

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

**Die onkolytische Wirksamkeit von
Newcastle Disease Virus und Reovirus in Kombination
zur Therapie des Glioblastoms am Mausmodell**

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

vorgelegt von: Isabell Heckel

geb. am: 8. April 1986 in Biberach an der Riss

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Kapitel 1 Zusammenfassung und Summary	10
1.1 Zusammenfassung - Die onkolytische Wirksamkeit von Newcastle Disease Virus und Reovirus in Kombination zur Therapie des Glioblastoms am Mausmodell.....	10
1.2 Summary - The oncolytic efficacy of the combination of the Newcastle disease virus and the Reovirus as a therapy for Glioblastoma in vivo in mice.....	11
Kapitel 2 Einleitung	13
2.1 Was sind onkolytische Viren?.....	13
2.2 Mechanismen der Tumorselektivität onkolytischer Viren	13
2.3 Mechanismen der viralen Onkolyse.....	14
2.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Therapie mit onkolytischen Viren	16
2.5 Erhoffte Vorteile der Therapie mit onkolytischen Viren gegenüber herkömmlichen Krebstherapien.....	18
2.6 Glioblastome	18
2.7 Das Reovirus als onkolytisches Virus	20
2.8 Das Newcastle Disease Virus als onkolytisches Virus	22
2.9 Bisherige Erfahrungen und Erfolge mit onkolytischen Viren	23
2.10 Die Bedeutung der onkolytischen Wirkung von Reoviren in der aktuellen Forschung.....	24
2.11 Die Bedeutung der onkolytischen Wirkung von NDV in der aktuellen Forschung.	25
2.12 Probleme und Einschränkungen in der Therapie mit onkolytischen Viren.....	28
2.13 Aspekte der Sicherheit bei der Therapie mit onkolytischen Viren	29
2.14 Ziele der Arbeit.....	30
Kapitel 3 Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Chemikalien/Materialien	31
3.1.2. Zellmethoden.....	32
3.1.3 Virale Methoden	32
3.1.4 Tierversuche	32
3.1.5 Polymerasekettenreaktion	33
3.1.6. Durchflusszytometrie.....	33
3.1.7. Gewebskryoschnitte	33
3.1.8 Antikörpernachweis im Serum.....	34
3.1.9 Geräte	34
3.1.10 Diverses.....	34

3.1.11 Computersoftware.....	35
3.2 Zellmethoden.....	35
3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	35
3.2.2 Vermehrung der Zellen.....	35
3.2.3 Kryokonservierung der Zellen.....	35
3.2.4 Auftauen der Zellen.....	36
3.2.5 Aufbereitung der Zellen für die Injektion in die Mäuse.....	36
3.2.6 Bestimmung der Zellmenge.....	36
3.3 Virale Methoden.....	37
3.3.1 Reovirus - Produktion und -Aufreinigung.....	37
3.3.2 NDV – Produktion und -Aufreinigung.....	37
3.3.3 Plaque-Test zur Konzentrationsbestimmung von Reovirus.....	38
3.4 Tierversuche.....	39
3.4.1 Tierhaltung.....	39
3.4.2 Subkutane Tumorzellinjektion.....	40
3.4.3 Aufteilung der Tiere in die jeweilige Versuchsgruppe.....	40
3.4.4 Betäubung der Mäuse und Blutentnahme.....	40
3.4.5 Virusinjektion.....	41
3.4.6 Bestimmung der Tumorgröße.....	41
3.4.7 Vorgehen in Abhängigkeit von der Tumorgröße und Entwicklung der Tumorgröße.....	42
3.4.8 Tötung der Tiere und Organentnahme.....	43
3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Erbmateri al.....	44
3.5.1 Prinzip der PCR.....	44
3.5.2 Aufbau des LightCycler-Geräts.....	44
3.5.3 Prinzip der Real-Time-PCR.....	45
3.5.4 Quantitative PCR im LightCycler.....	46
3.5.5 Extraktion der Virus-RNA aus den Zellen der Mausorgane für die PCR.....	47
3.5.6 Reverse Transkription der Virus-RNA.....	48
3.5.7 Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	48
3.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	49
3.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	49
3.6.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	50
3.6.3 Extraktion und Fixierung der Zellen aus den Geweben für die Durchflusszytometrie.....	52
3.6.4 Färbung intrazellulärer Virusantigene für die Durchflusszytometrie.....	53
3.7 Herstellung von Gefrierschnitten zur mikroskopischen Untersuchung.....	53
3.7.1 Verarbeitung und Aufbereitung der Organe für die Herstellung von Gefrierschnitten.....	53
3.7.2 Färben der Gewebsschnitte.....	53
3.8 Nachweis von Virusantikörpern im Mäuseserum.....	54
Kapitel 4 Ergebnisse.....	55
4.1 Die Wirkung der intratumoralen Applikation von NDV und Reovirus auf subkutane Maustumoren.....	55
4.2 Das Verhalten der Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen.....	57
4.2.1 Das Tumorwachstum der Kontrolltiere.....	57
4.2.2 Die Wirkung von intratumoral applizierten Reoviren auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen.....	58
4.2.3 Die Wirkung von intratumoral applizierten NDV auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen.....	62

4.2.4 Die Wirkung von einer intratumoral applizierten Kombination aus NDV und Reoviren auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen.....	66
4.3 Virusinfektion der Organe	71
4.4 Systemische Wirkung der Viren nach intratumoraler Applikation	72
4.5 PCR-Analyse der Organe	72
4.5.1 PCR-Analyse der Organe nach intratumoraler Applikation von NDV.....	72
4.5.2 PCR-Analyse der Organe der nach intratumoraler Applikation von Reoviren	73
4.5.3 Vergleich der Viruskonzentrationen in den Organen und den Tumoren.....	74
4.5.4 PCR-Analyse der Organe der mit NDV und Reoviren therapierten Mäuse	75
4.6 FACS-Analyse der Organe.....	75
4.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit NDV therapierten Mäuse.....	75
4.6.2 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit Reoviren therapierten Mäuse.....	75
4.6.3 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit einer Kombination aus NDV und Reoviren therapierten Mäuse	76
4.7 Gewebsschnitte der Organe	76
4.7.1 Gewebsschnitte der Organe der mit NDV infizierten Mäuse.....	77
4.7.2 Gewebsschnitte der Organe der mit Reoviren therapierten Mäuse	79
4.7.3 Gewebsschnitte der Organe der mit beiden Viren infizierten Mäuse	80
4.8 Untersuchung der Serumproben der Mäuse auf Anti-Virus-Antikörper.....	80
Kapitel 5 Diskussion.....	80
5.1 Die Kombination von onkolytischen Viren mit anderen antitumoralen Therapiemethoden	80
5.2 Die Kombination mehrerer onkolytischer Viren miteinander	81
5.3 Die Bedeutung dieses Versuchs im Hinblick auf die onkolytische Wirksamkeit von Reoviren und NDV in Kombination auf Glioblastome	81
5.3.1 Die onkolytische Wirksamkeit von NDV auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch	82
5.3.2 Die onkolytische Wirksamkeit von Reoviren auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch	83
5.3.3 Die onkolytische Wirksamkeit einer Kombination aus NDV und Reoviren auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch.....	84
5.4 Die Wirkung von NDV und Reoviren nach intratumoraler Applikation auf verschiedene Mausorgane	86
5.5 Zukünftige Aufgaben in der Forschung der Therapie von NDV und Reoviren in Kombination.....	88
Kapitel 6 Literaturverzeichnis.....	89
Kapitel 7 Publikation/Danksagung.....	96
Kapitel 8 Lebenslauf.....	97
Kapitel 9 Anhang.....	98

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Übersicht häufiger molekularpathologischer Veränderungen in Glioblastomen: Tumorsuppressorgene
- Tabelle 2 Übersicht häufiger molekularpathologischer Veränderungen in Glioblastomen: Protoonkogene
- Tabelle 3 : Beispiel für die quantitative Auswertung einer durchflusszytometrischen Messung
- Tabelle 4: Darstellung der Viruslast in Partikeln pro g Gewebe, des prozentualen Anteils virusinfizierter Zellen und des relativen Tumorendvolumens aller mit Viren behandelten Maustumoren sowie der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Inverse Modifikation intrazellulärer Signalwege durch Wachstumsfaktoren oder Reovirus
- Abbildung 2: makroskopisches Erscheinungsbild des Tumors bei Sektion
- Abbildung 3: Darstellung eines Punktwolkendiagrammes zum besseren Verständnis der Auswertung der Ergebnisse der FACS-Analyse
- Abbildung 4: Verlauf des mittleren Tumorwachstums in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion bis zum Tod der ersten 7 Mäuse
- Abbildung 5: Verlauf des Tumorwachstums der Kontrollmäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion
- Abbildung 6: Verlauf des Tumorwachstums der mit Reovirus therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion
- Abbildung 7: Darstellung der Messungen Reovirus-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie
- Abbildung 8: gemeinsame Darstellung der Tumorzellenentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen nach intratumoraler Reovirus-Applikation
- Abbildung 9: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 45-47 nach intratumoraler Applikation von Reovirus

- Abbildung 10: Verlauf des Tumorwachstums der mit NDV therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion
- Abbildung 11: Darstellung der Messungen NDV-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie
- Abbildung 12: gemeinsame Darstellung der Tumorzellenentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen nach intratumoraler Applikation von NDV
- Abbildung 13: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 49 und 50 nach intratumoraler Applikation von NDV
- Abbildung 14: Verlauf des Tumorwachstums der mit Reovirus und NDV in Kombination therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion
- Abbildung 15: Darstellung der Messungen NDV- und Reovirus-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie
- Abbildung 16: gemeinsame Darstellung der Tumorzellenentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen nach intratumoraler Applikation von NDV und Reovirus in Kombination
- Abbildung 17: Immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 53 und 54 nach intratumoraler Applikation von NDV und Reovirus
- Abbildung 18: Vergleich der Viruskonzentration in der Mausleber nach intratumoraler Applikation von NDV in Virusteilchen pro g Gewebe
- Abbildung 19: Vergleich der Viruskonzentration in den Mausorganen nach intratumoraler Applikation von Reovirus und Reovirus + NDV in Virusteilchen pro g Gewebe
- Abbildung 20: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Organe der mit NDV therapierten Mäuse
- Abbildung 21: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Organe der mit Reovirus therapierten Mäuse

Abkürzungsverzeichnis

abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AJCC	american joint commission on cancer
AK	Antikörper
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNS	complementary DNS
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp	crossing point
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAF	decay accelerating factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure(n)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA/RNA	doppelsträngige DNA/RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal-growth-factor-receptor
EID50	50% egg infective dose
FACS	fluorescence activates cell sorting
FCS	fetal calf serum

FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL1	Fluoreszenkanal 1
FRET	fluoreszenz resonanz energie transfer
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HN	Hämngglutinin-Neuraminidase
HSV	Herpes-simplex-Virus
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ISGs	Interferon-stimuliertes Gen
MDM2	murine double minute oncogene
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter
MOI	multiplicity of infection
ms	Millisekunde(n)
MTD	maximal tolerierbare Dosis
NDV	Newcastle-Disease-Virus
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OV	onkolytische Viren
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PE	Phycoerythrin

PFU	plaque forming unit
p.i.	post infectionem
PKR	proteinkinase R (double-stranded RNA—dependent protein kinase)
pmol	Picomol
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAS	rat sarcoma-onkogen
RB	Retinoblastom-Protein
Reovirus	respiratory enteric orphan virus
Reovirus T3D	Reovirus Typ 3 Dearing
RNA	ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure(n)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
s.	siehe
SCC	squamous cell carcinoma
SCID	severe combined immunodeficiency
sec	Sekunde
sog.	sogenannt/e/er/es
SPF	specific pathogen free
STAT	signal transducer and activation of Transcription
TH	T-Helferzelle
TNF- β	Tumornekrosefaktor
TP53	tumor protein 53
U	Unit
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Kapitel 1 Zusammenfassung und Summary

1.1 Zusammenfassung - Die onkolytische Wirksamkeit von Newcastle Disease Virus und Reovirus in Kombination zur Therapie des Glioblastoms am Mausmodell

Das Glioblastoma multiforme ist ein besonders aggressiver Tumor, für den es aktuell noch keine kurative Therapie gibt. Das Newcastle-Disease-Virus und das Reovirus sind onkolytisch wirksame Viren. Für beide wurden in verschiedenen Versuchen *in vitro* und *in vivo* und in klinischen Studien bei unterschiedlichsten Tumorarten antikanzerogene Wirkungen nachgewiesen. Sowohl das Newcastle-Disease-Virus als auch das Reovirus erwiesen sich bei vielen Glioblastomzelllinien als therapeutisch wirksam.

Da die Therapie mit onkolytischen Viren häufig nur zur vorübergehenden oder unvollständigen Tumorregression geführt hat, entstand die Idee, mehrere onkolytische Viren miteinander zu kombinieren und so einen synergistischen onkolytischen Effekt zu erzielen. *In-vitro*-Versuche, bei denen Newcastle-Disease-Viren und Reoviren als Kombinationstherapie für Glioblastomzellen untersucht wurden, waren erfolgreich. Es zeigte sich eine synergistische onkolytische Wirkung der beiden Viren.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese Ergebnisse *in vivo* an der Maus zu bestätigen.

Dazu wurden immundefizienten Mäusen Glioblastomzellen subkutan in der Flanke injiziert, die zu Tumoren heranwuchsen. Als Therapieversuch wurden sowohl Reoviren als auch Newcastle-Disease-Viren einzeln und in Kombination intratumoral appliziert. Eine Kontrollgruppe bekam *phosphate buffered saline* (PBS) injiziert.

Täglich wurde die Tumorgroße gemessen. Die relative Volumenzunahme der Tumoren bei den einzelnen Versuchsgruppen wurde am Ende des Versuchs verglichen. Zur Analyse der systemischen Virusausbreitung wurde den Mäusen mehrmals Blut abgenommen und später auf Virusmaterial untersucht.

Am Ende der Versuchsreihe wurden die Mäuse getötet und sezirt, es wurden sowohl die Tumoren als auch die Leber, die Milz, die Lunge, das Gehirn und das Herz entnommen und auf Virusmaterial untersucht.

In jedem der Organe wurde die Viruslast durch eine *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) quantifiziert. Um die Rate virusinfizierter Zellen zu ermitteln, wurden von Tumor-, Leber- und Gehirngewebe durchflusszytometrische Messungen durchgeführt.

Um die Virusausbreitung in den einzelnen Geweben zu ermitteln, wurden Gefrierschnitte aller entnommenen Organe angefertigt, immunhistochemisch gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass die Therapie mit Newcastle-Disease-Viren und Reoviren in Kombination der Monotherapie mit den einzelnen Viren unter den gewählten Bedingungen überlegen ist. Es wurde zwar keine vollständige, anhaltende Tumorregression erreicht, aber in der Versuchsgruppe, die die Kombinationstherapie aus Reoviren und Newcastle-Disease-Viren appliziert bekommen hatte, schritt die Tumorprogression langsamer voran und die prozentuale Tumolvolumenzunahme war kleiner. Interessanterweise wurden bedeutend höhere Viruskonzentrationen und Infektionsraten in den Tumoren erreicht, die mit beiden Viren behandelt worden waren.

Die Monotherapie mit dem Newcastle-Disease-Virus zeigte auch eine gute Wirksamkeit, allerdings nicht so gut wie die Kombination der beiden Viren. Die Monotherapie mit Reoviren war unbefriedigend, sie zeigte keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe. Weder die Therapie mit den einzelnen Viren noch die Viruskombination löste in den Mäusen Krankheitssymptome aus.

In den meisten kleineren Tumoren wurde eine relativ hohe Viruskonzentration gemessen, in den meisten größeren Tumoren wurde eine relativ niedere Viruskonzentration gemessen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die eingesetzte Viruskonzentration im Verhältnis zum Tumolvolumen zu niedrig war.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse sollten die Versuche mit höherer Tierzahl und höheren Viruskonzentrationen wiederholt werden. Im nächsten Schritt könnte die Viruskombination dann an Glioblastompatienten im Rahmen von klinischen Studien getestet werden.

1.2 Summary – The oncolytic efficacy of the combination of the Newcastle disease virus and the Reovirus as a therapy for Glioblastoma in vivo in mice

Glioblastoma multiforme is a particularly aggressive tumor. Currently no therapy exists to cure this cancer. A promising treatment is the therapy with oncolytic viruses such as Newcastle disease viruses and Reoviruses. Both of them demonstrated potential to treat a broad range of human cancers in several clinical studies. Recent results from in-vitro-experiments with several Glioblastoma cell lines suggest that a synergistic oncolytic effect is attained by using a combination of Newcastle disease viruses and Reoviruses. This thesis aims at confirming these results in vivo in mice.

The experiments were carried out as follows. Immunodeficient mice were split into four groups of four mice and Glioblastoma cells were injected subcutaneously in the flank of each mouse. Newcastle disease viruses, Reoviruses, a combination of both, and phosphate buffered

saline (PBS) was injected into the tumors of each mouse in the respective group. The PBS-group served as a control group. During the experiment, the size of the tumors was measured daily. Furthermore, blood samples were taken several times to analyze the systemic dissemination of the viruses.

At the end of the trial the mice were killed and anatomized. The relative growth of the tumor volume was compared between the four groups. The concentration of viruses in the tumor, liver, spleen, lung, brain and heart of each mouse was quantified using real time polymerase chain reaction.

The rate of virus-infected cells of the liver, the brain and the tumors was quantified using flow cytometry. To detect the dissemination of the viruses, frozen sections of each organ were taken and stained immunohistochemically. The probes were evaluated using a fluorescence microscope.

