	>95	-	-
Vero	X	0-5	20-30	90-95	-

Tabelle 15: Ablösungsrate der einzeln getesteten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zeit bei Typ III Abney, Rot markiert: höchste Rate, grün markiert: niedrigste Rate

Typ III Dearing:

Zelllinie	Effekt nach t = 24 h	Effekt nach t = 48 h	Effekt nach t = 72 h	Effekt nach t = 96 h	Effekt nach t = 120 h
U373	0-5	30-40	>90	-	-
T6217	X	20-30	60-70	80-90	90-95
T6208	X	20-30	60-70	90-95	>95
T3868	5-10	50-60	70-80	>95	-
T3564	0-5	90-95	>95	-	-
T3095	0-5	>95	-	-	-
Vero	X	10-20	90-95	-	-

Tabelle 16: Ablösungsrate der einzeln getesteten Zellkulturen in Abhängigkeit von der Zeit bei Typ III Dearing, Rot markiert: höchste Rate, grün markiert: niedrigste Rate

5.3.3 TCID₅₀ in Abhängigkeit von Zellkultur und Virustyp:

In der folgenden Tabelle wird dargestellt, wie viel Virusultrazentrifugat benötigt wurde um die TCID₅₀ zu erreichen. Dies erfolgte nach Korrektur durch die quantitative Bestimmung der Virusmenge im Ultrazentrifugat mittels RT-PCR erstellt.

	Lang	Jones	Dearing	Abney
Verozellen	2.) 10 ^{-1,710}	4.) 10 ^{-3,909}	3.) 10 ^{-3,319}	1.) 10 ^{-1,560}
U373	3.) 10 ^{-2,721}	4.) 10 ^{-3,231}	1.) 10 ^{-2,116}	2.) 10 ^{-2,519}
T3095	3.) 10 ^{-2,543}	4.) 10 ^{-2,826}	2.) 10 ^{-1,810}	1.) 10 ^{-1,540}
T6217	1.) 10 ^{-2,566}	4.) 10 ^{-3,683}	3.) 10 ^{-3,484}	2.) 10 ^{-3,411}
T6208	3.) 10 ^{-3,308}	4.) 10 ^{-3,769}	1.) 10 ^{-2,551}	2.) 10 ^{-2,702}
T3868	4.) 10 ^{-3,700}	1.) 10 ^{-2,759}	3.) 10 ^{-3,621}	2.) 10 ^{-3,174}
T3564	2.) 10 ^{-3,771}	3.) 10 ^{-4,532}	4.) 10 ^{-5,780}	1.) 10 ^{-3,147}

Tabelle 17: TCID₅₀ der einzelnen untersuchten Zelllinien im Vergleich zu den Virustypen, nach logarithmischem Angleich der quantitativen RT-PCR. Die höchste Konzentration an Virusgenom für die TCID₅₀ wurde mit **1.)** bezeichnet und der Reihe folgend zur niedrigsten Konzentration, die mit **4.)** bezeichnet wurde.

Nach mathematischer Korrektur in Abhängigkeit der quantitativen Menge an Virus pro Ultrazentrifugat evaluiert für die einzelnen Zellkulturen in Abhängigkeit zu den einzelnen Virusstämmen

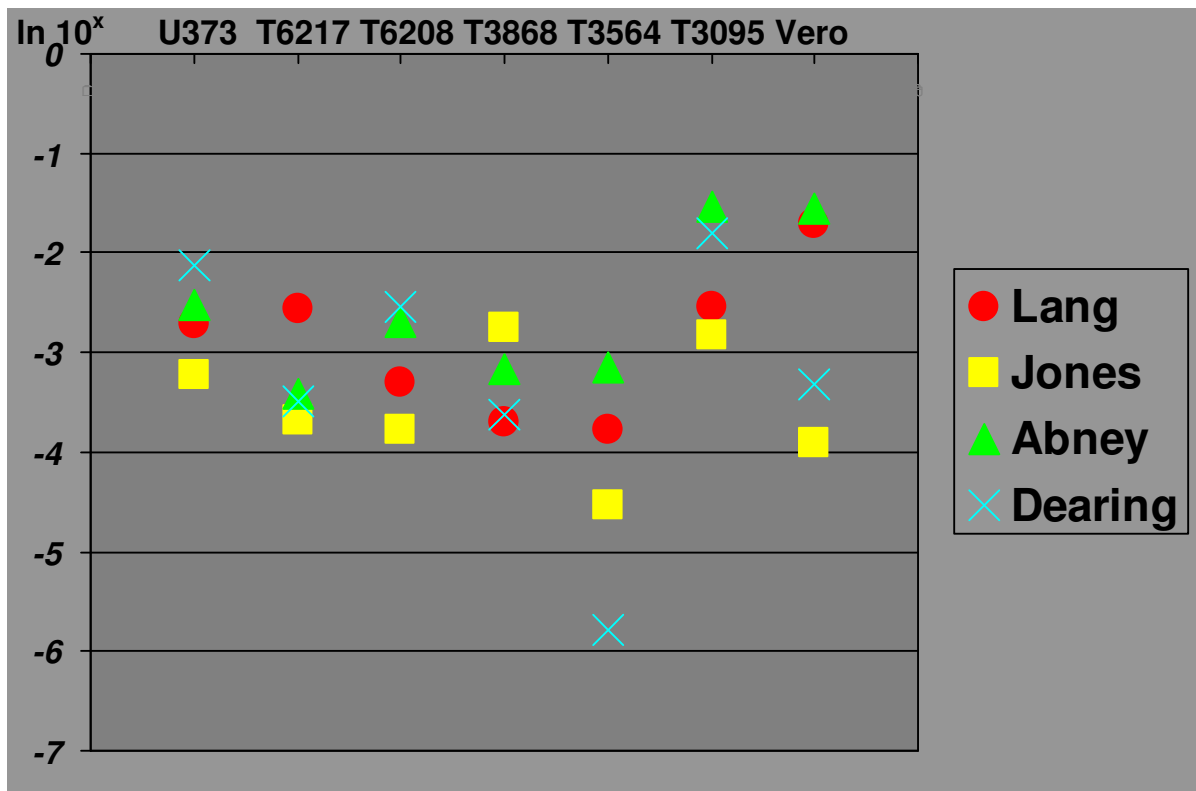


Abbildung 9: graphische Darstellung der TCID₅₀, man erkennt, dass Typ II Jones mit Ausnahme der Zellkultur T3868 und T3564 bei sämtlichen Zellkulturen die niedrigste Menge an Virus benötigt, um die TCID₅₀ zu erzielen.

Man erkennt, dass der Typ II Jones durchschnittlich die niedrigste Konzentration an Virusmenge benötigte, um die TCID₅₀ zu erlangen. Typ III Abney benötigt durchschnittlich die höchste Konzentration an Virusgenom, um die TCID₅₀ zu erreichen.

Hiermit benötigt Typ III Abney die meiste Virusmenge, gefolgt von Typ I Lang, dann Typ III Dearing und schließlich Typ II Jones, der die geringste Virusmenge benötigt.

5.4 Immunhistochemische RAS-Färbung:

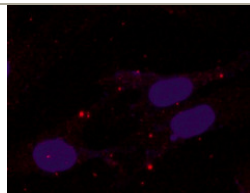
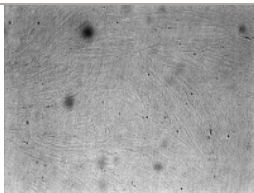
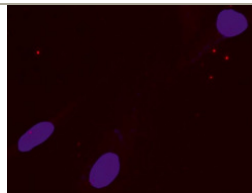
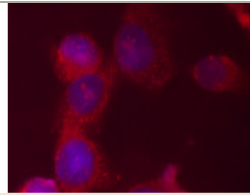
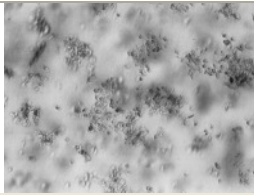
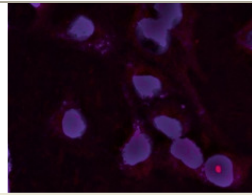
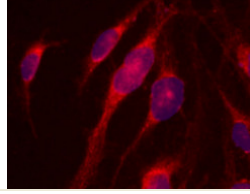
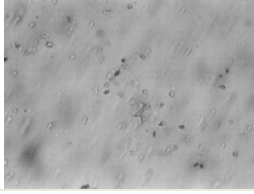
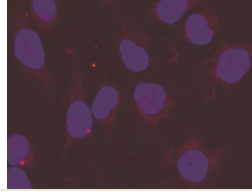
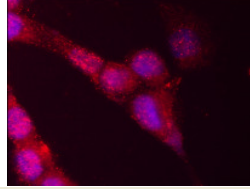
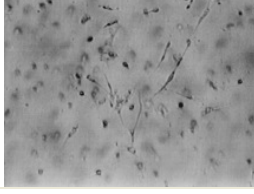
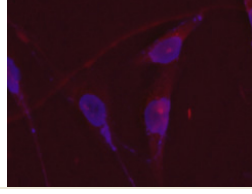
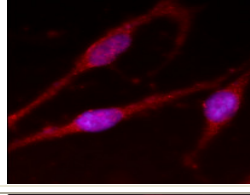
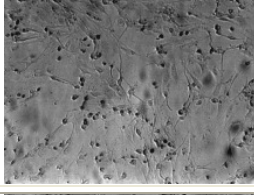
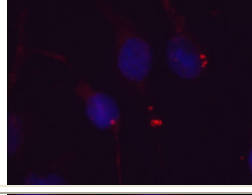
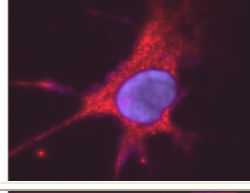
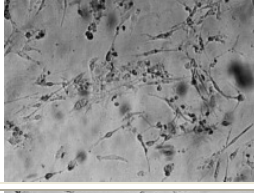
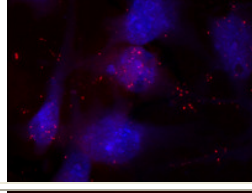
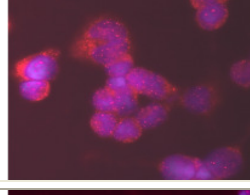
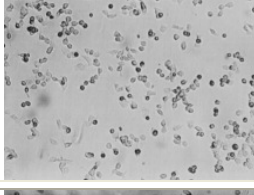
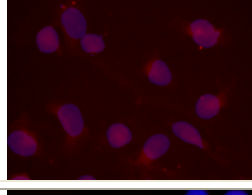
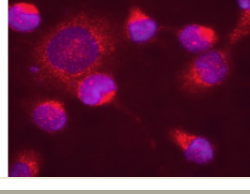
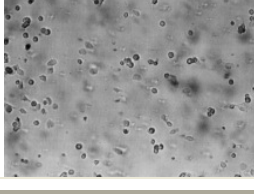
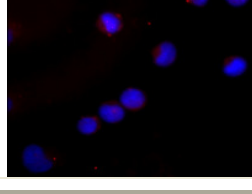
	H-RAS Färbung	t = 72 h mit Infektion von Dearing	Negativkontrolle
Fibroblasten			
Verorzellen			
U373			
T3095			
T6217			
T6208			
T3868			
T3564			

Tabelle 18: immunhistochemische RAS-Färbung der einzelnen Zellkulturen mit Negativkontrolle und lichtmikroskopischen Vergleich. Es fallen Größenunterschiede auf. Diese waren aufgrund der unterschiedlich benutzten Objektiveneinstellungen entstanden. Die bei einzelnen Zellen unterschiedliche Anfärbung des Zellkernes erfolgte aufgrund unterschiedlicher DAPI-Mischungsverhältnisse.

Die beste Kernanfärbung wurde schließlich bei dem Mischungsverhältnis gefunden, wie im Methodikteil angegeben.

Der Zeitpunkt $t = 72 \text{ h}$ wurde gewählt, da hier bei sämtlichen Zelllinien ein CPE nachweisbar.

6 Diskussion:

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des onkolytischen Potentials sämtlicher Reovirusstämme.

Hierzu war es notwendig, verschiedene Methoden zu etablieren und zu evaluieren, die im Folgenden besprochen werden.

6.1 Besitzen sämtliche Reovirusstämme ein onkolytisches Potential?

Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass sämtliche Stämme des Reovirus onkolytisches Potential in RAS-positiven Glioblastomzellen besitzen. Allerdings zeigten sich unterschiedlichen Kinetiken der Onkolyse einzelner Stämme, wobei jedoch alle Stämme zu einer kompletten Lyse führten. Diese wurde mittels des zytopathischen Effektes Grad II als positiv definiert.

Zusätzlich wurde die RAS-Positivität für all diese Proben nachgewiesen. Hiermit konnte die Korrelation zwischen RAS-Positivität und Reoviruseffekt, welche bereits mehrfach von der Arbeitsgruppe um LEE et al. [63] beschrieben wurde, nun unabhängig durch uns bestätigt werden.

Weitere Arbeitsgruppen sind uns nicht bekannt, die sich mit dieser Thematik beschäftigt haben.

6.2 Aufbau eines in vitro Testes zur standardisierten Messung der Reovirusaktivität

Bei der Erstellung eines in vitro Testes zur Messung der Reovirusaktivität ist es wichtig, dass dieser standardisiert durchgeführt wird.

Deshalb erfolgte die Anzucht des Virus in unserer Arbeitsgruppe auf Verozellen, da diese in der in vitro Testung weit verbreitet, allgemein zugänglich, einfach zu kultivieren und relativ preisgünstig sind. Selbst die ATCC [74] empfiehlt diese als Anzuchtungsmedium für Reovirus.

Als nächster Schritt wurde die Virus-RNA-Konzentration mittels RT-PCR gemessen. Die Quantifizierung erfolgte in anderen Arbeitsgruppen durch Bestimmung der TCID₅₀ im Zellkulturversuch, z.B. durch Aufbau eines definierten Zellrasens (5×10^4 Zellen/cm²) und anschließender Beimpfung mit 10 Reovirus PFU/Zelle.

Der große Vorteil der RT-PCR liegt darin, dass die Menge an Virusgenom unabhängig ist von der verwendeten Zellkultur. Leider liegt der Nachteil in dieser Methode, dass auch nicht infektiöse Partikel miterfasst werden und somit ein Systemfehler erfolgt. Dieser wurde jedoch in unserer Arbeitsgruppe durch die Standardisierung des Protokolls minimiert. Das Plaqueassay besitzt seinen Vorteil, dass nur infektiöse Partikel in die Messung aufgenommen werden. Allerdings liegt der Nachteil dieser Methode darin, dass dies zellkulturabhängig ist, d.h. es kann keine Aussage über andere Zellkulturen getroffen werden. In der Literatur erfolgte die Auswertung hauptsächlich durch Plaqueassay [39].

Wir erstellten eine RT-PCR Messung zur Ermittlung der Menge an Virusgenom pro 1 ml Ultrazentrifugat. Anschließend bestimmten wir die effektiv-wirksame Reoviruskonzentration bei den untersuchten Zellkulturen mit Hilfe der Endverdünnungsmethode.