The experiments show that the simultaneous therapy with Newcastle disease viruses and Reoviruses is superior to the therapy with single viruses. The tumors did not regress completely, but the progression of the tumors was much slower, and the increase of the percental volume of the tumors was much lower in the group that received the virus-combination than in the other groups. Interestingly, significantly higher virus concentrations and infection-rates were found in the tumors treated with both viruses.

The tumors of the mice treated with the Newcastle-Disease-Virus progressed slower compared to the control-group, whereas the therapy with the Reovirus was disappointing since there was no evidence for an advantage compared to the control-group.

No side-effects could be observed during the trials, neither in the group treated with the single viruses, nor in the group treated with the virus-combination.

Most of the small tumors showed relatively high virus-concentrations in contrast to most of the large ones. Therefore the virus concentration seems to be too low to reach an optimal therapeutic level.

The results are very promising, but it is suggested that the experiments are repeated with larger groups of mice and higher virus concentrations. That should provide statistically stronger evidence. A further step could be the evaluation of the combined virus therapy in Glioblastoma patients.

Kapitel 2 Einleitung

2.1 Was sind onkolytische Viren?

Onkolytische Viren sind Viren, die in Tumorzellen eindringen und sie zerstören. Die Viren können nur entartete Zellen infizieren, sich in ihnen replizieren und durch ihre zytotoxischen Mechanismen die Tumorzellen zerstören. Sie verschonen immer normale Zellen [11].

Es gibt onkolytische Viren, die von Natur aus onkolytisch sind, wie z. B. das Reovirus und das Newcastle-disease-Virus (NDV) [14, 54]. Es ist jedoch auch möglich, Viren genetisch so zu verändern, dass sie onkolytische Eigenschaften bekommen, wie z. B. beim Adenovirus ONYX-015 [50].

Es gibt viele Viren, deren Genome relativ leicht verändert werden können. Durch die Veränderung bestimmter viraler Gene hat man die Möglichkeit, die Spezifität der Viren für Tumorzellen und ihre zytotoxische Wirksamkeit zu modifizieren [11].

In einer Zelle, die zu einer Tumorzelle entartet, vollziehen sich in einigen Genen Mutationen, die zur Bösartigkeit der Tumorzelle beitragen. Häufig handelt es sich dabei um Veränderungen in Tumorsuppressorgenen oder in Protoonkogenen. Einige Mutationen im Abwehrprogramm der Zellen gegen Viren sind im Rahmen der Tumorgenese auch bekannt. Manche Viren sind in der Lage, solche tumorspezifischen Veränderungen auszunutzen und damit spezifisch maligne entartete Zellen zu infizieren [62].

2.2 Mechanismen der Tumorselektivität onkolytischer Viren

Onkolytische Viren können sich nur in Tumorzellen replizieren und zu deren Untergang führen. Normale Zellen werden nicht von onkolytischen Viren infiziert.

Für diese Selektivität sind verschiedene Mechanismen in den unterschiedlichen Viren gefunden worden.

Manche onkolytische Viren sind auf eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen angewiesen. Hierbei benötigt das Virus Rezeptoren, die an der Oberfläche der Tumorzelle exprimiert werden, an die es mit seinen viralen Oberflächenproteinen bindet und so in die Tumorzelle eindringt [39].

Onkolytische Viren, die Tumorzellen aufgrund ihrer veränderten Oberflächenmoleküle infizieren, können nur einzelne Tumorzellarten befallen, auf denen bestimmte Oberflächenmoleküle exprimiert werden. Beispiele für solche Oberflächenmoleküle sind DAF (decay accelerating factor) und CD46. Sie schützen Zellen vor der Zerstörung durch das

Komplementsystem und werden deswegen in manchen Tumorzellen vermehrt exprimiert [24].

Das Coxsackievirus und ein spezifischer Stamm von Masernviren erhalten durch diese Rezeptoren Zugang zur Zelle. Wenn man einen Patienten mit solchen Viren therapieren will, kann man vorher prüfen, ob diese Rezeptoren auf seinem Tumor exprimiert werden, und somit den Therapieerfolg einschätzen [2].

Eine andere Möglichkeit der Tumorspezifität ist die Abhängigkeit der Viren von bestimmten intrazellulären Signalwegen oder von der Amplifikation bestimmter Gene, die in Tumorzellen vermehrt aktiv sind. Einige Signalkaskaden, die die Tumorgenese begünstigen, ermöglichen auch die Virusvermehrung [11].

Dabei handelt es sich um Signalwege, die in Tumorzellen aktiviert oder im Gegensatz zu normalen Zellen überaktiv sind. Hierzu zählen z. B. ein überaktiver RAS-Signalweg [18], ein veränderter Interferon-Signalweg [40], Defekte im p16/RB-Tumorsuppressor-Signalweg [19] und Defekte im p53-Tumorsuppressorsignalweg [68].

Wenn ein Virus Tumoren aufgrund der Veränderung intrazellulärer Signalwege selektiert, können meist viele verschiedene Tumorarten von diesem Virus infiziert werden, da die Veränderung bestimmter Signalwege in vielen verschiedenen Tumoren vorkommt [74].

Tumorselektivität kann auch dadurch erreicht werden, dass man für die Virusinfektion wichtige virale Gene mit Promotoren koppelt, die nur in Tumorzellen aktiv sind [51].

In normalen Zellen können Viren oft nicht überleben und sich vermehren, da durch das Virus antivirale Abwehrmechanismen, wie z. B. die Apoptose, aktiviert werden. In Tumorzellen hingegen sind diese Programme oft inaktiv [10, 44].

Viele Tumoren verändern das Mikromilieu ihrer unmittelbaren Umgebung, z. B. dadurch, dass sie vermehrt tumorspezifische Proteasen produzieren. Das kann für die Selektion onkolytischer Viren genutzt werden. Bestimmte Oberflächenmoleküle der Viren, die für deren Infektiosität essentiell sind, können so verändert werden, dass sie nur durch tumorspezifische Proteasen aktiviert werden. So bleibt das Virus in der Umgebung normaler Zellen ungefährlich [56].

2.3 Mechanismen der viralen Onkolyse

Onkolytische Viren bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen, um Tumorzellen zu zerstören.

Sie können durch ihre Infektion und ihre Replikation in der Wirtszelle direkt zytolytisch wirken, z. B. dadurch, dass sie durch ihre Vermehrung Tumorzellen zerstören, oder durch die Expression bestimmter viraler Gene, die Apoptose in der infizierten Zelle auslösen [59].

Einige Viren produzieren zytotoxische Proteine und zerstören so ihre Wirtszelle [93].

Andere Viren, die sich durch „budding“ aus den Zellen ausschleusen, können die Zelle durch exzessiven Membranverlust zerstören.

Einige Viren sind auch dazu in der Lage, das spezifische und unspezifische Immunsystem auf den Tumor zu lenken. Tumorzellen sind oft nur schwach immunogen, häufig exprimieren sie weniger MHC-Oberflächenantigene als normale Zellen. Viren wiederum führen oft in der Wirtszelle zu Veränderungen der Zelloberflächenmoleküle und können dadurch die Immunogenität der Tumorzellen erhöhen [31, 92].

Ein weiterer Mechanismus für die Tumorerstörung durch Viren ist die Sensibilisierung der Tumorzellen für andere Therapieansätze. Manche Viren können durch ihre Infektion Tumorzellen empfindlicher für eine Chemotherapie oder Bestrahlung machen. Diese Viren können so als Adjuvantien eingesetzt werden [76].

Durch die Verbesserungen in der Gentechnologie ist man inzwischen auch in der Lage, Virusgenome zu verändern und so die viralen Eigenschaften zu modellieren. Onkolytische Viren können z. B. als Vektoren für therapeutische Transgene benutzt werden. Durch die Replikation des Virus kommt es auch zur Amplifikation dieser Transgene, was ein Vorteil gegenüber replikationsinkompetenten Vektoren ist, da so der onkolytische Effekt der Transgen-Produkte gesteigert werden kann [64].

Bisher gibt es drei Ansätze zur Verbesserung der onkolytischen Wirkung von RNA-Viren durch genetische Modifikationen.

Erstens besteht die Möglichkeit, die viralen Oberflächenproteine so zu verändern, dass das Virus Tumorzellen, die bestimmte Rezeptoren besitzen, infiziert. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die viralen Gene, deren Produkte der zellulären Abwehr durch Proteinkinase R (PKR) oder Interferone entgegenwirken, auszuschalten, sodass die Viren nur in Zellen replizieren können, in denen diese Abwehrmechanismen defekt sind.

Eine dritte Strategie ist, in das virale Genom Transgene einzufügen, die z. B. für Suizidproteine (p53, TNF α , MCP-3), Thymidin-Kinase, Zytokine (IL2, IL4) oder Prodrug-converting-enzyme kodieren und so die tumorzerstörende Potenz der Viren verbessern [75].

Ein weiterer Ansatz in der Therapie mit onkolytischen Viren ist, die Viren als „Anti-Tumor-Impfung“ einzusetzen. Diese Impfung kann aus viralen Onkolysaten bestehen oder als Lebend-Zell-Vakzine [78] eingesetzt werden.

Auch die Applikationsform der Viren kann je nach Virus- und Tumorart verschieden sein: Die Viren können direkt in den Tumor, intravenös, intramuskulär, in den Darm oder durch Inhalation verabreicht werden.

2.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Therapie mit onkolytischen Viren

Das Immunsystem spielt in der Therapie mit onkolytischen Viren eine große Rolle. Es kann die therapeutische Wirkung unterstützen, es kann sie aber auch behindern.

Das Immunsystem hat die Aufgabe, eingedrungene Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. So werden frei zirkulierende Viren, virusassoziierte und zellassoziierte virale Genprodukte vom Immunsystem erkannt. Diese Pathogene aktivieren das Immunsystem.

B-Lymphozyten können mithilfe ihrer Oberflächenrezeptoren virale Antigene erkennen und werden dadurch zur Produktion antiviraler Antikörper aktiviert. Diese Antikörper können die eingedrungenen Viren neutralisieren oder durch die Aktivierung des Komplementsystems die Zerstörung der Viren vermitteln. Die Bildung von Antikörpern kann so ein großes Hindernis für die Ausbreitung der Viren sein.

Werden onkolytische Viren intravenös appliziert, können sie unter Umständen zum Großteil von der Leber abgefangen werden, was eine effektive Virusausbreitung verhindert. Von den übrig bleibenden Viren können viele von zirkulierenden Blutzellen eliminiert, durch das Komplementsystem zerstört oder bei schon vorbestehender Immunität durch Antikörper neutralisiert werden [62].

Um die Viren vor dem retikuloendothelialen System zu schützen, wurde eine neue Methode entwickelt. Dazu wurden Viren in einen inerten Polymermantel eingehüllt, der verhindert, dass das retikuloendotheliale System die Viren aus der Zirkulation abfangen kann. Dadurch wurde erreicht, dass sich die Bioverfügbarkeit sowie die Serum-Halbwertszeit des Virus signifikant erhöhten [33], außerdem wurden die umhüllten Viren nicht von neutralisierenden Antikörpern abgefangen. Allerdings verdeckte die Umhüllung Oberflächenproteine der Viren, sodass diese nicht mehr in der Lage waren, zelluläre Rezeptoren zu erkennen, sie verloren dadurch ihre Infektiosität [25].

Viren werden auch von antigenpräsentierenden Zellen erkannt. Antigenpräsentierende Zellen verarbeiten die Viren und präsentieren kurze virale Peptidfragmente auf MHC-Klasse-II-Molekülen an CD4⁺-T-Lymphozyten, die dadurch aktiviert werden. Diese schütten daraufhin Zytokine aus (z. B. TH1: IL-2, IFN- γ , TNF- β ; TH2: IL-4 und IL-10) und aktivieren damit die antivirale Immunabwehr.

Wenn Viren in Zellen eindringen, werden virale Proteine unter anderem von intrazellulären Proteasen in Peptidfragmente zerkleinert und auf MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche an CD8⁺-T-Zellen präsentiert. Die CD8⁺-Zellen werden durch die fremden Peptidfragmente aktiviert und zerstören die virusbefallene Zelle [41].

Das spezifische zelluläre Immunsystem besitzt die Fähigkeit, die virale Onkolyse zu unterstützen. Nach der Infektion der Tumorzellen durch Viren infiltrieren Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen die Umgebung und es werden Zytokine ausgeschüttet. Da auf virusbefallenen Tumorzellen auch virale Antigene durch die MHC-I-Moleküle präsentiert werden können, werden diese Zellen von Lymphozyten erkannt und zerstört. Die T-Lymphozyten verändern sich dabei durch noch unbekannte Mechanismen so, dass sie auch durch tumorspezifische Antigene aktiviert werden und so zum Aufbau einer Anti-Tumor-Immunabwehr beitragen. Durch die Virusinfektion mit einigen der onkolytisch wirksamen Viren wird also die Immunogenität der Tumorzellen erhöht [45].

Auch die unspezifische Immunabwehr beeinflusst die Wirkung onkolytischer Viren.

Interferone, die zu den Zytokinen gehören, haben eine wichtige antivirale Funktion. Die Ausschüttung von Interferonen wird z. B. unter anderem durch doppelsträngige RNA im Zytoplasma einer virusinfizierten Zelle ausgelöst, sodass benachbarte, nicht-infizierte Zellen vor der Virusinfektion geschützt bleiben [10, 49].

Interferone wirken in ihren Zielzellen durch die Aktivierung der Transkription bestimmter Genprodukte, den so genannten Interferon-stimulierten Genen (ISGs). Zu den ISGs gehören z. B. Gene für MHC-Komplexe, Apoptose-fördernde Gene und anti-angiogenetische sowie zellwachstumsstoppende Gene [22]. Sie wirken also antiviral und antiproliferativ. Interferone spielen deswegen auch eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegen Tumorzellen.

Tumorzellen entwickeln häufig im Laufe ihrer Genese Resistenzen gegen Interferone, da dies für die entarteten Zellen einen Selektionsvorteil bietet. Das führt dazu, dass sich onkolytische Viren in solchen Tumorzellen gut ausbreiten können [87].

Ein anderer Wirkmechanismus der Interferone ist die Aktivierung der PKR, einem Enzym, das aktiviert wird, wenn Viren in die Zelle eindringen. Die PKR verhindert eine Virusausbreitung. In manchen Tumoren liegen Defekte im IFN- α/β -Signalweg vor, so dass auch hier die Aktivierung der PKR bei Virusbefall ausbleiben kann. Viren, die nicht in der Lage dazu sind, die PKR auszuschalten, wie z. B. Reovirus, können diese Mutation in Tumorzellen ausnutzen, um selektiv in ihnen zu replizieren [60, 103].

2.5 Erhoffte Vorteile der Therapie mit onkolytischen Viren gegenüber herkömmlichen Krebstherapien

Onkolytische Viren haben die Eigenschaft, sich nur in Tumorzellen zu vermehren und nur sie spezifisch zu zerstören.

Dadurch, dass viele onkolytische Viren die Fähigkeit zur Replikation besitzen, hofft man, dass sie in vivo in der Lage sind, eine therapeutische onkolytische Dosis von Viren über längere Zeit selbständig aufrechtzuerhalten [62].

Einige onkolytische Viren können durch gentechnische Verfahren verändert werden und dadurch sowohl in ihren tumorspezifischen als auch in ihren tumorzerstörerischen Eigenschaften z. B. durch Einführen von Transgenen modifiziert werden. So können sie auch als Vektoren für zytotoxische Gene verwendet werden [43].

Da onkolytische Viren selektiv Krebszellen befallen und auch nur diese zerstören, sind sie im Gegensatz zur Chemotherapie und zur Bestrahlung relativ nebenwirkungsarm. Außerdem können einige onkolytische Viren Tumorzellen für Bestrahlung und Chemotherapie empfindlicher machen [50]. Onkolytische Viren könnten so andere Krebstherapien in ihrer Wirkung unterstützen.

Da manche onkolytische Viren in der Lage sind, eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren und dadurch systemisch wirken, könnten sie auch bei metastasierten Krebserkrankungen zur Heilung führen. Sie wirken dann wie eine Impfung gegen den Tumor [5].

2.6 Glioblastome

Glioblastome sind die häufigsten und bösartigsten astrozytären Tumore. Nach der WHO-Klassifikation werden sie als Astrozytome IV. Grades bezeichnet. Glioblastome können de novo entstehen, oder sie entwickeln sich sekundär aus Astrozytomen niedrigeren Malignitätsgrades. Meist treten sie in der weißen Substanz der Großhirnhemisphären auf und wachsen diffus infiltrierend. Glioblastome können über den Liquor metastasieren und so Abtropfmetastasen bilden. Das Haupterkrankungsalter liegt bei 55-65 Jahren.

Symptomatisch können Glioblastome Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, psychische Veränderungen und neurologische Ausfälle hervorrufen. Die Symptome werden maßgeblich durch die Lokalisation und das Wachstumsverhalten des Tumors bestimmt. Da Glioblastome häufig von einem perifokalen Ödem begleitet werden, entsteht oft ein erhöhter Hirndruck mit der entsprechenden Symptomatik.

Als Therapie für das Glioblastom stehen die radikale operative Entfernung des Tumors und postoperative Strahlentherapie sowie eventuell eine adjuvante, postoperative Chemotherapie zur Verfügung. Sechs bis zwölf Monate nach Tumorentfernung stellt sich immer ein Rezidiv ein, eine Heilung ist derzeit nicht möglich. Eine totale chirurgische Exzision ist nicht möglich, da Glioblastome diffus ins ganze Hirngewebe infiltrieren [47].

Pathologisch ist für das Glioblastom eine bunte Schnittfläche typisch, es treten Nekrosen, zystische Zerfallshöhlen und Einblutungen auf. Mikroskopisch sieht man beim Glioblastom pathologische glomeruläre Gefäßproliferationen und Nekrosen.

Molekularpathologisch entstehen Glioblastome einerseits durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Punktmutationen, Gendeletionen oder durch Hypermethylierung der DNA im Promotorbereich dieser Gene, andererseits durch die Aktivierung von Protoonkogenen, z. B. durch Genamplifikation. Einige dieser Veränderungen werden in Tabelle 1 und 2 gezeigt.

Gen	Chromosom	Veränderung	Funktion des Genprodukts
TP53	17p13	Mutation	Transkriptionsfaktor
RB1	13q14	Mutation	Zellzyklusregulator
CDKN2A	9p21	Homozygote Deletion, Hypermethylierung	Inhibitor von Zyklusabhängigen Kinasen
P14ARF	9p21	Homozygote Deletion, Hypermethylierung	Inhibitor von MDM2
PTEN	10q23	Mutation	Protein- und Lipidphosphatase
MGMT	12q26	Inaktivierung durch Hypermethylierung	DNA-Reperatur

Tabelle 1 Übersicht häufiger molekularpathologischer Veränderungen in Glioblastomen: Tumorsuppressorgene [72, 73]

EGFR	7p11	Amplifikation, genomisches Rearrangement	Wachstumsfaktorrezeptor
PDGFR	4q12	Amplifikation	Wachstumsfaktorrezeptor
CDK4	12q13	Amplifikation	Zyklusabhängige Kinase
MDM2	12q15	Amplifikation	Inhibitor von p53

Tabelle 2 Übersicht häufiger molekularpathologischer Veränderungen in Glioblastomen: Protoonkogene [72]

Die Therapie des Glioblastoms mit onkolytischen Viren hätte den Vorteil, dass die Viren auch diffus infiltrierende Glioblastomzellen infizieren können und somit eine Chance bieten, alle Tumorzellen zu zerstören. Außerdem wären bei einer Therapie mit Viren, die spezifisch nur

Tumorzellen infizieren, die Nebenwirkungen viel geringer als bei einer Chemo- oder Radiotherapie.

2.7 Das Reovirus als onkolytisches Virus

Reovirus (Respiratory Enteric Orphan Virus) ist ein ubiquitär vorkommendes Virus, das in die Familie der Reoviridae und zur Gattung der Orthoreoviridae gehört [1]. Das Virus besitzt keine Hülle, es wird von einer doppelten Proteinkapsel umgeben, deren äußerer Durchmesser ca. 80 nm beträgt [13]. Die innere Proteinhülle umgibt das Genom, das äußere Kapsid ist zwölfkantig und ikosaederförmig.

Es gibt drei Serotypen von Reovirus, die sich auf ihre Hämagglutinationsaktivität beziehen. Das Genom des Reovirus besteht aus zehn Segmenten doppelsträngiger RNA, die für elf Proteine kodiert. Jedes RNA-Segment kodiert für ein Protein, außer das S1-Gensegment, welches bicistron ist [23].

Reovirus kommt in den Atemwegen und im Gastrointestinaltrakt des Menschen vor. Es scheint im Menschen keine Krankheiten hervorzurufen, oft wird es bei symptomlosen Patienten nachgewiesen [57]. 70-100% der erwachsenen Bevölkerung sind Reovirus-seropositiv [80], ohne dass sie bei der Infektion offenkundige Symptome gehabt haben [58]. Das Virus ist sehr umweltresistent.

Reoviren sind in der Lage, gezielt Krebszellen zu befallen, in ihnen zu replizieren und sie zu zerstören. Dazu nutzen sie Signalwege aus, die in manchen Tumorzellen aktiv sind [88, 89]. Um in einer Zelle replizieren zu können, ist das Reovirus auf einen aktiven Ras-Signalweg angewiesen, weil dann die PKR inaktiv ist [88]. Die double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) ist ein zytosolisches Enzym, das durch ungewöhnliche Nukleinsäurestrukturen, wie z. B. die doppelsträngige RNA von Reovirus aktiviert wird. PKR phosphoryliert in aktiver Form den Translationsfaktor eIF2 α und hemmt ihn dadurch, woraufhin die Proteinsynthese in der betroffenen Zelle gestoppt wird und so eine Virusvermehrung verhindert wird [99]. Zusätzlich aktiviert die PKR auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B, wodurch die Transkription proinflammatorischer Gene erhöht wird [18]. Das Ausschalten der PKR ist also für viele Viren entscheidend, um zu überleben.

In Tumorzellen ist der Ras-Signalweg häufig überaktiv, hier können dann Viren, wie z. B. Reovirus, die auf eine inaktive PKR angewiesen sind, replizieren. Normale Zellen, in denen die PKR aktiv ist, werden dabei vor der Virusinfektion verschont.

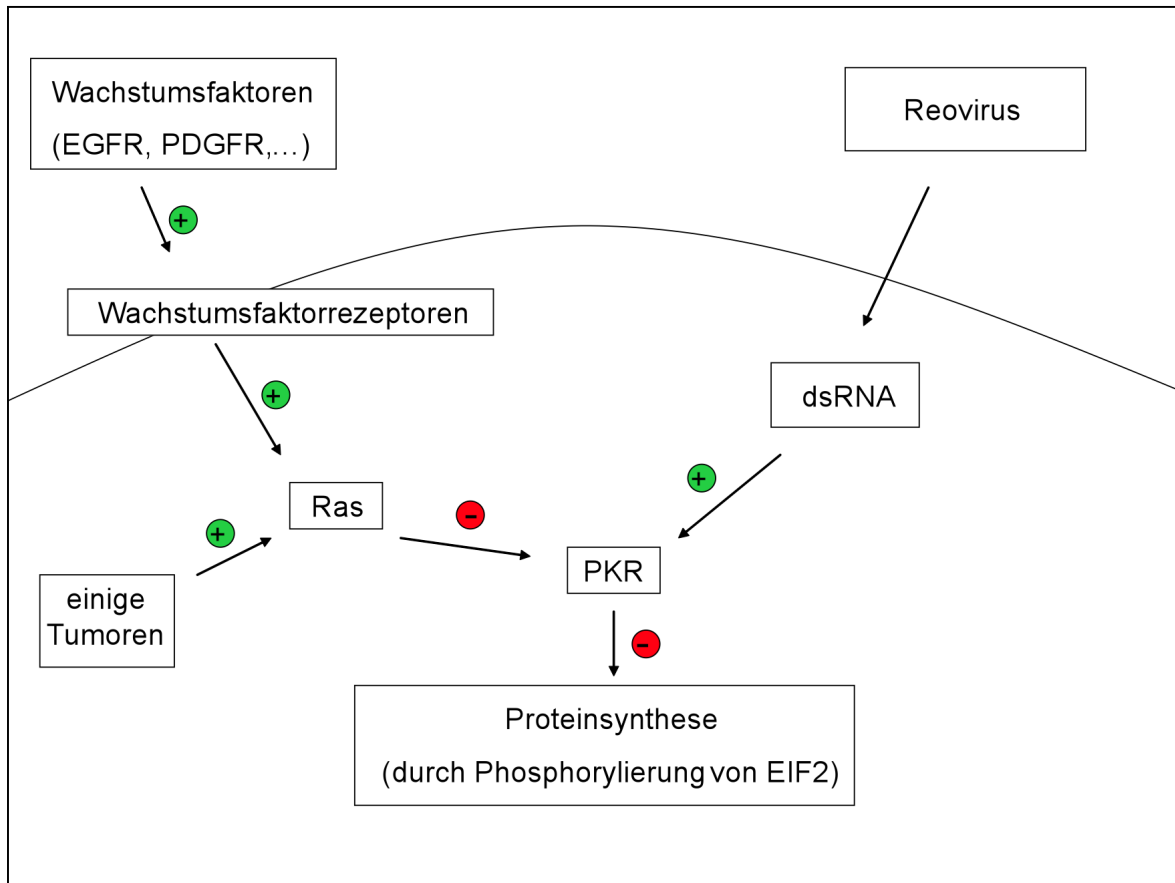


Abb. 1: Inverse Modifikation intrazellulärer Signalwege durch Wachstumsfaktoren oder Reoviren [3]

Reovirus ist auch in der Lage, die Produktion von Interferon zu induzieren. Diese Erkenntnis führte zur Vermutung, dass die Immunantwort des Wirts gegen das Virus einen positiven onkolytische Effekt hat [85].

Reovirus wurde schon in verschiedenen Experimenten auf sein onkolytisches Potential untersucht und zeigte vielversprechende Ergebnisse. Bei Mausexperimenten z. B. wurden Mäuse, die Glioblastome hatten, mit Reovirus behandelt, sie überlebten signifikant länger als die Kontrollgruppe und blieben gesünder [98].

Auch in vitro zeigt das Reovirus ein starkes onkolytisches Potential.

Die Replikation von Reoviren kann durch Mycophenolsäure, einem Immunsuppressivum, das bei Nierentransplantationen gegeben wird, verhindert werden. Für die Sicherheit ist es wichtig, beim Umgang mit Viren auch ein Mittel zu haben, mit dem die Viren gestoppt werden können.

Die gentechnische Modifikation des Genoms vom Reovirus ist bis heute noch nicht durchführbar, da sein in zehn Segmente geteilte Genom aus doppelsträngiger RNA gentechnisch sehr schwer veränderbar ist [1].

Problematisch ist, dass das Reovirus bei Mausexperimenten in manchen immunsupprimierten

Mäusen schwere Infektionen ausgelöst hat, in immunkompetenten Organismen hingegen ist das Reovirus harmlos [53].

2.8 Das Newcastle Disease Virus als onkolytisches Virus

NDV ist ein Geflügelvirus, das zur Familie der Paramyxoviren und zur Gattung der Avulaviren gehört.

Paramyxoviren haben eine Virionengröße von 150-250 nm im Durchmesser, sie sind pleomorph, oft filamentös und können manchmal polyploide Genome aufweisen [61].

Sie rekombinieren nicht untereinander, neigen aber zur Rekombination mit phänotypisch ähnlichen Viren, z. B. den Orthomyxoviren, zusätzlich neigen Paramyxoviren zu Punktmutationen, sodass beachtliche Unterschiede zwischen Isolaten von NDV-Stämmen vorkommen [32, 94].

In die Familie der Paramyxoviren gehören z. B. auch das Mumps-Virus, das Masernvirus, humane Parainfluenzaviren und das Respiratory Syncytial Virus, sie sind eng mit NDV verwandt [83].

Das Genom von NDV ist nicht segmentiert und besteht aus einzelsträngiger RNA mit negativer Polarität.

Es enthält sechs Gene, die sich über ca. 15.200 Kilobasen erstrecken [86].

NDV ist ein umhülltes Virus, dessen Hülle zwei verschiedene Glykoproteine enthält: Die Hämglutinin-Neuraminidase, die vom HN-Gen codiert wird, ermöglicht dem Virus das Andocken an die Zelle, und Fusionsproteine, die von F-Genen codiert werden, sie vermitteln die Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran.

Nachdem das Virus in die Wirtszelle eingedrungen ist, wird sein Genom durch die virale RNA-Polymerase in positiv-polarisierte, komplementäre RNA umgeschrieben, die als Vorlage für die negativ-polarisierte RNA der Nachkommen dient.

Weitere Virus-Proteine sind das „large“ L-Protein, das Polymerase-assoziierte P-Protein, das virale Matrix M-Protein und NP-Protein [67].

Die Nachkommen von NDV verlassen die Zelle durch „budding“.

Zwischen den verschiedenen NDV-Stämmen gibt es erhebliche Unterschiede, sowohl im Ausmaß ihrer Virulenz, in der Replikation (komplett vs. inkomplett) als auch in der onkolytischen Wirksamkeit [83].

Die verschiedenen Stämme von NDV werden nach ihrer Virulenz in verschiedene Gruppen unterteilt: Lentogene NDV sind für ihren natürlichen Wirt, also für Geflügel, nicht pathogen, sie können zur Impfung der Tiere genutzt werden (z. B. NDV-HUJ), mesogene NDV, die

mäßig pathogen sind (z. B. 73-T, MTH68 und PV701) und velogene NDV, die hoch pathogen sind.

Mesogene Stämme unterscheiden sich von lentogenen darin, dass sie in der Lage sind, replikationskompetente, infektiöse Nachkommen zu bilden.

Dies wird unter anderem dadurch ermöglicht, dass bei mesogenen Stämmen die inaktive Form des Fusions-Proteins (F0) in die aktive Form (F1) umgewandelt werden kann [28].

NDV ist in der Lage, die Produktion von Zytokinen zu induzieren, unter anderem Interferon und Tumor-Nekrose-Faktor [105]. Außerdem aktiviert NDV NFκB, was z. B. dazu führt, dass in der befallenen Zelle die Expression von MHC-Klasse I-Genen erhöht wird [91].

NDV löst oft starke Antikörper-Antworten aus, die Antikörper sind meist gegen HN- und F-Proteinkomplexe gerichtet [83]. Die Immunreaktionen, die NDV auslöst, ermöglichen die Verwendung dieses Virus nicht nur als onkolytisches Virus, sondern auch Onkolysat [9, 82].

NDV ist in der Lage, über den mitochondrialen/intrinsischen Weg Apoptose auszulösen [97].

NDV repliziert selektiv in Interferon-defekten Zellen. NDV codiert ein Protein, das V-Protein, das antagonistisch zu Interferon wirkt. Das V-Protein kann in Geflügelzellen den Interferon-Signalweg hemmen, indem es ein STAT-Protein bindet (signal transducer and activation of Transcription). In Säugetierzellen ist NDV hierzu nicht in der Lage, es ist im Menschen deswegen auf einen defekten Interferon-Signalweg angewiesen [63].

NDV wurde erstmals 1955 als onkolytisches Virus entdeckt [26]. Es wurde schon oftmals in Studien auf seine onkolytischen Fähigkeiten untersucht und wies in vielen Studien minimale Toxizität und gute Tumorregressionen auf. Inzwischen gibt es schon mehrere klinische Studien mit onkolytischen NDV-Stämmen (z. B. Phase I: PV701 intravenöse Gabe bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, bei denen die konventionelle Therapie versagte [66]).

2.9 Bisherige Erfahrungen und Erfolge mit onkolytischen Viren

Schon 1904 hat man bemerkt, dass die Infektion mit Viren zu einem Rückgang von malignen Erkrankungen führen kann. Damals wurde bei einem Patienten mit Leukämie während einer grippeähnlichen Erkrankung eine drastische Rückgang von Tumorzellen festgestellt [52].

Zwischen den 50er- und 80er-Jahren wurde von mehreren Fällen berichtet, bei denen Virusinfektionen zur Regression von Tumorerkrankungen führten. Unter anderem wurde eine durch Windpocken induzierte Remission einer akuten lymphoblastischen Leukämie berichtet

[6], außerdem von durch Masern induzierte Remissionen von Leukämien [65], Burkitt-Lymphomen [7] und Hodgkin-Lymphomen [90].

Ähnliche Wirkungen traten auch bei Impfungen mit lebenden Viren auf. Die Impfung mit dem Vaccinia-Virus z. B. führte bei einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie zu einer dauerhaften Remission, nachdem sich das Virus systemisch ausbreitet hatte [36]. Bei zwei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen führte eine Masern-Impfung zu Reaktionen des Tumors [34, 77].

Diese Beispiele zeigen, dass Infektionen mit onkolytisch wirksamen Viren oder Impfungen mit abgeschwächten Viren unter bestimmten Umständen zur Regression von Krebserkrankungen führen können.

1996 wurde die erste klinische Studie mit einem onkolytischen Virus durchgeführt, und zwar mit dem Virus ONYX-015 [29].

Inzwischen gibt es über 50 klinische Studien mit onkolytischen Viren, unter anderem mit Reoviren, Adenoviren, Herpes Simplex Viren, NDV, Vaccinia Viren, Coxsackieviren und Masernviren [62].

Die Daten der bisherigen Studien sind in Bezug auf die Sicherheit sehr vielversprechend. Bei über 300 behandelten Patienten gab es nur einen Todesfall, der auf die Behandlung mit OV's zurückzuführen sein könnte [1].

Allgemein scheinen onkolytische Viren gut vertragen zu werden und nebenwirkungsarm zu sein, in den meisten klinischen Studien wurde die maximal tolerierbare Dosis (MTD) nicht erreicht [12, 38].

In manchen Patienten mit Gliomen oder Melanomen kam es bei der Therapie mit onkolytischen Viren zum Rückgang der Tumoren oder zur Stabilisierung der Erkrankung [48, 81]. Bei intratumoraler Injektion breiteten sich die Viren meist nicht systemisch aus, sodass eine metastasierte Tumorerkrankung möglicherweise nicht wirkungsvoll therapiert werden könnte.

2.10 Die Bedeutung der onkolytischen Wirkung von Reoviren in der aktuellen Forschung

Die onkolytische Potenz von Reovirus wurde schon vielfach bei verschiedensten Tumoren untersucht. Dabei hatte Reovirus sowohl in vitro als auch in vivo bei zahlreichen Tumoren gute onkolytische Wirkungen.

In vitro wurde Reovirus auch schon speziell im Hinblick auf Glioblastome getestet. Die Arbeitsgruppe von Wilcox [98] z. B. erforschte die Wirkung von Reovirus Serotyp III auf 24

humane Glioblastomzellreihen in vitro. Dabei wurden 20 der 24 von ihnen getesteten Glioblastomzellreihen von Reovirus zerstört.