Subtyp Jones zeigte hierbei die niedrigste, Dearing die höchste Replikationsrate. Zudem produzieren sämtliche Subtypen des Reovirus, in ihrer individuellen Reproduktionsrate, eine annähernd gleiche Menge an Virusgenom. Allerdings ergab sich eine unterschiedliche Virusmenge in Abhängigkeit vom Virussubtyp. Da jeder Subtyp nach einem standardisierten Protokoll auf Verozellen angezüchtet wurde, wurden somit ähnlich hohe Titer an Virusmenge in Abhängigkeit vom Subtyp produziert.

Dies ist unserer Kenntnis nach die erste Arbeit, die eine Standardisierung für Reovirus für die Endverdünnungsmethode eingeführt hat und somit die onkolytische Wirkung der einzelnen Stämme objektiver beurteilen kann.

6.3 Ermittlung der Kinetiken des Zelluntergangs

Entsprechend den Ausführungen unter 6.2. ist nur durch eine Standardisierung eine sichere Aussage zur Zelluntergangskinetik sinnvoll. Zwar wurde bei uns keine Zellzählung durchgeführt, doch konnte durch die quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass eine konstante Virus-RNA-Menge bei Anzüchtung nach Protokoll in Verozellen erreicht werden. Dieser Ansatz ist zudem auch kostengünstiger als Untersuchungen mittels Plaqueassay und Westernblot. Diese Methode halten wir für einfach reproduzierbar. Auf die Diskussion der einzelnen Kinetiken wird ausführlich in 6.4. eingegangen.

6.4 Die Bestimmung der minimalen wirksamen Reoviruskonzentration, mit Evaluierung der qualitativen und quantitativen Effekte

Die Subtypen des Reovirus besitzen eine unterschiedliche Kinetik der Onkolyse. In Abhängigkeit von der qualitativen Wirkung in vitro zeigte Subtyp Dearing die stärkste Lyse in allen untersuchten Zellkulturen. Dagegen besitzt der Subtyp Lang die schwächste lytische Aktivität für die Zellkulturen T3095, T6217, T6208, T3868 und T3564. Der Subtyp Abney weist die schwächste Onkolyse für die Zellkulturen U373, T3095, T6217 und T6208 auf. Interessanterweise korreliert dieser Befund nicht der Viruskonzentrationen in Abhängigkeit von der PCR-Messung. Beispielsweise braucht der Subtyp Jones für die Zellkultur T6208 die 33fach geringere Konzentration als Subtyp Dearing, um den gleichen zytopathischen Effekt auszulösen.

So zeigte Subtyp Jones insgesamt die stärkste Lyse für Verozellen und die Zellkulturen U373, T3095, T6217 und T6208. Subtyp Dearing besaß nur für die Zellkulturen T3564 die höchste Effektivität. Die stärksten Unterschiede konnten gemessen werden, wenn man als Bezugspunkt die schwächste lytische Aktivität heranzieht, da sämtliche Subtypen bei je einer bestimmten Zellkultur ihre schwächste Wirksamkeit aufwiesen. Gleiche Untersuchungen mit einem objektiven Vergleich dieser Subtypen wurden bisher nicht berichtet.

Die Ergebnisse unserer Arbeit überraschen vor dem Hintergrund, dass die kanadische Forschungsgruppe um Lee sich nur auf den Subtyp Dearing in sämtlichen Arbeiten konzentrierten und auch nur diesen bisher kommerziell anbieten [13, 48, 63]

Betrachtet man jedoch die Menge an Virus, die benötigt wird um die TCID₅₀ zu erreichen, so konnte unsere Arbeit zeigen, dass der Subtyp Jones die effektivste Wirksamkeit besitzt. Diese Unterschiede betragen teilweise mehrere logarithmische Stufen, sodass eine virale Therapie mit Subtyp Jones eine weitere Steigerung der Effektivität der bisherigen Therapien mit Reovirus wahrscheinlich macht. Eventuell ist eine weitere Steigerung der Effektivität durch eine Kombination der verschiedenen Subtypen zu erreichen.

6.5 Welcher Reovirusstamm besitzt die höchste effektive onkolytische Wirkung?

Entsprechend 6.4. sind wir bisher die einzige Arbeitsgruppe, die die verschiedenen Subtypen des Reovirus bezüglich eines vergleichenden onkolytischen Potentials untersucht hat.

Betrachtet man die quantitative Menge an Virus, die benötigt wird um die TCID₅₀ zu erreichen, so konnte unsere Arbeit zeigen, dass der Subtyp Jones die höchste Wirksamkeit besitzt. Leider gibt es außerhalb unserer Arbeitsgruppe keine weiteren Vergleichsuntersuchungen in Bezug auf die verschiedenen Subtypen.

6.6 Welche unterschiedliche Wirkung zeigen die verschiedene Reovirusstämme im Vergleich miteinander?

Bereits unter Punkt 6.4. konnten Unterschiede in der Effektivität der einzelnen Subtypen aufgeführt werden. Die einzelnen Subtypen zeigen teilweise signifikante Unterschiede in der Effektivität untereinander. Jedoch führen alle Subtypen bei ausreichender Konzentration und Wirkungsdauer immer zu einer Onkolyse der untersuchten RAS-positiven Zellkulturen. Ob diese Unterschiede allerdings klinisch relevant sind, lässt sich an Hand der hier vorgestellten Untersuchungen in vitro nicht vorhersagen. Hierzu sind Tierversuche mit der Anwendung von verschiedenen Konzentrationen an Virus notwendig.

6.7 Welche unterschiedliche Wirkung besitzen diese Stämme auf RAS-positive und RAS-negative Zellkulturen mit besonderem Schwerpunkt auf Glioblastome?

RAS-Positivität stellt eine Grundvoraussetzung für die Replikation von Reovirus in Zellkulturen dar [63].

In dieser Arbeit waren sämtliche untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der Vorhaut-Fibroblasten RAS-positiv. Der onkolytische Effekt konnte in allen RAS-positiven Kulturen gezeigt werden. Bei den RAS-negativen Vorhaut-Fibroblasten konnte kein Effekt in vitro mit sämtlichen Reovirusstämmen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die von Strong entdeckten Erkenntnisse in Bezug auf RAS [63].

Norman et al. konnten die RAS-Kaskade im Zusammenhang mit dem Replikationszyklus des Reovirus weiter aufschlüsseln. Besonders die durch RAS kodierte Kaskade RasGEF stellt nach deren Aussage eine fundamentale Voraussetzung für die Replikationsmöglichkeit des Reovirus dar [49].

Marcato et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression des RAS-Proteins zu einer gesteigerten Zelllyse durch das Reovirus führt. Hierbei fiel ein um das 10- bis 50-fache erhöhter Reovirustiter bei diesen RAS-modifizierten NIH3T3-Zellen nach einem einzigen

Replikationszyklus auf. Nach 24 h konnte sogar ein 200-fach erhöhter Titer an extrazellulärem Reovirus nachgewiesen werden [39].

Da der Wirkungsmechanismus unabhängig von der Tumorentität erklärt wird, kann spekuliert werden, ob eine unterschiedliche Expressionen des RAS-Proteins zu einer unterschiedlichen Wirksamkeit führt. Für das kolorektale Karzinom konnte dies entsprechend bereits experimentell gezeigt werden [61].

Wilcox et al. aus der Arbeitsgruppe um LEE konnte zeigen, dass von 25 getesteten Glioblastomen 21 auf Reovirusinfektion reagierten, entsprechend 84 %. Nur in den infizierbaren Kulturen gelang der intrazelluläre Nachweis des RAS-Proteins [72].

Immunhistochemisch konnte ein gleich hoher Prozentsatz RAS-positiver Glioblastome gefunden werden (Neuropathologisches Institut der Universität Homburg, persönliche Mitteilung, PD Dr. med. Romeike 2006).

Diese Zahlen stehen im Widerspruch zu den Literaturangaben von 0-80 % RAS-Positivität bei Gliomen unterschiedlicher Malignitätsgrade. Allerdings zeigt sich in diesen Arbeiten, dass mit steigendem Malignitätsgrad die RAS-Positivität prozentual zunimmt. Arbeiten, in denen keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen WHO-Graden vorgenommen wurden, sind in diesem Zusammenhang nicht aussagekräftig [3, 9, 22, 28, 50, 76].

6.8 Welche Aussichten bestehen für eine eventuelle klinische Anwendung?

Durch die bereits im Nachfolgenden beschriebenen Phase I und Phase II Studien mit der Gabe von Reovirus Subtyp III Dearing bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen ist der erste Schritt für den klinischen Einsatz dieser innovativen Therapien bei malignen Erkrankungen gemacht. Unsere Untersuchungen konnten in vitro zeigen, dass auch andere Subtypen des Reovirus eine zumindest gleichwertige Effektivität im Vergleich zum Subtyp Dearing aufweisen.

Der große Vorteil von Reoviren gegenüber anderen Virusfamilien besteht in der bereits beim Wildtyp vorhandenen onkolytischen Wirkung mit nur geringem Nebenwirkungsprofil im Menschen. Im Vergleich zu gentechnisch hergestellten onkolytischen Viren ist bei Reoviren nicht mit unbekanntem und neuen Nebenwirkungen zu rechnen. Daher ist die Anzüchtung bei relativ niedriger Sicherheitsstufe kostengünstig möglich. Gleichzeitig ist die Anzüchtung und Replikation des Virus unkompliziert, wie dies im Methodenteil beschrieben wurde.

Im Februar 2005 erhielt Oncolytics Inc. für Reolysin®, die kommerziell erwerbbar Form des Reovirus Dearing, die Genehmigung der US Food and Drug Administration für die Durchführung von Phase I und Phase II Studie in der Behandlung von malignen Gliomen in den Vereinigten Staaten von Amerika.

Das Ziel der Phase I Studie war zunächst die Ermittlung der maximal tolerierten Dosis, der Dosis limitierenden Toxizität und des Sicherheitsprofils von Reolysin®.

Des Weiteren werden zurzeit die virale Replikation und eine Immunantwort auf das Virus mit Entwicklung von virusspezifischen Antikörpern erforscht. Der Nachweis einer antitumoralen Wirkung ist erst Gegenstand von Phase III Studien.

Neben den Gliomen wird Reolysin® in weiteren Phase I Studien eingesetzt. Hierzu zählen das cT2 Prostatakarzinom, sowie verschieden subkutane Tumore unterschiedlicher Histologie. Auch in der Therapie von metastasierten Tumoren unterschiedlicher Genese wurde die Erlaubnis für Phase I und Phase II Studien gegeben. Publikationen zu diesen Studien liegen zurzeit nicht vor. Sämtliche diesbezüglichen Informationen sind über die Website der o.g. Firma zu finden. Hierzu zählen folgende Studien, die unter 6.8.1.-6.8.4. aufgeführt sind [75].

6.8.1 Ergebnis der Phase I Studie für subkutane Tumoren:

Bei therapierefraktären Patienten mit subkutan gelegenen Tumoren, die nicht weiter benannt wurden, wurden eine oder drei Injektionen von Reolysin® subkutan direkt in den Tumor injiziert. Die Dosis rangierte zwischen 10^7 bis 10^{10} PFUs. Kein Patient zeigte virusabhängige Nebenwirkungen, zusätzlich zeigte sich keine Dosis limitierende Toxizität des applizierten Reolysin®. Bei 61% der Patienten (11/18) wurde eine virale Aktivität unbekannter Art im Tumor nachgewiesen. Die Regressionsrate des Tumors variierte von 32 – 100 % der ursprünglichen Tumormasse.

6.8.2 Ergebnis der T2 Prostatakrebsstudie:

Patienten erhielten eine einmalige intraprostatiche Injektion. Es erfolgte nach einer nicht näher definierten Beobachtungszeit die operative Therapie durch radikale Prostatektomie. Hier zeigte sich bei 4/6 Patienten eine Apoptose von Prostatakarzinomzellen. Die Behandlung wurde von den Patienten ohne Nebenwirkungen toleriert. Ein Patient zeigte einen PSA-Abfall um 53 %, wobei der initiale Wert und weitere Therapieelemente nicht genannt sind. Deshalb kann ein alleiniger Effekt durch das Reovirus nicht postuliert werden.

6.8.3 Ergebnis der Phase I Studie für rezidivierende maligne Gliome:

12 Patienten mit rezidivierenden malignen Gliome wurden in diese Studie eingeschlossen. Auch hier zeigte sich die gute Verträglichkeit bei allen verabreichten Dosen.

Eine Wirksamkeitsprüfung ist nicht beschrieben. In einer geplanten Phase II Studie soll die Kombination mit Chemotherapie und Radiotherapie eingesetzt werden. Bisher liegen keine Ergebnisse vor.

6.8.4 Ergebnis der systemischen Applikation von Reolysin® in einer Phase I Studie:

Auch hier zeigte sich die gute Verträglichkeit von Reolysin®. Daneben wurde beschrieben, dass das Tumorwachstum nicht nur gebremst wurde, sondern teilweise regredient war.

In dieser Phase I Studie wurde noch keine maximal tolerierte Dosis erreicht. Die Studie ist weiterhin offen.

6.9 Mögliche Optimierung des onkolytischen Effektes von Reovirus

Es ist allgemein bekannt, dass menschliche Tumore eine ausgesprochene Heterogenität besitzen [45], insbesondere gilt dies auch für Glioblastome, bei dem beschriebenen Wirkungsmechanismus die Anwesenheit des RAS-Onkogens in der Tumorzelle, muss davon ausgegangen werden, dass eine onkolytische Therapie in vivo nicht zur Lyse aller Tumorzellen führt. Zudem zeigen unsere Experimente, dass unterschiedliche Subtypen in unterschiedlichen Zellkulturen eine verschieden starke Lyse auslösen. Aus diesen Überlegungen ergeben sich zwei Möglichkeiten einer Optimierung für einen möglichen alleinigen Einsatz für onkolytische Viren:

1. die in vitro Testung primärer Zellkulturen eines Tumors eines Patienten auf unterschiedliche Reovirusstämme, um für den Patienten individuell effektivsten Stamm zu finden
2. durch eine Kombination verschiedener onkolytischer Viren die unterschiedlichen Wirkmechanismen auf einzelne Tumorzellen anzuwenden

Beide hier geschilderten Möglichkeiten sind bislang nirgendwo etabliert.

Neben einem alleinigen Einsatz onkolytischer Viren ist auch die Kombination mit verschiedenen Chemotherapieregimens denkbar. So konnten unter anderem KHURI et al. zeigen, dass durch die Kombination aus onkolytischem Virus (Onyx-015-Virus) mit Cisplatin und 5-Fluorouracil eine Reduktion der Mortalitätsrate bei Hals- und Kopftumoren erreicht werden konnte [30]. Dieses Virus haben wir aufgrund der bekannten Nebenwirkungen (kardiovaskulär, respiratorisch, hämatologisch, ZNS, Schmerz; [47]) in unsere Überlegungen nicht einbezogen. Überraschenderweise konnte diese Arbeitsgruppe aber auch eine Reduktion der Toxizität des Onyx-015-Virus beobachten.