Auch in vivo hatte Reovirus eine gute onkolytische Wirkung. Die Arbeitsgruppe von Wilcox [98] z. B. untersuchte die onkolytische Wirkung von Reovirus auch im Mausversuch. Dafür wurden SCID-Mäusen Zellen der humanen Glioblastomreihen U251N und U87 subkutan oder intrazerebral implantiert und die daraus wachsenden Tumoren wurden mit Reovirus Serotyp III behandelt. In beiden Modellen wurde eine komplette Tumorregression durch Reovirus erreicht. Allerdings wurden die Reoviren von den SCID-Mäusen nicht gut vertragen, sie zeigten schwerwiegende Krankheitssymptome als Reaktionen auf die Reovirusinfektion.

Auch in verschiedenen klinischen Studien wurde Reovirus schon an unterschiedlichen Tumorentitäten auf seine onkolytische Wirksamkeit getestet.

Der bisher am Besten untersuchte Reovirusstamm ist das Reovirus Reolysin vom Serotyp III. Dieses Virus wurde in der Regel gut vertragen und gelegentlich konnte eine virale Replikation und Apoptose in befallenen Tumorzellen nachgewiesen werden [74].

Reolysin wurde zum Beispiel Patienten mit soliden Hauttumoren intraläsional appliziert. Bei dieser Studie traten keine Dosis-limitierenden Nebenwirkungen auf, es wurden Dosen von bis zu 10^{10} PFU/Injektion verabreicht. Bei 11% der Patienten sprachen die Tumoren auf die Therapie an, bei weiteren 45% der Patienten stabilisierte sich die Tumorerkrankung [1].

In einer anderen Studie wurde Reovirus mit einer Radiotherapie kombiniert, diese Therapie wurde bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen eingesetzt, das Virus wurde dabei intraläsional gegeben [37].

Peter Forsyth et al. untersuchten im Rahmen einer Phase I Studie die Verträglichkeit von Reovirus an zwölf Patienten mit rezidivierenden malignen Glioblastomen. Sie verabreichten mehrmals das lebende, replikationskompetente Virus intratumoral über Stereotaxis. Das Virus wurde gut vertragen, es trat keine Dosis-limitierende Toxizität auf und es zeigten sich keine Nebenwirkungen, die auf das Virus direkt zurückzuführen waren [27].

2.11 Die Bedeutung der onkolytischen Wirkung von NDV in der aktuellen Forschung

Mit NDV als onkolytisches Virus wurde bisher weniger geforscht, als mit Reovirus. Dennoch gibt es zahlreiche Studien, die die onkolytische Potenz dieses Virus sowohl in vitro als auch in vivo bei verschiedenen Tumoren bestätigten.

Die Arbeitsgruppe um M.M. Zulkifli [106] erforschte die onkolytische Wirkung des avirulenten NDV-Stamms V4UPM sowohl in vitro als auch in vivo im Mausversuch. Die

Ergebnisse dieses Versuchs waren sehr positiv, die Wirkung des Virus in vitro war auf beide getesteten Glioblastomzelllinien, U-87MG und DBTRG.05MG, sehr gut.

Im Mausversuch wurde bei subkutanen Tumoren der Zelllinie U-87MG nach einmaliger Virusinjektion eine komplette Tumorregression innerhalb von zehn Tagen erreicht, die über die ganze Versuchsdauer von sechs Monaten anhielt.

Allerdings wurde durch die Therapie mit NDV der Tumore der Zelllinie DBTRG.05MG keine Tumorregression erreicht, wohl aber ein langsames Tumorwachstum als in der Kontrollgruppe.

NDV wurde im letzten Jahrzehnt auch in mehreren klinischen Studien untersucht.

Zum Beispiel wurden Patienten mit Gliomen hohen Grades mit dem NDV-Stamm MTH-68, der intravenös appliziert wurde, therapiert. Die Patienten überlebten teilweise fünf bis neun Jahre, wobei schwer zu beurteilen ist, inwieweit dies durch die Wirkung von NDV verursacht war, weil uneinheitliche Dosierungen verabreicht wurden und die Patienten teilweise gleichzeitig anderen Behandlungen (Chirurgie, Chemotherapie) unterzogen wurden. Jedoch bekamen die Patienten bis zu sieben mal pro Woche über fünf bis sieben Jahre hinweg Injektionen mit MTH-68, wobei von NDV über den ganzen Zeitraum hinweg scheinbar keine Toxizität ausging. NDV scheint sehr nebenwirkungsarm zu sein [16].

Der Stamm NDV-HUJ wurde im Rahmen einer Phase I/II-Studie an Patienten mit rezidiviertem Glioblastoma multiforme getestet. Der eingesetzte NDV-Stamm ist nicht in der Lage, infektiöse Nachkommen zu produzieren. In dieser Studie wurden 14 Glioblastom-Patienten intravenös verschiedene Dosen vom NDV-HUJ-Stamm gegeben. Die einzige festgestellte Nebenwirkung war leichtes Fieber.

Radiologisch und klinisch wurde bei einem Patienten ein über drei Monate anhaltender Rückgang des Tumors festgestellt. Weil das Virus sich nicht vermehren kann, ist es sehr unwahrscheinlich, dass es sich über die Zellen, die direkt nach der Virusinjektion infiziert wurden, hinweg ausgebreitet hat. Deswegen wird vermutet, dass zusätzlich zu den direkten zytotoxischen Effekten auch noch zytokinvermittelte Effekte, sowie Reaktionen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems eine Rolle bei dieser Tumorregression gespielt haben [28]. Eine dauerhafte Tumorregression wurde allerdings leider nicht erreicht.

PV701 ist ein NDV-Virusstamm, der in Säugetierzellen in der Lage ist, infektiöse Nachkommen zu produzieren. Er wurde im Rahmen von drei Phase I-Studien an insgesamt 113 Patienten mit therapierefraktären soliden Tumoren untersucht, wobei die Dosierung und

der Therapieplan zur intravenösen Gabe des Virus optimiert werden sollte und auch die Sicherheit beachtet wurde.

Dabei wurden vor allem im Rahmen der ersten Virusgabe Nebenwirkungen in Form grippe-ähnlicher Symptome festgestellt. Einige Tage nach der intravenösen Gabe der Viren wurden im Tumor entzündliche Reaktionen und Hinweise auf eine aktive Virusreplikation im Tumor beobachtet.

In einer neueren Studie mit PV701 an 19 Patienten kam es in vier Patienten zu Tumorregressionen, die mehr als 50% betrug, weitere fünf Patienten zeigten eine Stabilisierung der Krankheit für vier Monate oder länger [55].

In einer anderen Studien mit PV701 wurde das Virus Patienten mit soliden, therapierefraktären Tumoren gegeben. Die maximal tolerierte Dosis betrug dabei $1,2 \times 10^{10}$ PFU/m², Nebenwirkungen waren Dyspnoe, Diarrhoe und Dehydratation. Durch Desensitisation, also die vorherige Gabe einer niederen Dosis wurde eine Dosis von $1,2 \times 10^{11}$ PFU/m² vertragen. Es wird vermutet, dass durch die Desensitisation die Akute-Phase-Reaktion schwächer verläuft und dass deswegen weniger Zytokine ausgeschüttet werden. Ca. 15% der Patienten sprachen auf die Therapie an, die Tumorprogression reichte von vier bis 30 Monaten [66].

73-T ist ein NDV-Stamm, der in klinischen Studien als virales Onkolysat, also als Suspension aus Virus und Tumorzellen, die wie eine Anti-Tumor-Impfung wirken soll, getestet wurde. Bei einer Studie von Cassel und Murray und Kollegen wurden 83 Patienten mit malignen Melanomen (AJCC Stadium III), nach einer vorherigen chirurgischen Behandlung, virale Onkolysate von NDV verabreicht. Diese Onkolysate, die aus autologen oder allogenen Melanom-Zellen, die mit NDV infiziert wurden, bestanden, wurden in wöchentlichen bis dreimonatigen Intervallen appliziert. Über 60 % der Patienten waren zehn Jahre später noch am Leben und frei von feststellbaren Rezidiven. In dieser Zeit wurden unzählige Dosen von NDV-Onkolysaten mit kleinen Mengen aktiver NDV ohne irgendeine nachteilige Reaktion verabreicht. Auch 15 Jahre später lebten noch 55% dieser Patienten [4].

Das NDV OV001 wurde sechs Glioblastompatienten intravenös in einer Dosis von 10^{10} IU/Injektion appliziert, wobei keine dosislimitierenden Nebenwirkungen auftraten. Bei einem Patienten sprach der Tumor bis zu 30 Wochen nach der ersten Infusion fast vollständig auf die Therapie an, bei einem zweiten Patienten stabilisierte sich die Erkrankung für 26 Wochen [1]. Eine langfristige Heilung wurde leider nicht erreicht.

2.12 Probleme und Einschränkungen in der Therapie mit onkolytischen Viren

Viele onkolytische Viren breiten sich in Modellen aus einschichtigen Tumorzellkulturen sehr schnell über den Zellrasen aus. In einer soliden Tumormasse kann die virale Ausbreitung hingegen stark erschwert werden.

Um gut wirken zu können, müssen sich die Viren schneller ausbreiten als die Tumorzellen. In mathematischen Modellen wurde ausgerechnet, dass die Viren dazu diffus über den Tumor verbreitet sein sollten, und nicht nur in den Kern oder in die Peripherie des Tumors gegeben werden sollten [104].

Ein anderes mathematisches Modell besagt, dass onkolytische Viren Tumoren abhängig von den Virus- und den Tumoreigenschaften unterschiedlich gut zerstören. Da die meisten Tumoren nicht aus einer homogenen Tumorzellpopulation bestehen ist es von Vorteil, wenn vom eingesetzten onkolytischen Virus eine heterogene Viruspopulation verwendet wird [46]. Die Viren müssen, bevor sie Tumoren infiltrieren können, zusätzlich zu chemischen und biologischen Hemmstoffen (z. B. antivirale Peptide, Antikörper, hemmende Medikamente) auch physikalische Grenzen überwinden. Dazu zählen Zell-Zell-Kontakte, Basalmembranen, Fibrosen, Nekrosen und dem Tumor untergemischte normale Zellen, die bis zur Hälfte des Tumors ausmachen können [96].

Die Virusausbreitung ist auch vom Virus selbst abhängig. Adenoviren verbreiten sich z. B. langsam, sie bleiben primär intrazellulär und scheinen sich über Apoptosekörperchen auszubreiten, ihr Replikationszyklus dauert 48-72 Stunden.

Manche Viren hingegen werden aktiv aus den befallenen Zellen herausgepumpt (z. B. Vaccinia), andere töten die befallene Zelle relativ schnell ab (HSV, Vaccinia) [84]. Vor allem Viren, die auch extrazelluläre Formen aufweisen haben große Vorteile bei der Verbreitung im Tumor [96].

Was die Wirksamkeit der Viren auch hemmen kann, ist die insuffiziente Expression viraler Zielrezeptoren[21]. (z. B. der CAR-Rezeptor fürs Adenovirus scheint erstens stark zwischen normalen Zellen und Tumorzellen zu variieren, und zweitens auch innerhalb verschiedenen Tumorstadien zu variieren [69])

Eine zweite Hürde ist das Immunsystem, das, wie weiter oben schon diskutiert, zwar hemmend auf die Virusausbreitung wirken kann, möglicherweise aber auch die Effektivität der Viren durch die Ausbildung einer Anti-Tumor-Immunität erhöhen kann.

Der Weg der Virusgabe ist ein entscheidender Faktor der Therapie. Bei vielen Viren scheinen Antikörper die Ausbreitung der Viren nicht zu hemmen, wenn diese direkt in den Tumor

gegeben werden. Bei Viren, die sich durch Zell-zu-Zell-Kontakte ausbreiten, kann der Kontakt der Viren mit Antikörpern sogar ganz vermieden werden (z. B. Masern) [96].

Bei intravenöser Gabe der Viren kann die Therapie trotz hoher Antikörpertiter z. B. dann wirkungsvoll sein, wenn die Viren lokal gegeben werden (z. B. durch Perfusion der A. hepatica communis bei kolorektalen Lebermetastasen [71])

In Fällen, in denen Antikörper die Virustherapie tatsächlich verhindern, könnten Medikamente gegeben werden, die die Antikörperbildung reduzieren, wie z. B. Anti-CD20-AK (Rituximab), die die B-Zellen hemmen, oder Plasmapherese, um Antikörper zu eliminieren [96].

Die Viren können auch durch die Aufnahme ins retikuloendotheliale System und durch komplementvermittelte Effekte, die je nach Virusspezies anders ausfallen, schnell aus dem Blutstrom eliminiert werden.

Auch bei intravenöser Gabe des Virus und bei immuninkompetenten Mäusen konnten trotzdem viele Viren Fernmetastasen nicht effizient bekämpfen, sodass Viren eventuell nur lokal wirksam gegeben werden können [96].

Allerdings scheinen manche Pockenviren, z. B. Vaccinia, auch Metastasen bekämpfen zu können, die Mechanismen, die hinter dieser systemischen Wirksamkeit stehen, sind noch relativ unbekannt [30].

Auch ist die antitumorale Wirksamkeit vieler onkolytischer Viren nicht ausreichend, um Tumoren wirklich zu eliminieren, sodass die Viren gentechnisch manipuliert werden müssen oder nur zusätzlich zur Bestrahlungs- oder Chemotherapie gegeben werden können.

Die Toxizität onkolytischer Viren ist ein wichtiges Kriterium für ihre Anwendbarkeit in der Klinik. Diese ist abhängig vom ursprünglichen Virus und von spezifischen genetischen Veränderungen, die am Virus vorgenommen wurden, so wie vom Applikationsweg des Virus und der Dosis [96].

2.13 Aspekte der Sicherheit bei der Therapie mit onkolytischen Viren

Für das Risikomanagement bei der Behandlung mit onkolytischen Viren sollte nicht nur der behandelte Patient selbst beachtet werden, sondern auch seine Kontaktpersonen und die Allgemeinbevölkerung.

Bei Krebspatienten im Endstadium, mit therapierefraktärer Erkrankung, werden sehr toxische Behandlungsmethoden (z. B. allogene Knochenmarkstransplantation) angewandt, da diese zu Langzeitremissionen führen können.

Viren könnten wesentlich weniger toxisch sein, als die herkömmlichen Krebstherapien (z. B. Chemotherapie), wobei zuerst die Kombination der Viren mit Chemotherapie oder Bestrahlung versucht werden wird, bevor man die Viren allein als Therapie testen wird. Zuerst ist es allerdings notwendig, die Toxizität der Viren anhand relevanter Tiermodelle zu testen. Auch muss die Sicherheit gewährleistet werden, diese ist z. B. davon abhängig, ob das Virus sein Genom ins Wirtszellgenom inseriert, ob das Virus selektiv nur in bestimmten Geweben replizieren kann, oder unselektiv verschiedene Gewebe infiziert, ob das Virus leicht mutiert und dann eventuell auch nicht-maligne Gewebe befallen kann oder toxischer wird. Es ist wichtig, dass wirkungsvolle antivirale Mittel zur Verfügung stehen, um eine Verbreitung der Viren im Notfall zu vermeiden.

Außerdem sollte sich ein Wildtyp-Virus zuerst in Patienten als sicher erwiesen haben, bevor man das Virus in gentechnisch veränderter Form verwendet. Auch muss bei Viren mit toxischen Transgenen getestet werden, wie diese sich in normalen Geweben verhalten (z. B. mit Zytokinen als Genprodukte, die zu lokaler oder systemischer Toxizität führen können). Es muss beachtet werden, dass sich ein gentechnisch verändertes Virus mit einem Wildtypvirus rekombinieren könnte, es wäre dann herauszufinden, wie sich dieses verhält. Es sollten auch infektiologische Transmissionsstudien durchgeführt werden, um herauszufinden, wie sich die horizontale und vertikale Übertragung der Viren verhält. Wichtig ist, die Ausbreitung der Viren in der Bevölkerung primär dadurch zu verhindern, dass die behandelten Patienten isoliert werden.

Es sollten außerdem aus den vielen onkolytischen Viren, die bekannt sind, jene herausgefunden werden, die die beste Wirkung und das beste Sicherheitsprofil haben. Dazu sollten die Viren im Versuch direkt miteinander verglichen werden [96].

Der Sicherheitsaspekt ist gerade bei natürlichen onkolytischen Viren, wie Reovirus und NDV, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gut, da sie über viele Jahre hinweg keine schweren Infektionen beim Menschen auslösten.

2.14 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist, die onkolytische Wirksamkeit von Reovirus und Newcastle-Disease-Virus in Kombination zur Therapie des Glioblastoms zu erforschen.

Dazu sollen am Mausmodell folgende Fragen geklärt werden:

1. Sind die Viren einzeln in der Lage, die Tumorzellen zu befallen?
2. Breiten sich die Viren über den Tumor aus und sind in allen Tumorzellen nachweisbar?
3. Zeigt der Befall der Tumorzellen mit einem der Viren einen onkolytischen Effekt?

4. Sind die Viren in der Lage, gleichzeitig eine Tumorzelle zu befallen und bleibt dabei ihr onkolytisches Potential erhalten, oder wird eventuell noch verstärkt?
5. Hat die Infektion mit beiden Viren in Kombination einen größeren onkolytischen Effekt als die Infektion mit den einzelnen Viren?
6. Dringen die Viren auch in andere Organe (Herz, Leber, Milz, Lungen, Gehirn oder Blut) ein und rufen dort Veränderungen hervor oder schädigen sie?
7. Lösen die Viren in den Mäusen Infektionen aus?
8. Bilden sich Antikörper gegen die Viren, trotz intratumoraler Injektion?