In wie weit durch gentechnische Verfahren das onkolytische Potential von Reoviren gesteigert werden kann, ist rein spekulativ. Arbeiten diesbezüglich liegen keine vor.

Es ist bekannt, dass mehr als 99 % der Bevölkerung mit dem Reovirus bis zum 12. Lebensjahr in Kontakt getreten ist. Von daher muss davon ausgegangen werden, dass die meisten Menschen neutralisierende Antikörper gegen dieses Virus aufweisen. Eine systemische Behandlung von Patienten mit Malignomen erscheint deswegen unsicher.

Aus diesem Grund können Überlegungen angestellt werden, ob durch eine immunsupprimierende Therapie eine Effektivitätssteigerung des Virus erreicht werden kann. Erste Ansätze diesbezüglich sind durch COLOMBO et al. bei der Anwendung von Herpes-Viren in einem kleinen Patientenkollektiv (n = 12) durchgeführt worden, indem er diese Patienten zusätzlich mit Interleukin-2 behandelt hat [14]. Leider konnte erhöhte Wirksamkeit erzielt werden, allerdings kam es durch die Immunsuppression zu einer gesteigerten Morbidität (Enzephalitis).

Die Kombination aus Radio- und viraler Therapie führte ebenfalls zu einem Potenzierungseffekt der Bestrahlung in Mäusen und somit zu einer deutlich höheren Effektivität gegen den Tumor. Georger et al. beobachteten zusätzlich eine beschleunigte Tumorfibrosierung durch Adenovirus ONYX-015, allerdings wurden weitere Beobachtungen nicht mehr berichtet [19].

6.10 Welche weiteren Ansätze gibt es in der viralen Therapie von malignen Erkrankungen?

Im Folgenden wird auf verschiedene virale onkolytische Therapien eingegangen.

6.10.1 Herpes simplex Virus:

Herpes simplex Virus (HSV) wurde schon früh als potentielles onkolytisches Virus, bzw. als Vektor für die onkolytische Gentherapie angesehen. Durch die bereits gut erforschten Eigenschaften mit Entschlüsselung des Genoms war der nächste Schritt bereits vorprogrammiert.

Dennoch besteht insbesondere bei immunsupprimierten Patienten die Gefahr einer akuten nekrotisierenden Enzephalitis bei HSV-Infektion. Diese oft letal endende Erkrankung hatte einen bisherigen klinischen Einsatz des Wildtypes von HSV unmöglich gemacht [32].

Deshalb erfolgten unterschiedliche gentechnische Veränderungen am Virus. Im Folgenden sind unterschiedliche Ansätze dargestellt.

Wie beim Reovirus hängt die onkolytische Wirkung des HSV von der RAS-Kaskade der Zelle ab. Eine RAS – Überexpression zeigte eine deutlich höhere Onkolyse durch HSV [16].

HSV 1 Mutant (G207):

Der Mutant HSV I zeigt eine extrem hohe Toxizität. Zudem ist dieser Stamm resistent gegen Antivirostatika, u.a. auch gegenüber Aciclovir [42].

Der Grund für die hohe Toxizität des HSV liegt in der Ribonucleotid – Reductase (RNR) [21]. RNR – defiziente HSV I-Stämme zeigen eine deutlich reduzierte Toxizität, bei gleich bleibender onkolytischer Aktivität in teilungsfähigen Zellen. Des Weiteren wurde gefunden, dass diese Stämme durch Antivirostatika wie Aciclovir und Ganciclovir bekämpft werden können [12].

Diese Eigenschaften wurden von MINETA et al. weiterentwickelt und endeten 1995 im HSV I Mutant G207 [44]. Dieser Stamm zeigt onkolytische Aktivität bei gleichzeitiger Empfindlichkeit auf Antivirostatika. Im Tierversuch konnte die deutlich reduzierte Toxizität mit verminderter Entwicklung der HSV-typischen Enzephalitis gezeigt werden, wodurch dieser Stamm schließlich in Phase I Studien weiter untersucht wurde [40].

In dieser Studie konnten die guten Ergebnisse aus den Tierexperimenten bestätigt werden. Bei keinem der untersuchten Patienten trat eine Enzephalitis auf [41].

HSV 1716:

Auch bei diesem genetisch veränderten Typ wurde die replikative Fähigkeit in Neuronen reduziert. Dies konnte erfolgreich an *scid* Mäusen gezeigt werden [69]. In vitro konnte eine hohe onkolytische Wirksamkeit gegenüber Melanomen experimentell nachgewiesen werden [56].

Bei diesem Stamm fand man bislang keine obere maximale Toleranzdosis. Eine HSV – typische Enzephalitis ist bisher nicht beschrieben worden [55].

Auch eine Wirksamkeit gegenüber malignen Gliomen bei bisher geringem Nebenwirkungsprofil konnte im Tierversuch gezeigt werden. Langzeitergebnisse stehen noch aus [52]. Beim Menschen liegen bislang diesbezüglich keine Studien zu Gliomen vor.

6.10.2 Adenovirus:

Onyx-015:

Dieser genetisch veränderte Adenovirus repliziert sich in p53-mutierten Zellen. Die Entwicklung dieses Virus wurde bereits in einer Phase II – Studie von NEMUNAITIS et al. bei Patienten mit Kopf – und Halstumoren evaluiert. Hier zeigte sich eine hochselektive Andockung des Virus an das Tumorgewebe mit Tumorregression > 50 % bei 21 % der Patienten. Die Wirkung bei p53-Mutationen lag signifikant höher als bei Tumoren mit p53-Wildtyp. Nebenwirkungen dieser Therapie wurden in dieser Studie nicht beschrieben [46].

In einer Phase I – Studie von GANLY et al. wurde beobachtet, dass die Nebenwirkungen grippeähnlich und moderat verlaufen [18].

In Kombination mit Chemotherapie konnte KHURI et al. zeigen, dass durch die Kombination aus Virus und Chemotherapeutikum (Cisplatin + 5-FU) ein zusätzlicher Benefit in der Wirkung auf Hals- und Kopftumoren erreichen lässt. Überraschenderweise zeigte sich eine verminderte Nebenwirkungsrate des Virus [30]. Auch in der Kombination mit Radiotherapie konnte die Effektivität deutlich erhöht werden. Als Begleiteffekt zeigte sich eine beschleunigte Fibrosierung des Tumors [19].

Delta 24:

FUEYO et al. entwickelten einen Adenovirusstamm, Delta 24, der selektiv sich in Zellen repliziert, die Mutation im Retinoblastom (Rb) – Protein oder in der Rb-Kaskade aufweisen.

Im regelrechten Zustand verhindert Rb die Transkription von Mitose-Schlüsselgenen und bremst die Zellprogression durch Fixierung des Zellzyklus in der G1/S-Phase [60]. In der Tumorgenetik der Gliome kommt es zudem zu einem Verlust des Rb. Dieses Design des Virus zeigte in vitro eine viel versprechende onkolytische Wirkung in Gliomen [17]. Zu diesem Virustyp fehlen bislang klinische Studien.

Newcastle Disease Virus (NDV, PV701):

NDV zeigt eine deutliche onkolytische Aktivität in vitro in unterschiedlichen Tumorzellen. Zusätzlich induziert dieser Virusstamm die T-Zell induzierte Immunantwort mit unspezifischer Vermehrung von Zytokinen z.B. Interferon und Aktivierung von tumorzerstörenden Makrophagen.

In Tierversuchen zeigt dieser Virus eine deutlich höhere Replikationsrate in Tumorgewebe, sowohl nach intravenöser, intraperitonealer, intramuskulärer, subkutaner als auch intratumoraler Applikation. Diese onkolytische Aktivität wurde zuerst durch CASSELL und GARRETT nachgewiesen [10].

Heute wird überwiegend mit dem Mutant PV701 gearbeitet. Dieser Virus gilt nicht als humanpathogen. Exposition, auch größerer Mengen an Virusmaterial, führen zu einer nur geringen klinischen Symptomatik in Form von Konjunktivitiden und Grippe-ähnlichen Symptomen.

PECORA et al. haben diesen replikationsfähigen Stamm des Newcastle Disease Virus bereits in einer Phase I-Studie getestet [53]. Hier bestätigte sich die geringe Nebenwirkungsrate. Über Wirksamkeit liegen in dieser Studie keine Angaben vor.

Ein weiterer Therapieansatz war Antigenfindung für NDV durch Tumorbiopsie und Anzüchtung des Virus im Tumorgewebe. Anschließend erfolgte die Impfung des Patienten mit dem spezifischen Virus. Die Lebensdauer der so behandelten Patienten wurde signifikant verlängert, bei guter Therapietoleranz [62].

In einer weiteren Studie wurde dieses Virus Patienten mit unterschiedlichen onkologischen Erkrankungen appliziert. Eine Prognoseverbesserung konnte nicht nachgewiesen werden. Vereinzelt traten letale Verläufe auf, wobei die Ursache des Exitus nicht eindeutig der Tumorerkrankung oder der Virusapplikation zuzuordnen war.

In Deutschland ist eine Phase II Studie bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom in Arbeit [31].

6.10.3 Poliovirus:

Intergenerikaler Virus:

Die Arbeitsgruppe um GROMEIER et al. entwickelte aus einem gentechnisch veränderten Poliovirus ohne Neurotoxizität und Humanen Rhinovirus Typ 2 (HRV2) einen interspezifischen Virus. Dieser neue Stamm wurde PV1(RIPO) genannt [25,26]. Im Tierversuch wurden nach Gabe des Virus keine ernsthaften Nebenwirkungen beobachtet. Allerdings kam es zu temporären Paraparesen der unteren Extremitäten. Dies spricht dafür, dass die Neurotoxizität nicht vollständig eliminiert wurde.

Dennoch erfolgten in vitro Testungen bei malignen Gliomen. Diese Zelllinien konnten wirkungsvoll im Wachstum gebremst werden. Auch im Tierversuch konnten anaplastische Astrozytome durch intravenöse Gabe des Virusattenuates in Größe und Ausbreitung deutlich reduziert werden. Eine genauere Darstellung, insbesondere der neurotoxischen Nebenwirkungen, wurde allerdings in dieser Arbeit nicht aufgeführt [27].

Replikone:

Replikone sind Plasmide mit der Fähigkeit zur aktiven Transkription und konsekutiver Möglichkeit zur Replikation, auch ohne zelluläre Chromosomen. Replikone des Poliovirus sind ebenfalls vorhandene Alternativen, welche ein onkolytisches Potential gegenüber malignen Gliomen zeigen. Poliovirustypische Nebenwirkungen sind beim Replikon nicht vorhanden [2, 7]. Allerdings ist die Wirkung des Replikons aufgrund der fehlenden Replikationsfähigkeit auf einen Zellzyklus beschränkt. Dies bedingt im klinischen Einsatz eine kontinuierliche und repetitive Gabe.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für das Replikon ist der Gebrauch als Vektor zum Gentransfer in Tumorzellen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten dies bereits erfolgreich zeigen. Unter anderem wurden das karzinoembryotisches Antigen [1] und weitere Proteine [54] erfolgreich transferiert. Hierdurch kann die Immunantwort als auch das onkolytische Potential in Abhängigkeit der transferierten Proteine positiv beeinflusst werden. Um dies zu beweisen müssen entsprechende Studien abgewartet werden. Bislange wurde diese Theorie nur im Tiermodell evaluiert.

6.10.4 Vakzinia – Virus:

Dieses Virus gehört zur Familie der Pockenviren und wurde ebenfalls als mögliches onkolytisches Therapeutikum beschrieben [59]. Die Entwicklung dieser Virusform ist bereits

für vaccinia melanoma oncolysate (VMO) bis in Phase III – Studien fortgeschritten. Bei diesem Virus handelt es sich um einen viruslysierten speziesspezifischen Tumorzellvakzin des Säugetieres mit aktiven Immunotherapeutikum ohne ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil. In der entsprechenden Studie konnte für die Gesamtheit der Patienten keine Verbesserung des Überlebens nachgewiesen werden. In einer Subanalyse von Patienten mit Stadium II Melanomen mit 1 – 5 befallenen Lymphknoten zeigte sich jedoch ein geringer Überlebensvorteil. Unerwünschte Nebenwirkungen wurden in dieser Studie nicht beobachtet [70].

An weiteren Vakziniaviren lässt sich ein Entwicklungspotential ableiten, indem z.B. die Möglichkeit besteht, Wildtyp p53 verstärkt in Tumorzellen zu exprimieren und dadurch den Weg in die Tumorzellapoptose zu bahnen. Dies wurde erfolgreich an den Glioblastomzelllinien U87MG, U373MG und LN-Z308 in Kombination mit Radiotherapie getestet [66].

Das Vakziniavirus JX-594 wurde genetisch mit einem Granulozyten colony stimulating factor (GM-CSF) rekombiniert. Hierdurch wurde nach intratumoralen Injektion sogar ein systemischer Effekt mit Remission von Fernmetastasen bei malignen Melanomen beobachtet. Histologisch konnte eine hochsignifikante Infiltration von T-Lymphozyten in den Metastasen beobachtet werden. Dies stellt die erste nachgewiesene systemische Tumorantwort nach lokaler Vakziniavirusapplikation dar [33].

Hiermit kann man sagen, dass Vakziniaviren sich weniger durch ihr eigenes onkolytisches Potential, als durch ihre hervorragende Vektorisierungsfähigkeit auszeichnen. Um das Potential dieser Therapiealternative beurteilen zu können, sind weitere prospektiv klinische Studien erforderlich.

7 Literaturverzeichnis

1. Ansardi DC, Moldoveanu Z, Porter DC, Walker DE, Conry DM, LoBuglio AF, McPherson S, Morrow CD; Characterization of poliovirus replicons encoding carcinoembryonic antigen; *Cancer Res*, 1994; 54(24):6359-64
2. Ansardi DC, Porter DC, Jackson CA, Gillespie GY, Morrow CD; RNA replicons derived from poliovirus are directly oncolytic for human tumor cells of diverse origins; *Cancer Res*, 2001; 61(23):8470-9
3. Arvanitis D, Malliri A, Antoniou D, Linardopoulos S, Field JK, Spandidos SA; Ras p21 expression in brain tumours: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme; *In Vivo*, 1991; 5:317-21
4. Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR, Barber GN; Essential Role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate Immunity to viral infection; *Immunity*, 2000; 13:129-41
5. Barbacid M; Ras genes; *Annu Rev Biochem*, 1987; 56:779–827
6. Bar-Sagi D; A Ras by Any Other Name; *Mol Cell Biol*, 2001; 21(5): 1441 – 3
7. Bledsoe AW, Gillespie GY, Morrow CD; Targeted foreign gene expression in spinal cord neurons using poliovirus replicons; *J Neurovirol*, 2000; 6(2):95-105
8. Bonin O; *Quantitativ-virologische Methodik*, 1973; 1.Auflage: 165
9. Bos JL; Ras oncogenes in human cancer: a review; *Cancer Res*, 1989; 49:4682-89
10. Cassell WA, Garret RE; Newcastle disease virus as an antineoplastic agent; *Cancer*, 1965; 18(7):863-8
11. Clarke S; Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues; *Annu Rev Biochem*, 1992; 61:355–86
12. Coen DM, Goldstein DJ, Weller SK; Herpes simplex virus ribonucleotide reductase mutants are hypersensitive to acyclovir; *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33:1395-9
13. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW; Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway; *Science*, 1998; 282(5392):1332-4
14. Colombo F, Barzon L, Franchin E, Pacenti M, Pinna V, Danieli D, Zanusso M, Palù G; Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results; *Cancer Gene Therapy*, 2005; 12:835–48
15. Downward J; Ras signalling and apoptosis.; *Curr Opin Genet Dev*, 1998; 8(1):49-54
16. Farassati F, Yang A, Lee PW; Oncogenes in Ras signaling pathway dictate host – cell permissiveness to herpes simplex virus 1; *Nature Cell Biol*, 2001; 3:745-50