Kapitel 3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien/Materialien

Agarose	Gibco BRL
BSA (Rinderalbuminlösung)	New England Biolabs
β -Mercaptoethanol	Roth
CASYTon TM -Lösung	Schärfe System GmbH
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl- formazan (MTT)	Sigma
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
FACS-Puffer	Becton Dickinson GmbH
Isopropanol	Roth
Paraformaldehyd	Roth
PBS	PAA Laboratories GmbH
Phenolrot	AppliChem GmbH
Polyfreeze (Einfriermedium)	Polysciences
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Saccharose	Roth
Triton X-100	Serva
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Invitrogen

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien, werden entweder bei den einzelnen Unterpunkten aufgelistet oder wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in Reinstform bezogen.

3.1.2. Zellmethoden

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
FCS (fötale Kälberserum)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin (10 000 U / ml)	Gibco BRL, Invitrogen

U373-Zellen: etablierte Zelllinie, die aus einem humanen Glioblastom stammt [17]. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (LGC Standart GmbH) bezogen.

Verzellen: etablierte Zelllinie, die aus Nierenzellen Grüner Meerkatzen stammt. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (LGC Standart GmbH) bezogen.

3.1.3 Virale Methoden

Embryonierte SPF-Eier	Lohmann Tierzucht GmbH
-----------------------	------------------------

Newcastle-Disease-Viren des Stammes Hitcher B1 wurden aus dem Tierseuchenzentrum in Riems bezogen. Hierbei handelte es sich um direkte Isolate aus befallenen Tieren, die mit entsprechenden Methoden vermehrt und anschließend bei -70 °C eingefroren wurden.

Stamm Hitchner B1 ist ein Wildtypisolat aus dem Huhn. Es handelt sich hierbei um einen lentogenen NDV-Stamm.

Reovirus Typ III, Stamm Dearing: Das Virus stammt ursprünglich aus der Fäzes eines Kindes. Das Virus wurde von LGC Standart GmbH bezogen.

3.1.4 Tierversuche

Bepanthen Augensalbe	Bayer
Einstreu	Altromin Spezialfutter GmbH
Heparin	RatioPharm
Käfige: Macrolonkäfig Typ III	Tecniplast GmbH
Ketamin (Ursotamin)	Serumwerk Bernburg
NMRI-Mäuse, Weibchen, 4 Wochen alt	Charles River Deutschland
Pelletiertes Standardfutter	Altromin Spezialfutter GmbH
Pentobarbital-Natrium (Narcoren®)	Merial GmbH
Xylazine Hydrochlorid (Rompun®)	Bayer

3.1.5 Polymerasekettenreaktion

DNase	Gibco BRL, Invitrogen
dNTP's	Sigma
Oligonukleotide	MWG-Biotech
PCR-Puffer	Roche
pGEMTM-T Vektor	Promega
Primer-Synthase	MWG-Biotech
Proteinase K	Böhringer Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Reverse-Transkriptase Mastermix: Nach Angaben des Herstellers:	
Reverse Transkriptase	Promega
Reverse Transkription-Puffer	Promega
Zufallsoligomere (Random Hexamers)	Promega
RNase-Inhibitoren (RNasin® Ribonuclease Inhibitor)	Promega
RNase	Sigma
taq-DNA-Polymerase	Roche
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
ViralXpress-Kit	Chemicon International

3.1.6. Durchflusszytometrie

Anti-NDV-Ak Rabbit	Invitrogen
Anti-Reo-Virus-FITC-Ak	VMRD
Kollagenase	AppliChem
TRITC-Anti-Rabbit-Ak	Invitrogen

3.1.7. Gewebskryoschnitte

Anti-NDV-Ak Rabbit	Invitrogen
Anti-Reo-Virus-FITC-Ak	VMRD
Deckgläschen	Langenbrinck
Einbettmedium Tissue-Tek®	Sakura Finetek Germany GmbH
Objektträger, Teflon beschichtet	Roth
PE-Anti-Rabbit-Ak	Invitrogen

3.1.8 Antikörpernachweis im Serum

Anti-Maus-FITC-Ak

Invitrogen

FA-Puffer, 4 x konzentriert: Na₂CO₂ 11,4 g, NaHCO₃ 33,6 g, NaCl 8,5 g ad 1 l H₂O, pH 9-9,5

Glycerol-FA-Puffer: FA-Puffer (1x konzentriert)/Glycerol im Verhältnis 1:1

3.1.9 Geräte

Brutschränke

Binder GmbH,

CO₂-Inkubator der Reihe CB

CASY-Zellzähler

Schärfe System GmbH

druckluftgefederter Tisch Micro-g 63-560

Technical Manufacturing Filter

(DAF-FM); 505 nm Langpass

VisiTech International

ICCD-Kamera XR-MEGA-10

VisiTech International

Konfokale Einheit QLC 100

VisiTech International

Kryostat

Leica, Typ CM 1850

LightCycler

Roche

Tischzentrifuge

Eppendorf, Typ5804

Ultrazentrifuge

Beckmann, Type SW 28;

ca. 100 000 x g

Umkehrmikroskop Nikon Eclipse TE 2000U

Nikon GmbH

Corporation

3.1.10 Diverses

Digitale Schublehre

MMO

Einwegpipetten (Costar STRIPETTE®)

Corning

Eppendorfgefäße

Eppendorf

FACS-Röhrchen

Greiner

Kapillaren

Kabe Labortechnik GmbH

Kryo Einbettformen

Sakura Finetek Germany GmbH

Nylonzellsieb

Becton Dickinson GmbH, 70µm

Spritzen

B. Braun

Zellhomogenisator (Douncer)

B. Braun

Zellkulturschalen

Greiner / Nunc

Zellschaber Costar®

Corning

3.1.11 Computersoftware

Für die Textverarbeitung wurde Microsoft Word 2003 verwendet. Zur Erstellung von Tabellen und einfachen Graphiken wurden Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint verwendet.

3.2 Zellmethoden

3.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Zur Kultivierung wurden alle verwendeten Zellen in einem Brutschrank bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C Temperatur gezüchtet.

Das Nährmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert. Als Nährmedium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), das mit 10 % fetalem Kälber-Serum (FCS) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin versehen wurde.

Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet.

Gezüchtet wurden Glioblastomzellen der Zellreihe U373 und U87 und Verozellen. Bei allen handelte es sich um adhärenente Zellen.

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken mit vertikalem Luftstrom durchgeführt.

Zur Beurteilung der Zellen und ihres Wachstums wurde ein Lichtmikroskop verwendet.

3.2.2 Vermehrung der Zellen

Um die Zellen zu vermehren wurden konfluierende Zellen gesplittet und auf mehrere Kulturschalen aufgeteilt. Dazu wurden sie bei einer Konfluenz von 90-100 % mit 10 ml PBS gewaschen und daraufhin mit 3 ml 0,25 %iger Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Mit der Trypsin-Lösung wurden die Zellen ca. 5 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Nährmedium inhibiert. Die Zellen wurden auf 5 bis 10 Kulturflaschen aufgeteilt und mit frischem Nährmedium versehen.

3.2.3 Kryokonservierung der Zellen

Zum Konservieren der Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von 80 % mit 0,25 %iger Trypsinlösung von der Kulturschale abgelöst. Danach wurden sie mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen bei 900 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert und anschließend in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt. Nun wurden die Zellen pelletiert und in 1,5 ml Einfriermedium (60 % DMEM, 30 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Um die Zellen schonend einzufrieren wurden sie langsam heruntergekühlt, zunächst für 30 min bei 4 °C,

anschließend für 2 h bei -20°C und dann für 24 h bei -80°C. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryokonservierungsröhrchen mit den entsprechenden Zellen in 37°C warmem Wasser inkubiert. Dann wurden sie in Kulturflaschen ausplattiert und mit Nährmedium (DMEM) versehen.

3.2.5 Aufbereitung der Zellen für die Injektion in die Mäuse

Um in den Mäusen Glioblastome anzüchten zu können, wurden zunächst humane Glioblastomzellen herangezüchtet. Die Zellen wurden dann aufbereitet und den Mäusen subkutan injiziert.

Für die Tumore der Mäuse wurde die humane Glioblastomzellreihe U373 verwendet. Gezüchtet wurden die Zellen wie oben beschrieben.

Zur Aufbereitung für die Injektion in Mäuse wurden die Zellen durch Zugabe von 0,25 %-Trypsinlösung von der Kulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde nach Ablösung der Zellen mit FCS-haltigem Nährmedium inhibiert. Die Zellen wurden dann 3x mit PBS gewaschen. Die genaue Zellzahl wurde mit dem CASY-Zellzähler bestimmt. Zur Injektion wurden die Zellen in PBS in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro ml resuspendiert.

Die Lösung wurde eiskühlt transportiert und zur Injektion in die Maus auf Spritzen aufgezogen.

Die Tumorzellen wurden subkutan in die linke Flanke der Maus gespritzt. Pro Maus wurden 10^6 Zellen, also 100 µl der Tumorzellsuspension injiziert.

Zur Kontrolle wurden einige dieser Zellen nochmals kultiviert.

3.2.6 Bestimmung der Zellmenge

Um die genaue Zellmenge zu bestimmen, wurden die Zellen mit einem CASY TM-Counter gezählt. Dazu wurden 10 µl der in 10 ml PBS gelösten Zellen entnommen und in 10 ml CASY TonTM-Lösung gelöst (Verdünnung 1: 10^3). Dann wurde durch den CASY-Counter bestimmt, wie viele Zellen in den 10 µl der Zellsuspension waren. Daraus wurde die Gesamtmenge der in der Lösung befindlichen Zellen errechnet. Der CASY-Counter bestimmt auch die Zellgröße, sodass Zelltrümmer und tote Zellen von der Zellzählung ausgeschlossen werden konnten.

3.3 Virale Methoden

3.3.1 Reovirus - Produktion und -Aufreinigung

Für die Produktion der Reoviren wurden Verozellen in 75cm² Kulturschalen gezüchtet, bis sie eine Konfluenz von 90 % erreichten. Anschließend folgte die Infektion der Zellen mit Reovirus in einer Konzentration MOI = 0,5 Pfu/Zelle.

12 Stunden nach der Infektion mit Reovirus wurde das Medium gewechselt. Beim Auftreten einer sichtbaren Zytolyse, in der Regel nach 4 bis 5 Tagen, wurden die Zellen von der Kulturflasche abgeschabt und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml VTE Puffer/75 cm²-Kulturflasche aufgenommen und auf Eis mittels eines Glas-Dounser mechanisch aufgebrochen. Um die Viren besser von den Cytoplasmamembranen zu trennen, wurde der VTE Puffer vor Zugabe zum Zellpellet mit Triton X-100 auf eine Konzentration von 1 % eingestellt.

Zur Aufreinigung wurde das virushaltige Lysat für 4 h bei 28 000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) und 4°C in autoklavierten Polyallomer-Opti-Seal-Röhrchen abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in PBS gelöst und die Virussuspension von 6 Röhrchen auf insgesamt 10 ml eingestellt. Anschließend wurde das Reovirus über einem 30 %-igen Saccharose-Gradienten für 12 h bei 4°C abzentrifugiert. Dann wurde das Virus in PBS aufgelöst. Die Viruskonzentration wurde mittels Plaque-assay ermittelt.

3.3.2 NDV – Produktion und -Aufreinigung

NDV wurde in befruchteten Eiern vermehrt. Verwendet wurden dafür unbeimpfte SPF-Eier mit einem Gewicht von 60-70 g. Diese wurden 11 Tage lang bei 37°C und 60 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator bebrütet. Dann wurden die Eier mit je 100 µl einer eingestellten Virussuspension (EID₅₀ = 10⁷/ml) beimpft. Dazu wurde das Virus in die Allantoishöhle des Kükenembryos gespritzt. Die Eier wurden für weitere 3 Tage unter täglicher Kontrolle bebrütet. Die Kontrolle bestand in einer Durchleuchtung der Eier mit einer Lampe. Hierbei wurden abgestorbene Embryos erkannt und entfernt.

War der Embryo schon 24 h nach Infektion abgestorben, wurde das Ei als Impfschaden verworfen. Starben die Embryonen nach 48h bis 72 h, wurden die jeweiligen Eier zur späteren Virusernte bei 4°C aufbewahrt. Waren sie nach 72 h noch am Leben, wurden sie durch Lagerung bei 4°C über Nacht abgetötet. Nach Entfernung der Eierschale unter der Sterilbank im Bereich der Luftkammer konnte die virushaltige Amnionflüssigkeit durch leichtes Einstechen der Chorio-Allantois-Membran entnommen werden. Nur klare Amnionflüssigkeit wurde weiterverwertet. In Abhängigkeit der Größe der Eier konnten pro Ei zwischen 7-14 ml

Amnionflüssigkeit gewonnen werden. Die Amnionflüssigkeit wurde zur weiteren Verwertung vereinigt.

Von der virushaltigen Amnionflüssigkeit wurden je 38,5 ml in autoklaviereten Polyallomer-Opti-Seal-Röhrchen für 1 h bei 28 000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) und 4°C abzentrifugiert. Es entstand ein Pellet das in 5 ml PBS gelöst wurde. 6 der gelösten Pellets wurden jeweils vereinigt, sodass ein Gesamtvolumen von 30 ml entstand. Dann wurde ein diskontinuierlicher Stufengradient aus Saccharoselösung mit der Virussuspension überschichtet und bei 28 000 rpm (Beckmann, Type SW 28; ca. 100 000 x g) abzentrifugiert. Auf 2 Röhrchen verteilt wurden je 10 ml 20 %-ige, 3,5 ml 40 %-ige und 10 ml 60 %-ige Saccharoselösung geschichtet. Die Saccharosegradienten wurden mit 15 ml der aufzureinigenden Virussuspension bedeckt. Um die einzelnen Saccharoseschichten unterscheiden zu können, wurde die 60 %-Phase mit Phenol-Rot (0,01 µg/ml) angefärbt. Nach der Ultrazentrifugation konnte die virushaltige Lösung steril abgenommen werden, indem ein kleines Stück unterhalb der 40 %-Phase eingestochen wurde. Dann wurde die Saccharose durch Zentrifugations-Diafiltration in Vivaspin-15-Röhrchen (Durchgängigkeit: 100 kDa) entfernt.

Die fertigen Viren, die für die Versuche dieser Arbeit verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Muhannad Alkassar bereitgestellt, der die Viruszüchtung durchgeführt hatte.

3.3.3 Plaque-Test zur Konzentrationsbestimmung von Reovirus

Um die Konzentration der aufgereinigten Reoviren zu bestimmen, wurde der Plaque-Test durchgeführt. Dabei werden zuvor ausplattierte Zellen mit den Viren infiziert und vermehren sich darin. Sie lysieren die befallenen Zellen. Die Viren produzieren ihrem Zyklus entsprechend auch infektiöse Nachkommen. Damit diese nur unmittelbar benachbarte Zellen infizieren können, wird der virusinfizierte Zellrasen mit Agarose überschichtet. Im Zellrasen entstehen durch die virusinduzierte Zytolyse Plaques aus toten Zellen. Der Zellrasen wird am Ende des Versuchs mit Neutralrot angefärbt. Es färben sich nur lebendige Zellen an, die Plaques aus toten Zellen bleiben farblos und können ausgezählt werden. Der Lysetiter wird in pfu/ml angegeben.

Zur Plaquebestimmung der Reoviren wurden jeweils 5×10^5 Verozellen/6 cm² Schale für 24 h kultiviert. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der in Nährmedium gelösten Viren infiziert. Die Verdünnungsstufen wurden von 1:10³-1:10⁸ gewählt, wobei je

Verdünnungsstufe 2 Ansätze gemacht wurden. Die infizierten Zellen wurden 12 h mit den Viren inkubiert, dann wurde der Virusüberstand entfernt. Die Zellen wurden nun mit 6 ml einer Mischung aus halbfestem Nährmedium überschichtet. Dafür wurden 3 ml Medium (2x FCS) auf 37°C und 3 ml Medium (ohne FCS) mit 3,4 % Agar auf 65°C erwärmt und vor dem Überschichten miteinander gemischt.

Die Zellen wurden 6 Tage lang bei 37°C inkubiert. Am sechsten Tag wurde die Agar-Schicht mit 3 ml eines Färbemediums überschichtet. Das Färbemedium wurde aus 22,5 ml 2xPBS und 3 ml Neutralrot-Lösung hergestellt, die beide auf 37°C erwärmt wurden. Zusätzlich wurden 22,5 ml 2 %-Agar auf 65°C erhitzt und kurz vor dem Überschichten beigemischt. Die Zellen wurden für 12 h mit dem Färbemedium inkubiert. Zur Auswertung wurde die Agar-Schicht vorsichtig entfernt. Nun konnten die nicht gefärbten Plaques gezählt werden. Die Berechnung des Lysetiters wurde mit folgender Formel bestimmt:

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

3.4 Tierversuche

3.4.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche sowie die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Landsratsamt des Saarpfalzkreises, Homburg/ Saar) und nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes ausgeführt. Die Experimente standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. M. Frings. Für den Tierversuch wurden 16 weibliche, 4 Wochen alte Mäuse der Gattung NMRI verwendet, dabei handelt es sich um immundefiziente Nacktmäuse.

Vor der Virusinjektion wurden die Tiere in den Räumen des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes (Prof. Dr. med. M. D. Menger) gehalten. Jeweils 4 Mäuse waren zusammen in einem Käfig.

Für die Virusinjektion und die weitere Haltung wurden die Tiere in die Räume des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes überführt.

Die Tierhaltung erfolgte auf Einstreu unter 12 h Tag-Nacht-Rhythmus bei konstanter Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 %. Wasser und Standardfutter erhielten die Mäuse ad libitum.

Die Käfige waren mit speziellen Filtern versehen, um die Umgebung der immundefizienten Mäuse möglichst keimarm zu halten.