17. Fueyo J, Gomez – Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP; A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti – glioma effect in vivo; *Oncogene*, 2000; 19(1):2-12
18. Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gulley ML, Heise C, Von Hoff DD, Kaye SB, Eckhardt SG; A phase I study of Onyx – 015, an E1b attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer; *Clin Cancer Res*, 2000; 6:798-806
19. Georger B, Grill J, Opolon P, Morizet J, Aubert G, Lecluse Y, van Beusechem VW, Gerritsen WR, Kirn DH, Vassal G; Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts; *Br J Cancer*, 2003; 89(3):577-84
20. Girgert R; Inaktivierung der Ras-Proteine:Ein neuer Ansatz in der Tumorthherapie
BIOspektrum, 2003; 9. Jahrgang
21. Goldstein DJ, Weller SK; Factor(s) present in herpes simplex virus type 1 – infected cells can compensate for the loss of the large subunit of the viral ribonucleotide reductase: characterization of an ICP6 deletion mutant; *Virology*, 1988; 166:41-51
22. Gömöri É, Dóczi, Pajor L, Matolcsy A; Sporadic p53 Mutations and Absence of Ras Mutations in Glioblastomas; *Acta Neurochir*, 1999; 141:593-9
23. Goodsell DS; The molecular perspective: the ras oncogene; *Stem Cells*, 1999; 17(4):235-6
24. Grand RJA, Own D; The biochemistry of RAS p21; *Biochem J*, 1991; 279:609-31
25. Gromeier M, Alexander L, Wimmer E; Internal ribosome entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants; *PNAS*, 1996; 93:2370-5
26. Gromeier M, Bossert B, Arita M, Nomoto A, Wimmer E; Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence; *J Virol*, 1999; 73:958-64
27. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E; Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma; *PNAS*, 2000; 12:6803-8
28. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A; Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation; *Oncogene*, 1997; 15(23):2755-65
29. Jacobs BL, Ferguson RE; The Lang Strain of Reovirus Serotype 1 and the Dearing Strain of Reovirus Serotype 3 differ in their Sensitivities to beta - Interferon; *J Virol*, 1991; 65(9):5102-4
30. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH; A controlled trial of intratumoral ONYX – 015, a selectively replicating

adenovirus, in combination with cisplatin and 5 – fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer; *Nature Med*, 2000; 6(8):879-85

31. Kirchner HH, Anton P, Atzpodien J. Adjuvant treatment of locally advanced renal cancer with autologous virus – modified tumor vaccines; *World J Urol*, 1995; 13(3):171-3
32. Knipe D; *Fields Virology*, 2007; Volume 2; Chapter 67
33. Liu TC, Kirn D; Systemic Efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions; *Cancer Res*, 2007; 67(2):429-32
34. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J; *Molecular cell biology*, 2000; 4th edition: Chapter 25, Cancer
35. Loeper S, Romeike BFM, Heckmann N, Jung V, Henn W, Feiden W, Zang KD, Urbschat S.; Frequent mitotic errors in tumor cells of genetically micro-heterogenous glioblastomas; *Cytogenet Cell Genet* 2001:94:1-8
36. Lowy, DR, Willumsen BM; Function and regulation of Ras; *Annu Rev Biochem*, 1993; 62:851–91
37. Lutz S, Welter C, Zang KD, Seitz G, Blin N, Urbschat K; A two color technique for chromosome in situ hybridization in tissue section; *J Pathol*, 1992; 167:279-82
38. Marcato P, Shmulevitz M, Lee PW; Connecting Reovirus Oncolysis and Ras Signal; *Cell Cycle*, 2005; 4(4):556-9
39. Marcato P, Shmulevitz M, Pan D, Stoltz D, Lee PWK; Ras Transformation mediates Reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity and apoptosis-dependent release; *Mol Therapy*, 2007; 15(8): 1522-30
40. Markert JM, Malick A, Coen DM, Martuza RL; Reduction and elimination of encephalitis in an experimental glioma therapy model with attenuated herpes simplex mutants that retain susceptibility to acyclovir; *Neurosurg*, 1993; 32(4):597-603
41. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL; Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial; *Gene Ther*, 2000; 7(10):867-74
42. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM; Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant; *Science*, 1991; 252:854-6
43. Meuer, S, Wittwer C, Nakagawara, K; *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, 2001; 1. Auflage

44. Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL; Attenuated multi – mutated herpes simplex virus 1 for the treatment of malignant gliomas; *Nature Med*, 1995; 1:938-43
45. Mischel P, Nelson SF, Cloughesy TF; Molecular Analysis of Glioblastoma; *Cancer Bio Ther*, 2003; 2(3):242-7
46. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarthy T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D; Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX – 015, an E1b - 55kD gene – deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial; *Cancer Res*, 2000; 60(22):6359-66
47. Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D; Phase II trial of intratumoural administration of Onyx-015, a replication-selective Adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer; *JCO*, 2001; 19(2):289-98
48. Norman KL, Lee PW.; Reovirus as novel oncolytic agent; *J Clin Invest*, 2000; 105(8):1035-8
49. Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA, Lee PW; Reovirus oncolysis: The Ras-RalGEF-p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection; *PNAS*, 2004; 101(30):11099–104
50. Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye SH, Chow CW, Gonzales MF; Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma; *Br J Cancer*, 1992; 66:106-12
51. Palanichamy K, Ekkrinen M, Saia G, Chakravarti A; Molecular and gene profiling in human gliomas; *Discov Med*, 2007; 7(38):75-81
52. Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M; The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV 1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study; *Gene Ther*, 2002; 9(6):398-406
53. Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Serman D, Marshall JL, Goldberg S, Gross P, O'Neil JD, Groene WS, Roberts MS, Rabin H, Bamat MK, Lorence RM; Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancer; *J Clin Oncol*, 2002; 20:2251-66
54. Porter DC, Ansardi DC, Morrow CD; Encapsidation of poliovirus replicons encoding the complete human immunodeficiency virus type 1 *gag* gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in *trans*; *J Virol*, 1994; 69(3):1548-55

55. Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M; Toxicity evaluation of replication – competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma; *Gene Ther*, 2000; 7:859-66
56. Randazzo RB, Kesari S, Gesser RM, Alsop D, Ford JC, Brown SM, MacLean AR, Lee VM, Trojanowski JQ, Fraser NW; Treatment of experimental intracranial murine melanoma with a neuroattenuated herpes simplex virus 1 mutant; *Virology*, 1995; 211(1):94-101
57. Rasmussen, R; Quantification on the LightCycler, 2001; 21-34
58. Reuter C, Morgan M, Bergmann L; Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies; *Blood*, 2000; 96(5):1655-69
59. Shah A, Benos D, Gillespie Y, Markert J; Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant glioma; *J Neuro – Onco*, 2003; 65:203-26
60. Sherr CJ; Cancer cell cycles; *Science*, 1996; 274(5293):1672-7
61. Smackman N, van den Wollenberg DJ, Borel Rinkes IH, Hoeben RC, Kranenburg O; Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D; *J Virol*, 2005; 79:14981-5
62. Steiner HH, Bonsanto MM, Beckhove P, Brysch M, Geletneky K, Ahmadi R, Schuele-Freyer R, Kremer P, Ranaie G, Matejic D, Bauer H, Kiessling M, Kunze S, Schirmacher V, Herold-Mende C; Anti-tumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety and clinical benefit; *J Clin Oncol* 2004; 22(21):4272-81
63. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW; The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by Reovirus; *Embo J*, 1998; 17(12):3351-62
64. Tang D, Strong JE, Lee PW; Recognition of the epidermal growth factor receptor in reovirus; *Virology*, 1993; 197:412-4
65. Thagard P; Curing Cancer? Patrick Lee’s path to the reovirus treatment; *Intern Stud Phil Science*, 2002; 16:179-93
66. Timiryasova TM, Chen B, Haghghat P, Fodor I; Vaccinia virus – mediated expression of wild – type p53 suppresses glioma cell growth and induces apoptosis; *Int J Oncol*, 1999; 14(5):845-54
67. Tyler KL, Fields BN; Reoviruses; *Fields Virology*, 1996; 1597-623

68. Urbano P, Urbano FG; The Reoviridae family; *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1994; 17(3-4):151-61
69. Valyi – Nagy T, Fareed MU, O’Keefe JS, Gesser RM, MacLean AR, Brown SM, Spivack JG, Fraser NW; The HSV 1 strain 17+ gamma 34.5 deletion mutant 1716 is avirulent in SCID mice; *J Gen Virol*, 1994; 75:2059-63
70. Wallack MK, Sivanandham M, Balch CM, Urist MM, Bland KI, Murray D, Robinson WA, Flaherty L, Richards JM, Bartolucci AA, Rosen L; Surgical adjuvant active specific immunotherapy for patients with stage III melanoma: the final analysis of data from a phase III randomized, double – blind, multicenter vaccinia melanoma oncolysate trial; *J Am Coll Surg*, 1998; 187(1):69-79
71. Wemmert S, Ketter R, Rahnenführer J, Beerenwinkel N, Strowitzki M, Feiden W, Hartmann C, Lengauer T, Stockhammer F, Zang KD, Meese E, Steudel WI, von Deimling A, Urbchat S; Patients with high-grade gliomas harboring deletions of chromosomes 9p and 10q benefit from temozolomide treatment; *Neoplasia*, 2005; 7(10):883-93
72. Wilcox ME, Yang WQ, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PMA, Qiao Shi Z, Johnston RN, Nishikawa S, Lee PW, Forsyth PA; Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas; *J Nat Cancer Inst*, 2001; 93(12):903-12
73. Williams BRG; PKR: a sentinel kinase for cellular stress; *Oncogene*, 1999; 18:6112-20
74. <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=VR-821-4>
75. <http://www.oncolyticsbiotech.com/>
76. Yamamoto T, Taya S, Kaibuchi K; Ras-induced transformation and signaling pathway; *J Biochem*, 1999; 126(5):799-803

8 Publikationen

1. Alloussi SH, Alkassar M, Gärtner B, Graf N; All reovirus subtypes show an oncolytic potential in cell culture of human high-grade glioma; J Virology, 2009; submitted
2. Alkassar M, Alloussi SH, Graf N, Gärtner B; Oncolytic potential of non-humanpathogenic viruses; Cancer Clin Research, 2009; Submission geplant
3. Alloussi SH, Mürtz G, Gitzhofer S, Eichel R, Lang C, Madersbacher H, Strugala G, Alloussi S; Monotherapy failures in primary monosymptomatic enuresis: a combined desmopressin and propiverine treatment regimen improves efficacy outcomes; BJU Int, 2008, Accepted
4. Alloussi SH, Mürtz G, Gitzhofer S, Eichel R, Lang C, Madersbacher H, Strugala G, Seibold J, Stenzl A, Alloussi S; Desmopressin treatment regimens in mono- and nonmonosymptomatic enuresis: a review from a clinical perspective; J Urol, 2008; submitted

9 Auszeichnungen

1. Prof. Dr. iur. Egon Müller – Preis der Freunde der Universität e.V.
2. Anschubfinanzierung der Universität des Saarlandes; „Onkolytische Wirkung von Reovirus auf Glioblastome“

10 Danksagung

Mit großen Dank an:

Barbara Gärtner, Dany Backes, Helga Appel

Stefanie Urbschat, Silke Prowald, Ulli Lehmann, Alexander Hoppe

Norbert Graf

Dr. med. Ketter, Abteilung für Neurochirurgie, Universität des Saarlandes

Prof. Dr. med. Rube, Abteilung für Strahlenmedizin, Universität des Saarlandes

Dr. med. Romeike, Abteilung für Neuropathologie, Universität des Saarlandes

Vielen Dank für eure unendlich zu schätzenden Hilfe

11 Lebenslauf

Ob der Grafenhalde 6-013
72076 Tübingen

Telefon: 0163 5105608
E-Mail: salli78@yahoo.co.uk

Saladin Mahmud Helmut Alloussi

Persönliche Information:

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	29.10.1978
Geburtsort:	Homburg

Schulausbildung:

1984 - 1988	Grundschule Sonnenfeld Homburg
1988 - 1997	Saar – Pfalz Gymnasium Homburg
1998	Beginn des medizinischen Studiums an der Universität des Saarlandes
2000	Physikum
2000 - 2001	medizinisches Austauschjahr nach Dublin, Irland
2002	Erstes Staatsexamen
2004	Zweites Staatsexamen
05/2006	Drittes Staatsexamen, Endnote: Gut

Weiterführende Ausbildung:

1997 - 1998	Bundeswehrdienst als Fallschirmjäger und Sanitäter
1999 - 2002	Pflegehilfskraft, internistische Notaufnahme Homburg
08 - 10/1999	Famulatur, Emergency room Muasad Hospital, Universität Damaskus, Syrien
08 - 10/2001	Famulatur, Urologie Neunkirchen
03/2002	Famulatur, Anästhesie Neunkirchen
05-06/2002	Famulatur, pädiatrische Hämatonkologie Universitätsklinik Homburg, Prof. Graf
Seit 1996	Mitglied Organisationskomitee der deutsch-arabischen Gesellschaft für Urologie e.V.
Aug.-Okt. 2007	Dozent der Krankenpflegeschule Kohlhof („Nephrologie + Urologie“)

Praktisches Jahr:

April-Aug. 2005	Chirurgie, Prof. Dr. med. Schilling Universitätsklinik Homburg
Aug.-Nov. 2005	Innere Medizin und kardiologische Intensivmedizin, Prof. Dr. med. Köhler, Prof. Dr. med. Böhm, Universitätsklinik Homburg
Nov.2005-März 2006	Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. Dr. med. Schüssler, Kantonsspital Luzern, Schweiz

Assistenzarzt:

Aug. 2006-Juli 2008 Städtisches Klinikum Neunkirchen, Abteilung für
Urologie; Prof. Dr. med. Sch. Alloussi
Seit Sep. 2008 Eberhard-Karls-Universität, Abteilung für
Urologie; Prof. Dr. med. A. Stenzl