3.4.2 Subkutane Tumorzellinjektion

Jeder Maus wurden subkutan in die linke Flanke jeweils 10^6 Glioblastomzellen der Zellreihe U373-Zellen injiziert. Diese waren zuvor mit CASY ausgezählt worden und in 100 μ l PBS aufgelöst. Die Mäuse wurden für die Tumorzellinjektion nicht narkotisiert.

3.4.3 Aufteilung der Tiere in die jeweilige Versuchsgruppe

Zum Zeitpunkt der ersten Virusinjektion war noch bei keiner Maus ein Tumor sicht- oder tastbar.

Die Mäuse wurden per Zufall auf 4 Gruppen von jeweils 4 Mäusen aufgeteilt, jede Gruppe bekam einen eigenen Stall, sodass eine Virusinfektion von infizierten Mäusen zu nicht infizierten Mäusen verhindert werden konnte.

Um die Mäuse zu erkennen und so das Wachstum jedes einzelnen Tumors sicher beurteilen zu können, wurden die Mäuse mit Löchern in den Ohren gekennzeichnet. Eine Maus pro Gruppe bekam kein Loch, einer wurde das linke, einer das rechte Ohr und einer Maus wurden beide Ohren gelocht.

Die Mäuse wurden dann anhand ihrer Gruppenzugehörigkeit und ihrer Lochmarkierung durchnummeriert.

Die Käfige jeder Versuchsgruppe wurden gekennzeichnet, sodass die Identifikation jeder Maus gewährleistet war.

3.4.4 Betäubung der Mäuse und Blutentnahme

Vor der ersten Virusinjektion wurde jeder Maus Blut entnommen.

Dazu wurden sie narkotisiert. Die Betäubung wurde aus 0,75 ml Ketamin (Ursotamin) und 0,75 ml Rompun (Xylazine Hydrochlorid) mit 10 ml PBS angesetzt. Jeder Maus wurden davon zur Betäubung 250 μ l intraperitoneal injiziert.

Die Blutentnahme erfolgte retrobulbär. Dazu wurde mit einer Kapillare medial des Bulbus vorsichtig mit rotierenden Bewegungen unters Auge gestochen, bis diese sich mit Blut füllte. Da bei der Narkose die Augen der Mäuse offenblieben wurden sie, um nicht auszutrocknen und um nicht verletzt zu werden mit Bepanthen Augensalbe bedeckt.

Es wurden jeweils 100 μ l Blut abgenommen. Das Blut wurde dann in heparinisierte Eppendorfgefäße (jedes Eppendorfgesäß enthielt 3,5 μ l Heparin) gegeben und dann bei 6000 rpm 10 min lang abzentrifugiert. Das Serum wurde abpipetiert und bei -80°C eingefroren.

3.4.5 Virusinjektion

Die Virusinjektion sowie die nachfolgende Tierhaltung der Mäuse erfolgten im Institut für Virologie des Uniklinikums des Saarlandes.

Die erste Virusinjektion wurde 9 Tage nach der Tumorzellinjektion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war bei keiner der Mäuse ein messbarer Tumor nachweisbar. Die Injektion erfolgte in den ertasteten Tumor.

Bevor das Virus injiziert wurde, wurden jeder Maus ca. 100 µl Blut entnommen.

Die erste Gruppe war die Kontrollgruppe, die Mäuse dieser Gruppe bekamen kein Virus injiziert, ihnen wurden 200 µl PBS intratumoral injiziert.

Die Mäuse der 2. Gruppe bekamen 200 µl Virussuspension, die ca. 10^7 infektiöse Reoviren enthielt, intratumoral injiziert.

Den Mäusen der 3. Gruppe wurden 200 µl Virussuspension mit ca. 10^8 infektiösen ND-Viren intratumoral injiziert.

Die Mäuse der 4. Gruppe bekamen 200 µl einer Mischung von $0,5 \times 10^7$ Reoviren und $0,5 \times 10^8$ NDV intratumoral injiziert.

Die Virusinjektion aller Viren bei allen Mäusen wurde an folgenden Zeitpunkten durchgeführt: 2 Tage, 4 Tage und 9 Tage nach der ersten Virusinjektion. Für die Virusinjektion wurden die Mäuse nicht betäubt.

Am 15. Tag nach der 1. Virusinjektion wurden den zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Mäusen nochmals Viren gespritzt, 2 Tage später, also am 17. Tag nach der 1. Virusinjektion, wurde nochmals eine Virusinjektion durchgeführt, um die Viruskonzentration im Tumor aufrechtzuerhalten.

3.4.6 Bestimmung der Tumorgroße

Die Tumorgroße wurde täglich mit einer Schublehre gemessen. Zum Zeitpunkt der Virusinjektion, also 9 Tage nach der Tumorzellinjektion war noch kein Tumor sichtbar, aber tastbar. Die Tumoren wurden 4 Tage nach der 1. Virusinjektion sichtbar. Ab diesem Tag wurde die Größe jedes Tumors täglich mit einer Schublehre gemessen wobei Höhe, Länge und Breite jeweils in der maximalen Ausdehnung gemessen wurden. Anhand dieser Größen wurde das Tumolvolumen nach der Formel $\text{Tumolvolumen} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times 0,5$ errechnet.

Um das Tumorstadium der verschiedenen Tumoren miteinander vergleichen zu können, wurden die Tumolvolumina jeweils auf das Ausgangsvolumen des Tumors bezogen. Dabei

wurde das Ausgangsvolumen mit 100 % betitelt, die folgenden Volumina wurden dementsprechend umgerechnet nach der Formel:

Prozent des aktuellen Volumens = $\text{aktuelles Volumen} \times 100 / \text{Ausgangsvolumen des Tumors}$

Auf diese Weise konnte verglichen werden, um wie viel Prozent ihres ursprünglichen Volumens die Tumoren jeweils gewachsen waren. Das Tumorausgangsvolumen, auf das sich die Errechnung der relativen Tumorumfangszunahme bezog, war für alle Tumore das Volumen, das am 4. Tag nach der Virusinjektion gemessen wurde.

3.4.7 Vorgehen in Abhängigkeit von der TumorgroÙe und Entwicklung der TumorgroÙe

Um den Zeitpunkt für die Tötung der Tiere zu bestimmen, wurden die Tiere täglich beobachtet. Geachtet wurde auf Symptome, die darauf hindeuteten, dass die Mäuse Schmerzen hatten oder leiden mussten.

Das einzige beobachtete Symptom war eine zunehmende Behinderung beim Laufen infolge der TumorgroÙe.

15 Tage nach der 1. Virusinjektion wurden 7 Mäuse getötet da ihre Tumore so groß geworden waren, dass ein Weiterleben der Mäuse aus Gründen des Tierschutzes nicht mehr vertretbar gewesen wäre, da diese Tiere sichtbar hinkten und aufgrund der Größe des Tumors Schwierigkeiten hatten, das Futter zu erreichen. Die Mäuse die hinkten waren gleichzeitig auch die Mäuse mit den größten Tumoren.

Allgemeinsymptome, wie sie bei Tumorerkrankungen oft auftreten, wurden nicht beobachtet. Die Mäuse zeigten über die ganze Versuchsdauer hinweg ein normales Essverhalten und ihr Bewegungstrieb blieb erhalten.

Alle Mäuse wurden getötet, keine Maus verstarb aufgrund der Tumorerkrankung oder wegen der Virusinfektion.

Der Versuch wurde am 20. Tag nach der 1. Virusinjektion beendet, da die Tumoren bei einigen der Tiere zu groß geworden waren und die Tiere hinkten. Vor allem die Tumoren der Kontrolltiere und der Mäuse, die mit Reovirus behandelt worden waren so groß, dass ein Weiterführen des Versuchs nicht mit dem Tierschutz vereinbar gewesen wäre.



Abb. 2: makroskopisches Erscheinungsbild des Tumors bei Sektion

Bei der Sektion der Tiere wurden bei keiner der Mäuse makroskopisch sichtbare Tumormetastasen gefunden.

Die Tumoren waren teils infiltrativ in die Flankenmuskulatur eingewachsen, teils wuchsen sie nur verdrängend.

Ein Unterschied im makroskopischen Aussehen der Tumoren, die mit den Viren behandelt wurden und der Tumoren, die zur Kontrolle nicht behandelt worden waren, wurde nicht festgestellt.

3.4.8 Tötung der Tiere und Organentnahme

Vor der Tötung der Tiere wurde eine 3. Blutentnahme durchgeführt.

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Einschlafen durch intraperitoneale Injektion von 150 μ l Narcoren (Pentobarbital-Natrium).

Die toten Mäuse wurden dann seziiert, ihnen wurden folgende Organe entnommen: Tumor, Leber, Milz, Lunge, Herz und Gehirn. Die Organe wurden in einem Gefäß in PBS gesammelt und dann auf jeweils 3 Gefäße aufgeteilt.

Ein Teil wurde in Kryogefriergitter auf Alufolie in Gewebeeinbettmedium gegeben und wurde dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Aus diesen Organteilen wurden später Kryoschnitte angefertigt.

Der zweite Teil wurde in Eppendorfgefäße gegeben und bei -80°C eingefroren, dieser Teil der Organe wurde später für die RT-PCR verwendet.

Der dritte Teil, der für die FACS-Analysen vorgesehen war, wurde sofort weiterverarbeitet.

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von Erbmateriale

3.5.1 Prinzip der PCR

In dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um nachzuweisen, ob in den Geweben, die den Mäusen nach dem Tod entnommen wurden (Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Milz, Muskel und Tumor) Erbinformation der Virus nachweisbar war und um die Viruslast zu quantifizieren. Dazu wurde das Gewebe aufbereitet und Virus-RNA wurde aus den Zellen isoliert. Dann wurde die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Mit der PCR kann man beliebige DNA-Sequenzen vervielfachen. Zuerst wird die zu amplifizierende DNA aus Zellen extrahiert. Dann wird die DNA auf 94°C erwärmt, um die Doppelstränge voneinander zu trennen.

Spezifische Oligonukleotide (Primer) werden hinzugefügt. Sie binden nur an bestimmte Stellen der zu amplifizierenden DNA und markieren den Teil der DNA, der amplifiziert werden soll. Die Bindung der Primer an die DNA vollzieht sich bei 5°C. Die Vervielfältigung der DNA-Sequenz wird durch hitzeresistente DNA-Polymerasen katalysiert. Diese Enzyme arbeiten bei 74°C. Die neu synthetisierte, nun wieder doppelsträngige DNA kann durch erneutes Erwärmen auf 94°C wieder getrennt werden und der Zyklus kann von neuem beginnen. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, die Vervielfältigung der DNA ist dabei exponentiell.

3.5.2 Aufbau des LightCycler-Geräts

Die RT-PCR (real time PCR) wurde im LightCycler durchgeführt. Der LightCycler besteht aus einem Thermocycler [100] [101] und einer optischen Einheit. Der Thermocycler dient der Temperaturregulation während der einzelnen Schritte der PCR. Um sehr schnelle Temperaturänderungen der Proben zu ermöglichen, werden die Proben beim Lightcycler durch Raumluft erhitzt. Die Luft wird im Gerät über eine Heizspirale erwärmt. Da Luft eine geringe Wärmekapazität hat, können damit sehr schnelle Temperaturänderungen von 20°C/Sekunde mit einer Genauigkeit von 0,3°C erreicht werden. In herkömmlichen PCR-Geräten, bei denen die Proben durch Heizblöcke erwärmt werden, sind so schnelle Temperaturänderungen nicht möglich.

Die zu amplifizierenden DNA-Proben werden in eine Probenkarussell mit 32 Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Volumen von 20 µl gegeben. Die Kapillaren sorgen für eine große Oberfläche, so dass das schnelle Aufheizen und Abkühlen noch erleichtert werden und die

Zyklendauer sehr kurz gehalten werden kann. Eine komplette PCR kann in weniger als einer Stunde durchgeführt werden.

Eine optische Einheit misst mit Hilfe von Photodioden die Fluoreszenz in den Kapillaren, anhand derer dann die Amplifikation gemessen werden kann. Mit der RT-PCR wird die Amplifikation in Echtzeit am Monitor dargestellt. Pro Kapillare liegt die Messzeit bei ca. 20 ms.

Die LightCycler Software (Version 3.5) wertet die Daten aus.

3.5.3 Prinzip der Real-Time-PCR

Die Amplifikation der Ziel-DNA wird durch Hybridisierungssonden sichtbar gemacht.

Die Sonden bestehen aus einem für die Ziel-DNA sequenzspezifischen Oligonukleotid und einem gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff.

2 Sonden wurden eingesetzt. Die 1. Sonde war an ihrem 3`-Ende mit Fluorescein gekoppelt, die 2. Sonde war am 5`-Ende mit dem Farbstoff LightCycler Red 640 gekoppelt. Die Sequenzen der Sonden wurde so gewählt, dass sie in einem möglichst kleinen Abstand von 1-5 Nukleotide zueinander auf der Ziel-DNA hybridisieren. Die Sonden hybridisieren mit der Ziel-DNA nur während der Annealing-Phase, also der Phase, in der die DNA einzelsträngig vorliegt. Haben die Sonden in kleinem Abstand zueinander an die Ziel-DNA gebunden, kann dies mit folgendem Vorgang nachgewiesen werden: Das Fluorescein wird durch blaues Licht der Wellenlänge 470 nm durch das Gerät angeregt und strahlt wiederum grünes Licht der Wellenlänge 530 nm ab. Das vom Fluorescein abgestrahlte, grüne Licht regt den Farbstoff LC Red 640 an. Dieser Farbstoff emittiert Licht der Wellenlänge 640 nm. Der Lightcycler misst im Kanal F3 das von LC Red 640 emittierte Licht der Wellenlänge 640 nm.

Diese Messung findet am Ende jeder Annealing-Phase statt, so dass nach jedem Hybridisierungsvorgang erneut die Konzentration gemessen wird. Das Verfahren funktioniert nur, wenn beide Sonden in sehr kleinem Abstand zueinander hybridisieren, da LC Red 640 nur dann durch das von Fluorescein emittierte Licht angeregt werden kann. Das Verfahren wird als Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet.

Die Fluoreszenzstärke wird über das Verhältnis des Messkanals F3, in dem das Signal mit steigendem PCR Produkt ansteigt, zum Kanal F1, dessen Signal mit steigendem Produkt abfällt, dargestellt [20] [102].

Folgende Primer wurden eingesetzt:

Reo-L1: 5'-GAATGCAGAACATGATTCAGCAT-3' 5'-TAGCAGTATGCTCAGTAGAGGTGG-3'

NDV-F: 5'CCTTGGTGACTCTATCCGTAGG-3' 5'-CTGCCACTGCTAGTTGGGAT-3'

3.5.4 Quantitative PCR im LightCycler

Die Amplifikation der gewünschten DNA wird durch den Anstieg der Fluoreszenzstärke gemessen. Die Stärke der Fluoreszenz steht in direktem Verhältnis zur Menge der durch die PCR entstandenen Produkte, also zur amplifizierten DNA. Die Software des LightCycler stellt die gemessene Fluoreszenzstärke gegen die Zyklenzahl dar.

Die PCR verläuft in drei Phasen. Sie beginnt mit der frühen Phase, dann folgt eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase), danach stellt sich die Plateau-Phase ein.

In der frühen Phase sind Hintergrundsignale oft stärker als die Signale des PCR-Produkts.

Nach dem Durchlaufen einiger Zyklen vermehrt sich die DNA sehr stark, nun verstärken sich auch die Fluoreszenzsignale und heben sich nun deutlich von den Hintergrundsignalen ab. Die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal der entstandenen PCR-Produkte die Hintergrundstrahlung überschreitet wird als Umschlagspunkt (Crossing Point (Cp))

bezeichnet. Um die Ausgangsmenge der verwendeten DNA quantitativ zu bestimmen, kann man die Crossing Points mit Standarts, die eine definierte DNA-Menge enthalten, vergleichen.

Zur genauen Quantifizierung der Ausgangs-DNA-Menge wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die exponentielle Wachstumsphase der PCR kann mathematisch bestimmt werden. Die Umschlagspunkte sind umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich vorhandenen Kopienzahl. Zusätzlich zu der zu bestimmenden DNA wird ein Standard, dessen Ausgangskonzentration bekannt ist, mit der PCR amplifiziert. Der Standard wird als Verdünnungsreihe eingesetzt. Der LightCycler erstellt auch vom Standard eine Kurve, auf der die Crossing points der einzelnen Verdünnungen abgelesen werden können. Da für jede Verdünnung die Konzentration bekannt ist, weiß man beim Standard jeweils, bei welcher Ausgangskonzentration wie viele Zyklen durchlaufen werden müssen, um den CP zu erreichen.

Anhand des Standards kann eine Standardgerade erstellt werden. Dafür werden die Crossing points der Verdünnungen gegen die Kopienzahl dargestellt. Die Standardgerade hat dann folgende Gleichung:

$$Cp = -(1/\log E) * \log T_0 + (\log K / \log E)$$

(K beschreibt die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist. Die Amplifikationseffizienz (E) kann Werte zwischen größer/gleich 1 und kleiner/gleich 2 annehmen. Ein Wert von 2 entspricht der Verdopplung der DNA pro PCR-Zyklus

und damit der theoretisch besten Effizienz; ein Wert von 1 hingegen ist gleichbedeutend mit keiner Amplifikation. Die Effizienz ist unter anderem von der Ziel-DNA abhängig. Da das Ausgangsmaterial dasselbe ist, liegen in den Verdünnungsreihen auch gleiche Amplifikationseffizienzen vor.)

Die Quantifizierung der unbekanntenen Proben erfolgt nun durch Messen der Umschlagspunkte. Über die Gleichung der Standardkurve lässt sich daraus die Ausgangskonzentration T_0 berechnen. T_0 ist dabei nicht die tatsächliche Konzentration der Probe, sondern entspricht der Anzahl der DNA-Kopien in der Standardverdünnung T_0 . Unter Anwendung dieser Gleichung ist entscheidend, dass die Amplifikationseffizienz der Standards und die der Proben zumindest ähnlich sein müssen.

Um aus der Konzentration der Verdünnung die Anzahl an DNA-Kopien zu bestimmen, wurde folgende Gleichung verwendet:

$$x = (N_a \times T_0) / MW$$

(T_0 = Standardkonzentration in $\text{g}/\mu\text{l}$, N_a = Avogadro-Zahl = 6×10^{23} /mol, MW = molare Masse des DNA-Fragmentes in g/mol , x = Anzahl der DNA-Fragmente)

Über die Konzentration der eingesetzten Standardkonzentrationsreihe lässt sich der Messbereich des hergestellten Assays berechnen. Da sich die Molmassen der Standard-DNA der unterschiedlichen Viren unterscheiden, wurde diese jeweils in die Berechnung mit einbezogen. (DNA-Sequenz von Reovirus: 153 Basenpaare; DNA-Sequenz von NDV: 254 Basenpaare; molare Masse Basen: 330 g/mol)

3.5.5 Extraktion der Virus-RNA aus den Zellen der Mausorgane für die PCR

Um Virus-RNA aus den Zellen der entnommenen Organe zu extrahieren, wurden die Gewebe mit PBS in einen Dounce-Homogenisator gegeben, mit dem die Zellen aufgebrochen wurden. Das Homogenisat wurde dann ca. 1 min stehengelassen, sodass sich die Zelltrümmer absetzten. Dann wurden 50 μl der RNA-haltigen Überstandes abgenommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Das überschüssige Homogenisat wurde verworfen.

Zum Überstand wurden dann zur Extraktion der RNA 200 μl ViralXpress gegeben, das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurden 250 μl Isopropanol hinzugegeben, das Gemisch wurde für 10 sec gevortext. Das Gemisch wurde nun für 10 min bei 16000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, zum Pellet wurden 400 µl Ethanol (70 %) hinzugegeben, dann wurde gevortext und wieder bei 16000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder verworfen und in 50 µl Bideest resuspendiert. Die RNA wurde, wenn sie nicht sofort verwendet wurde bei -80°C eingefroren.

3.5.6 Reverse Transkription der Virus-RNA

Da die Erbinformation sowohl von NDV als auch von Reovirus aus RNA besteht, mit der PCR aber nur DNA vervielfältigt werden kann, musste die Virus-RNA zunächst in komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA konnte dann mit der PCR amplifiziert werden.

Um die aufgereinigte Virus-RNA zuerst von eventuellen DNA Kontaminationen zu befreien wurde sie nach den Angaben des Herstellers mit 1 µl 10 x DNase I Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl bei RT 15 min lang inkubiert.

Die DNase wurden dann durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA für 10 min bei 65°C inaktiviert. Nun wurden die RNA-Proben durch Zugabe von H₂O auf 15 µl aufgefüllt. Um RNA-Doppelstränge voneinander zu trennen wurden die Proben für 5 min auf 70°C erhitzt, dann für 5 min auf 4°C abgekühlt und anschließend auf 25°C erwärmt.

Für die reverse Transkription wurden der vorbehandelten RNA 10 µl eines Reverse Transkriptase-Mastermixes beigefügt. Nach Angaben der Hersteller bestand dieses aus 1 U Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase, 1 U / µl, Promega), 5 µl 5 x Reverse Transkription-Puffer (Promega), 1 µl Zufallsoligomeren (Random Hexamers, 500 µg / ml, Promega), 0.5 µl RNase-Inhibitoren (RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 40 U / µl, Promega) und 2.5 µl dNTP's (2.5 mM, Sigma). Die Proben wurden zuerst für 60 min bei 37°C, danach für 5 min bei 90°C und schließlich 15 min bei 4°C inkubiert.

Wurde die fertige cDNA nicht gleich weiterverwendet, wurden sie bei -20°C gelagert.

3.5.7 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

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

Die Cyclereinstellungen wurden folgendermaßen gewählt: Initial-Denaturierung 10 sec bei 95°C, Annealing 15 sec bei 54°C, Extension 25 sec bei 72°C, Cooling 3 min bei 40°C. Der Zyklus wurde 30 mal wiederholt.

Sämtliche Lightcycler-Messungen und PCR-Ansätze wurden durch Dr. Alkassar durchgeführt.

3.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem einzelne Zellen analysiert werden können. Es besteht die Möglichkeit durch das Markieren unterschiedlicher Strukturen mit spezifischen Antikörpern, bestimmte Eigenschaften und Strukturen von Zellen zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um zu ermitteln, wie hoch der prozentuale Anteil an virusinfizierten Tumorzellen im entnommenen Gewebe war. Hierzu wurde die Erbinformation der Viren in den Zellen durch spezifische Fluoreszenzantikörper markiert, deren Fluoreszenz vom FACS-Gerät quantifiziert wurde.

3.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting (FACS)) wird sowohl die Größe einer Zelle, als auch ihre Granularität anhand der Intensität des von ihr verursachten Streulichts gemessen. Dazu werden Zellen nacheinander durch eine Kapillare gepresst, in der sie einen Lasterstrahl passieren, der sie von der Seite bestrahlt. Abhängig von ihrer Größe und ihrer Granularität streuen die Zellen das Licht des Laserstrahls.

Das von den Zellen gestreute Licht wird durch Detektoren (Photomultiplier) an 2 Stellen gemessen: in der ursprünglichen Richtung des Laserstrahls (Vorwärtstreulicht – forward scatter) und im 90° Winkel zum Laserstrahl (Seitwärtstreulicht – side scatter). Gemessen wird die Lichtintensität. Die Intensität des Vorwärtstreulichts ist vor allem von der Größe der Zelle abhängig, das Seitwärtstreulicht von der Granularität der Zelle.

Die Messergebnisse werden im sogenannten Dot-Plot, einem Punktwolkendiagramm dargestellt. Auf der x-Achse wird das Vorwärtstreulicht, auf der y-Achse das Seitwärtstreulicht aufgetragen. Im Dot-Plot entspricht jeder Punkt einer gemessenen Zelle. Durch den Einsatz von „gates“ kann man die Zellpopulation, die gemessen werden soll, weiter eingrenzen.

Sollen weitere Merkmale der Zellen gemessen werden, kann das jeweils gesuchte Merkmal mit Antikörpern, die spezifisch an dieses Merkmal binden, markiert werden. Die Antikörper sind entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, oder sie werden durch Zugabe von Zweitantikörpern markiert, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Argon-Laser angeregt, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Der angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses Licht wird durch den FACScan gemessen.

Auch diese Messungen werden auf einem Dot-Plot dargestellt. Auf der x- und der y-Achse wird die jeweilige Fluoreszenzintensität aufgetragen. Der Messbereich des Geräts umfasst 1024 Kanäle, in welche die Zellen je nach Intensität ihrer Fluoreszenz eingeordnet werden können.

In dieser Arbeit wurde im Kanal Fluoreszenz 1 (FL1) der Farbstoff FITC (Fluorescein-isothiocyanat) gemessen, mit dem intrazelluläre Reoviren markiert worden waren. Kanal Fluoreszenz 2 (FL2) zeigte die mit NDV infizierten Zellen an. NDV wurde mit einem Primärantikörper markiert, der dann mit einem Sekundärantikörper gefärbt wurde. Dieser war mit PE (Phycoerythrin) gekoppelt.

Zunächst wurden als Negativkontrolle nicht fluoreszenzmarkierte Tumorzellen mit dem FACS-Gerät analysiert, um den FACScan zu nullen. Anschließend wurden die mit Fluoreszenzantikörpern markierten Zellen analysiert. Die Software des FACScans ermittelte anhand der Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen den prozentualen Anteil, den virusinfizierte Zellen an der Gesamtzellzahl ausmachten.

3.6.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die durch die Durchflusszytometrie erfassten Zellen wurden anhand der intrazellulär gebundenen und spezifisch fluoreszierenden Antikörper eingeordnet. Die Antikörper, die jeweils an spezifische Merkmale der Viren gebunden waren, markierten die Zellen, die mit Viren infiziert waren. Diese Zellen leuchteten aufgrund ihrer Fluoreszenz in der durchflusszytometrischen Analyse auf und wurden in Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke in dem Kanal sichtbar, der für die jeweilige Wellenlänge der Fluoreszenz eingestellt war. Die viruspositiven Zellen wiesen dann im von der Software erstellten Diagramm einen Ausschlag nach rechts oder nach oben (je nach der Kanaleinstellung) auf.

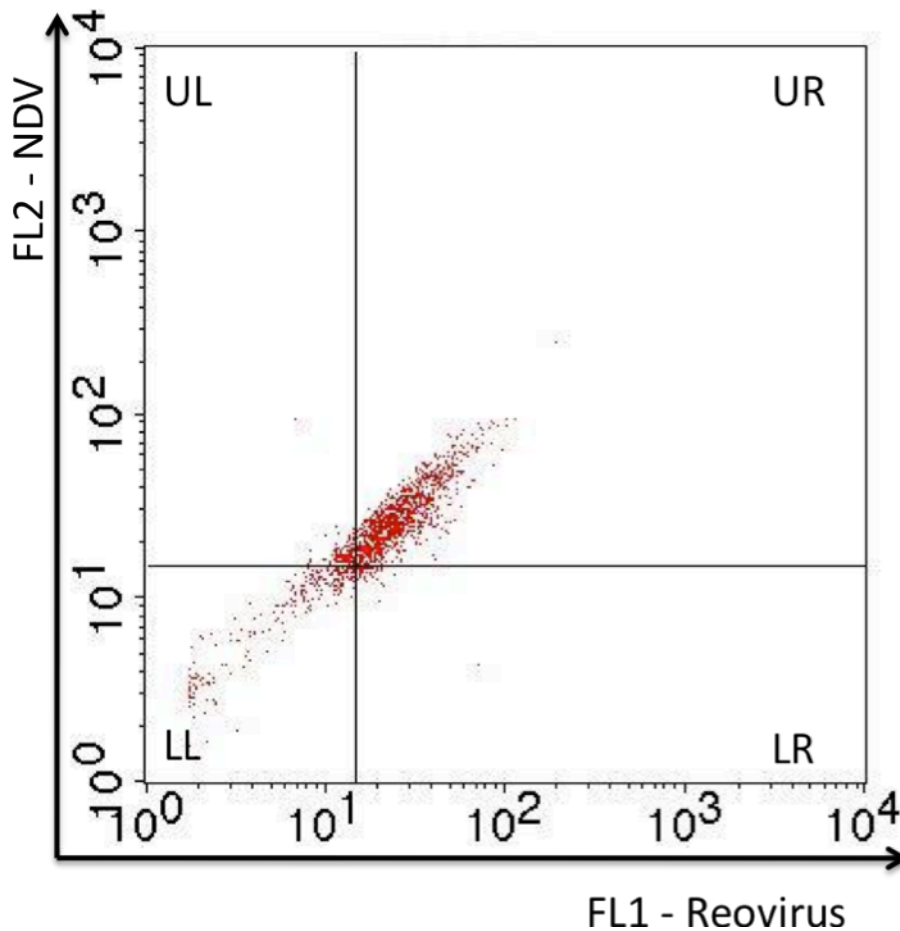


Abb. 3: Darstellung eines Punktwolkendiagramms zum besseren Verständnis der Auswertung der Ergebnisse der FACS-Analyse

Abb. 3 zeigt ein Diagramm, das nach der FACS-Analyse doppelinfizierter Zellen (Tumor 53) durch die Software des FACScan erstellt wurde. Auf der x-Achse, in Kanal FL1, wurde die Fluoreszenzintensität von FITC dargestellt, also des Farbstoffes, mit dem zuvor Reovirus markiert worden war. Man kann in Kanal FL1 also unterscheiden, ob die jeweils gemessene Zelle mit Reovirus infiziert war oder nicht. Infizierte Zellen werden auf der Achse weiter rechts dargestellt, da sie eine höhere Fluoreszenzintensität in diesem Kanal aufweisen als nicht infizierte Zellen.

In Kanal FL2, der auf der y-Achse aufgetragen wurde, wurde die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs PE gemessen. Zellen, die mit NDV infiziert waren, wiesen also einen Ausschlag in y-Richtung auf. Zellen, die mit beiden Viren infiziert waren, erschienen somit im rechten oberen Quadranten, da sie sowohl in x- als auch in y-Richtung ausschlugen.

Die Software ermittelte den prozentualen Anteil infizierter Zellen, indem sie errechnete, wie viel Prozent der Zellen in jedem Quadranten waren und lieferte eine Tabelle, aus der die Ergebnisse abgelesen werden konnten.

Quad	Events	% Gated
UL	132	8.96
UR	1056	71.64
LL	241	16.35
LR	45	3.05

Tabelle 3: Beispiel für die quantitative Auswertung einer durchflusszytometrischen Messung

Zum besseren Verständnis wurde in Tabelle 3 eine solche Auswertung dargestellt. In diesem Fall erkennt man, dass sich im rechten, oberen Quadranten 71,54 % der Zellen befanden. Dies sind die doppelt infizierten Zellen.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac AppR 3.0.1.

3.6.3 Extraktion und Fixierung der Zellen aus den Geweben für die Durchflusszytometrie

Die Gewebe, die den toten Mäusen entnommen worden waren, mussten für die FACS-Analyse aufbereitet werden.

Alle der folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis gekühlt durchgeführt.

Das Gewebe wurde nach der Entnahme aus den Mäusen mit einem Skalpell in kleine Stückchen zerteilt. Diese wurden dann in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in 500 µl PBS suspendiert. Die Suspension wurde bei 1500 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert. Das Gewebe wurde dann in Kollagenase resuspendiert (0,25% Kollagenase, in PBS gelöst) und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Es wurde jeweils soviel Kollagenase-Lösung hinzugegeben, wie Gewebevolumen vorhanden war.

Daraufhin wurde das Gewebe mit einer Spritze aufgezogen und 3 mal durch ein Zellsieb in ein neues Eppendorfgefäß gedrückt.

Die Zellsuspension wurde dann für 10-15 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und anschließend pelletiert. Um die Zellen zu fixieren wurden sie nun langsam in 2 ml Ethanol (70 %) resuspendiert. Sie wurden damit für 12 Stunden bei – 20°C inkubiert.

3.6.4 Färbung intrazellulärer Virusantigene für die Durchflusszytometrie

Nach zwölfstündiger Inkubation in Ethanol bei – 20°C wurden die Zellen abzentrifugiert und pelletiert. Anschließend wurden sie in 0,25% eiskaltem Triton-X resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Zellen wieder pelletiert, das Zellpellet wurde nun mit 1 %iger Rinderalbuminlösung (1 % BSA in PBS) eine Stunde lang bei 4°C inkubiert.

Dann wurden die Zellen abermals pelletiert und daraufhin in 100 µl Antikörperlösung resuspendiert und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert.

Dazu wurden Anti-NDV-Ak-Rabbit (1:200 in PBS) und Anti-Reo-Virus-FITC-Ak verwendet. Nun wurden die Zellen mit 2 ml PBS 10 min lang inkubiert und dann wieder pelletiert.

Da die NDV-Antikörper nicht fluoreszenzmarkiert waren, mussten hier Zweitantikörper hinzu gegeben werden. Dazu wurden PE-Anti-Rabbit-AK (100 µl) auf die Zellen gegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Zellen wieder pelletiert und in 250 µl FACS-Flüssigkeit resuspendiert.

Die Zellen wurden nun im FACScan analysiert.

Die Analyse der Zellen im FACScan wurde durch Dr. Alkassar durchgeführt.

3.7 Herstellung von Gefrierschnitten zur mikroskopischen Untersuchung

3.7.1 Verarbeitung und Aufbereitung der Organe für die Herstellung von Gefrierschnitten

Die Teile der den Mäusen entnommenen Organe, die später für Gewebeschnitte verwendet wurden, wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Organteile wurden später mit einem Kryostat (Anatomie des Uniklinikums des Saarlandes) bei -22 bis -25°C zu 8 µm dünnen Gefrierschnitten geschnitten. Diese wurden auf einen Objektträger aufgezogen und auf einer 70°C warmen Heizplatte getrocknet. Die Schnitte wurden dann bei -20°C gelagert oder sofort gefärbt.

3.7.2 Färben der Gewebsschnitte

Um zu ermitteln, ob in den Gewebeschnitten Virusmaterial war und wie sich die Viren im jeweils untersuchten Gewebe verteilen, wurden die Gewebeschnitte angefärbt. Die Viren wurden mit fluoreszenz-markierten anti-Reo- bzw. anti-NDV-Antikörpern markiert, die Zellkerne der Gewebe wurden mit DAPI sichtbar gemacht.

Zur Fixierung der Schnitte wurden diese 15 Minuten lang in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie 3x mit PBS gewaschen. Um die Zellmembranen permeabel für die Antikörper zu machen, wurden die Schnitte kurz mit eiskaltem 0,25 %igem Triton-X100 inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen. Nun wurden die Präparate über 45 Minuten mit Albumin/FCS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Danach wurde nochmals mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Primärantikörper auf die Präparate gegeben. Um Reovirus zu markieren, wurde ein FITC-gekoppelter Anti-Reovirus-Ak verwendet. NDV wurde durch einen Rabbit-Anti-NDV-Ak als Primär-Antikörper markiert, der dann durch einen Zweitantikörper, einen TRITC-gekoppelten Anti-Rabbit-Ak, sichtbar gemacht wurde. Für die Anfärbung der Schnitte mit den Antikörpern wurden 100 µl des Antikörpers direkt auf das Präparat gegeben, danach wurde der Objektträger mit Parafilm abgedeckt, um ein Austrocknen des Präparats zu verhindern. Das Präparat wurde 2 Stunden mit den Antikörpern inkubiert. Dann wurden die Zellen 3 mal 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Nun wurden die Sekundärantikörper (Rabbit) auf die Präparate gegeben, die Inkubationszeit betrug ebenfalls 2 Stunden. Anschließend wurden die Schnitte wieder 3 mal mit PBS gewaschen. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Präparate für eine min mit DAPI inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nochmals mit PBS gewaschen. Die Schnitte konnten nun im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Die gefärbten Schnitte wurden von Dr. Alkassar abfotografiert und digital bearbeitet.

3.8 Nachweis von Virusantikörpern im Mäuseserum

Um herauszufinden, ob Viren nach der intratumoralen Injektion in die Blutzirkulation der Mäuse eingedrungen waren, wurde das Mäuseserum auf Antikörper gegen die jeweiligen Viren getestet.

Zur Untersuchung des Serums auf Anti-Virus-Antikörper wurden U373-Zellen auf Deckgläschen ausplattiert.

Die Deckgläschen wurden dazu in Methanol getaucht und dann abgeflammt. Dann wurden sie in 6-well-Platten verteilt. Auf die Deckgläschen wurden dann jeweils $0,5 \times 10^6$ U373-Zellen in 0,5 ml Nährmedium gegeben. Diese wurden dann im Brutschrank inkubiert bis eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht wurde.

Dann wurden die Zellen mit den jeweiligen Viren infiziert (Reo-, NDV-, oder Reo+NDV) und für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit Paraformaldehyd fixiert.

Die Deckgläschen wurden dann 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min mit 1,5 ml eiskaltem Triton-X (0,25 %) pro well permeabilisiert. Dann wurde nochmals 2x mit PBS gewaschen. Unspezifischen Bindungsstellen wurden mit einer 5 % FCS 1 % Albumin-Lösung für eine Stunde blockiert.

Anschließend wurden 30 µl Mäuseserum auf die Deckgläschen gegeben. Dabei wurde Serum der Mäuse, deren Tumor mit NDV behandelt wurde auf mit NDV infizierte U373-Zellen gegeben, Serum der mit Reovirus infizierten Mäuse wurde auf die Gläschen mit Reovirus-positiven U373-Zellen gegeben. Die Deckgläschen wurden 1h mit dem Mäuseserum inkubiert.

Nun wurden die Deckgläschen 2x mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Deckgläschen auf mit zuvor mit 30 µl Maus-FITC (anti-Maus-Antikörper) benetzte Parafolie gegeben und für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde wieder 2x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläschen mit 30 µl Dapi, wieder auf Parafilm, für 1 min inkubiert.

Anschließend wurden 40 µl Glycerol FA-Puffer auf einen Objektträger gegeben, darauf wurden dann die Deckgläschen gestürzt. Die Ränder des Deckgläschens wurden mit Nagellack abgedichtet. Die gefärbten Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Kapitel 4 Ergebnisse

4.1 Die Wirkung der intratumoralen Applikation von NDV und Reovirus auf subkutane Maustumoren

Erstes Ziel der Arbeit war, die onkolytische Wirksamkeit von Reovirus, NDV und beiden Viren in Kombination in der Therapie von Glioblastomen im Mausversuch zu vergleichen. Hierfür wurden Mäuse, bei denen ein subkutanes Tumorstadium induziert worden war mit Reovirus, NDV oder Reovirus in Kombination mit NDV behandelt. Neben der Messung der Größenentwicklung der Tumoren erfolgte die Analyse infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz. Zur Bestimmung der Viruslast wurde eine quantitative RT-PCR-Analyse des Tumorgewebes durchgeführt

Beim Vergleich der Mittelwerte der Tumorumfänge (siehe Abb. 4) wurde sowohl bei den mit Viren behandelten Tumoren als auch bei der Kontrollgruppe ein kontinuierliches, meist exponentielles Tumorumfangwachstum beobachtet.

Allerdings verlief die Wachstumskurve der Tumoren, die mit der Virenkombination therapiert worden waren, viel flacher als die der Kontrollgruppe. Die Tumore der mit beiden Viren behandelten Mäuse erreichten nur einen Bruchteil (ca. 1/5) der mittleren relativen Tumorumfangzunahme verglichen mit der Kontrollgruppe.

Die Tumoren, die mit beiden Viren therapiert wurden, zeigten auch im Vergleich zu denen, die nur mit einem Virus therapiert worden waren, die kleinste relative Tumorumfangzunahme.

Auch die Tumoren der Mäuse, die mit NDV therapiert worden waren, wuchsen langsamer und blieben kleiner, als die der Kontrolltiere. Sie wuchsen allerdings im Mittel schneller und wurden größer als die der doppelt infizierten Mäuse.

Die Tumoren der Mäuse, die mit Reovirus therapiert worden waren, wiesen anfangs eine mit den Kontrolltieren vergleichbare relative Tumorumfangzunahme auf. Gegen Ende des Versuchs wuchsen die nur mit Reovirus therapierten Tumoren etwas schneller als die Tumoren der Kontrolltiere. Am Versuchsende waren dies die größten Tumoren.

15 Tage nach der ersten Virusinjektion wurden 7 Mäuse getötet. Es handelte sich dabei um jeweils 2 Mäuse jeder Versuchsgruppe. Aus der Gruppe, die mit der Kombination aus Reovirus und NDV therapiert worden war, wurde nur 1 Maus getötet, weil sie die in 3.4.7 genannten Kriterien erfüllte, also eine erhebliche Behinderung aufgrund der Tumorumgröße, hatte. Es wurden jeweils die Mäuse mit den größten Tumoren getötet, dies waren auch die Mäuse, die am meisten durch die Tumoren behindert wurden. 20 Tage nach der Virusinjektion wurden auch die übrigen Mäuse getötet.

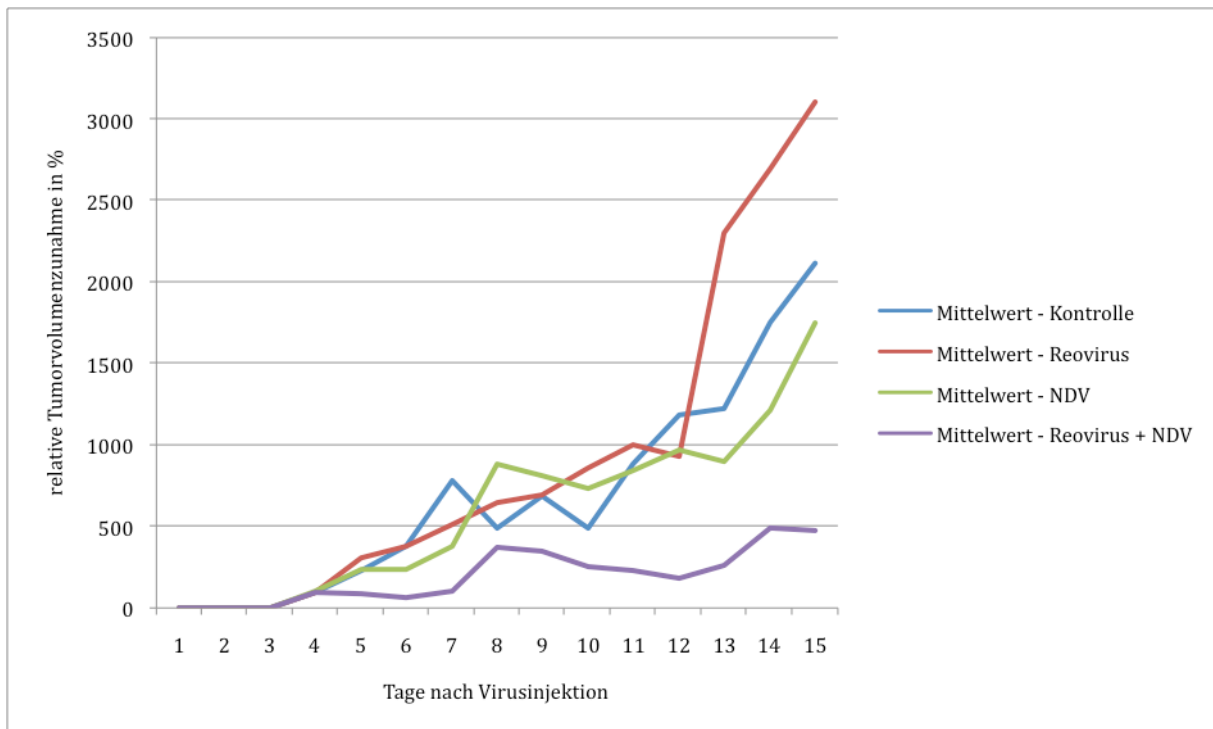


Abb. 4: Verlauf des mittleren Tumorwachstums in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion bis zum Tod der ersten 7 Mäuse

4.2 Das Verhalten der Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen

4.2.1 Das Tumorwachstum der Kontrolltiere

Die Tumoren der Kontrollmäuse wuchsen kontinuierlich und relativ schnell (siehe Abb.5).

Die meisten Tumoren zeigten eine exponentielle Volumenzunahme. Am Tag 15 nach der Virusinjektion erreichten die Tumoren im Mittel 2116 % ihres Ausgangsvolumens. Danach wurden 2 Mäuse getötet, da sie durch die Größe ihres Tumors erheblich behindert wurden.

Die Tumoren der übrigen beiden Mäuse erreichten am Versuchsende im Mittel 5170 % ihres Ausgangsvolumens.

Weder immunhistologisch noch durchflusszytometrisch konnte in der Kontrollgruppe ein Anhalt für eine Infektion mit Reovirus oder NDV nachgewiesen werden. Auch die RT-PCR, die zur Bestimmung der Viruslast durchgeführt wurde, erbrachte keinen Anhalt für eine Infektion mit einem der beiden Viren. Die Gruppe konnte somit als negative Kontrollgruppe verwendet werden.

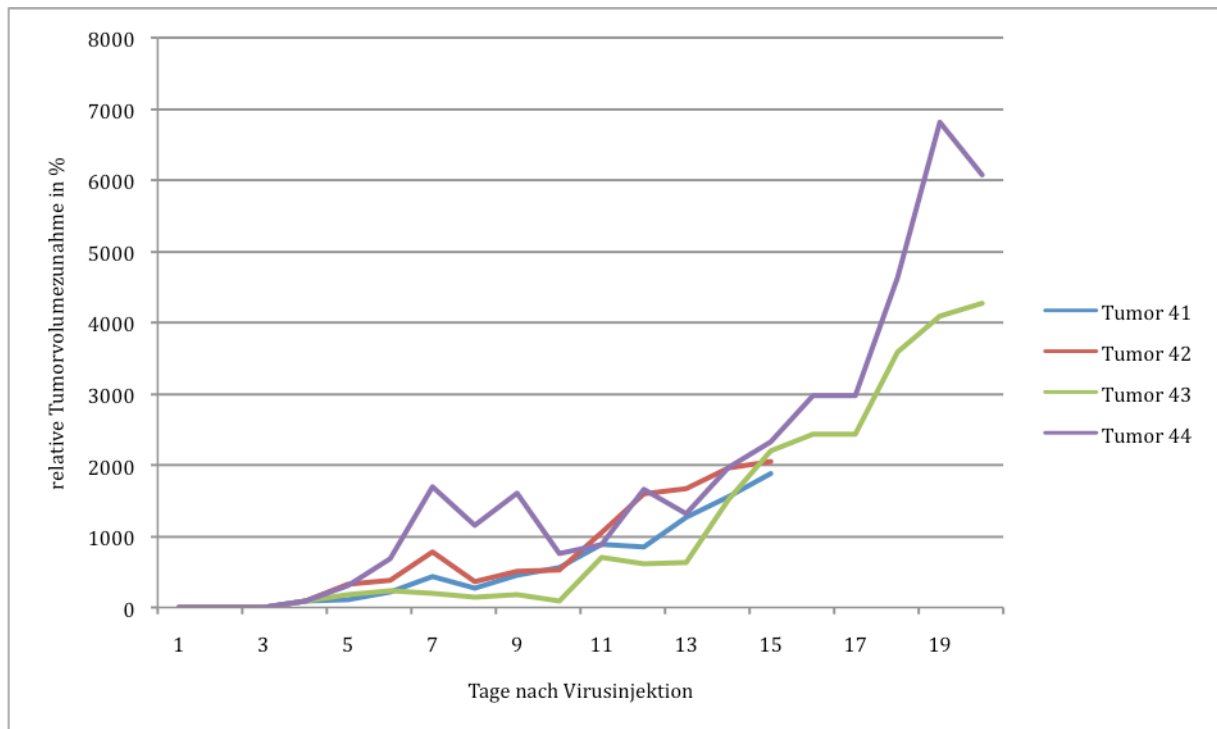


Abb. 5: Verlauf des Tumorwachstums der Kontrollmäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion

4.2.2 Die Wirkung von intratumoral applizierten Reoviren auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen

Die Tumoren, die mit Reovirus behandelt worden waren, hatten anfangs eine mit den Kontrolltumoren vergleichbare Volumenzunahme. Gegen Ende des Versuchs wuchsen sie jedoch schneller als die Tumoren der Kontrollmäuse und erreichten größere Tumorumfänge. Aus den in 3.4.7 erwähnten Gründen wurden auch in dieser Gruppe am 15. Tag nach Virusinfektion 2 Mäuse getötet. Die Tumorumfänge dieser beiden Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt etwa doppelt so groß wie die der beiden anderen Mäuse. In Abb. 6 ist die relative Tumorumfängenzunahme in Abhängigkeit vom Tumorausgangsvolumen dargestellt. Tumor 48 hatte zwar eine geringe relative Volumenzunahme, er war allerdings zu Versuchsbeginn schon größer als die anderen Tumoren, weswegen diese Maus auch am 15. Tag p.i. getötet werden musste. Am 15. Tag p.i. hatten die Tumoren ein mittleres Volumen von 3105 % ihres Ausgangsvolumens. Die beiden übrigen Tumoren hatten am Versuchsende, 20 Tage p.i., ein relatives Tumorumfang von 6677 % des Tumorausgangsvolumens.

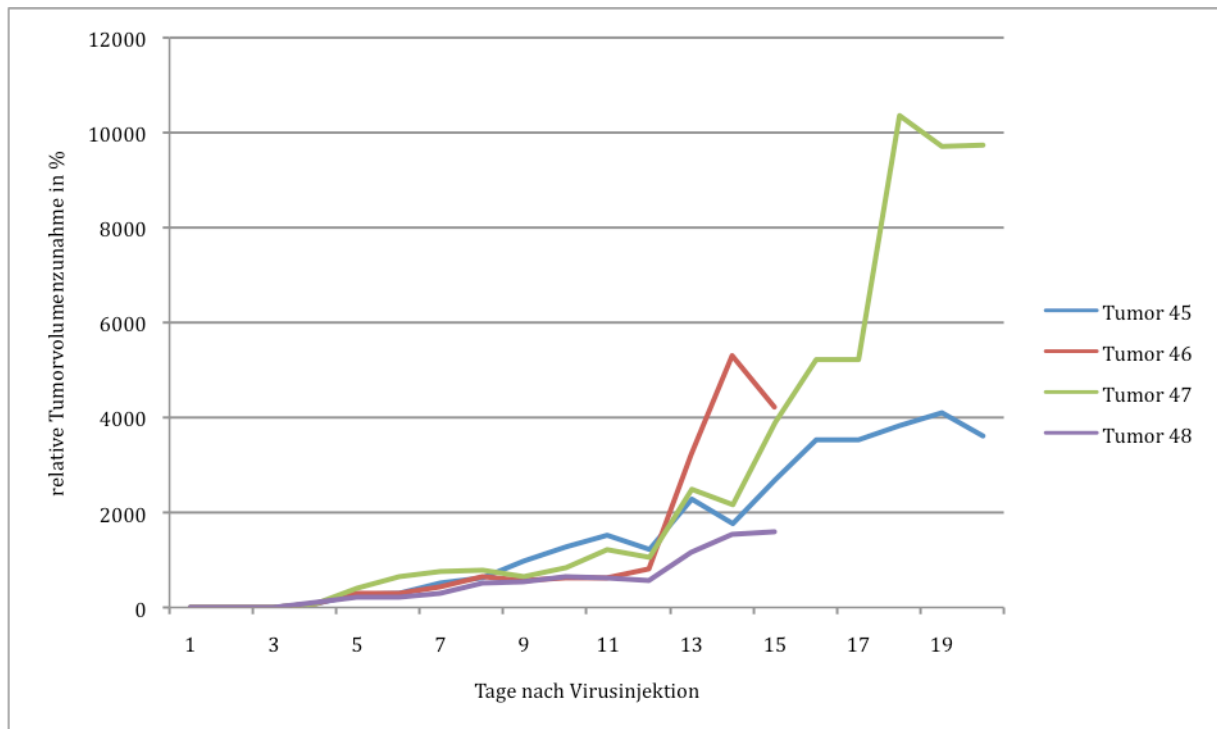


Abb. 6: Verlauf des Tumorwachstums der mit Reovirus therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion

Um den Anteil der mit Reovirus infizierten Zellen zu ermitteln, erfolgte eine durchflusszytometrische Messung der Tumorzellen, die mit Reovirus behandelt worden waren (siehe Abb. 7). Dabei wurde insgesamt eine niedrige Rate an Reovirus-infizierten Tumorzellen festgestellt. Im Mittel waren nur 4,4 % der Tumorzellen mit Reovirus infiziert. In Tabelle 4 kann die Rate an Reovirus-infizierten Tumorzellen für jeden einzelnen der 4 Tumoren nachgelesen werden.

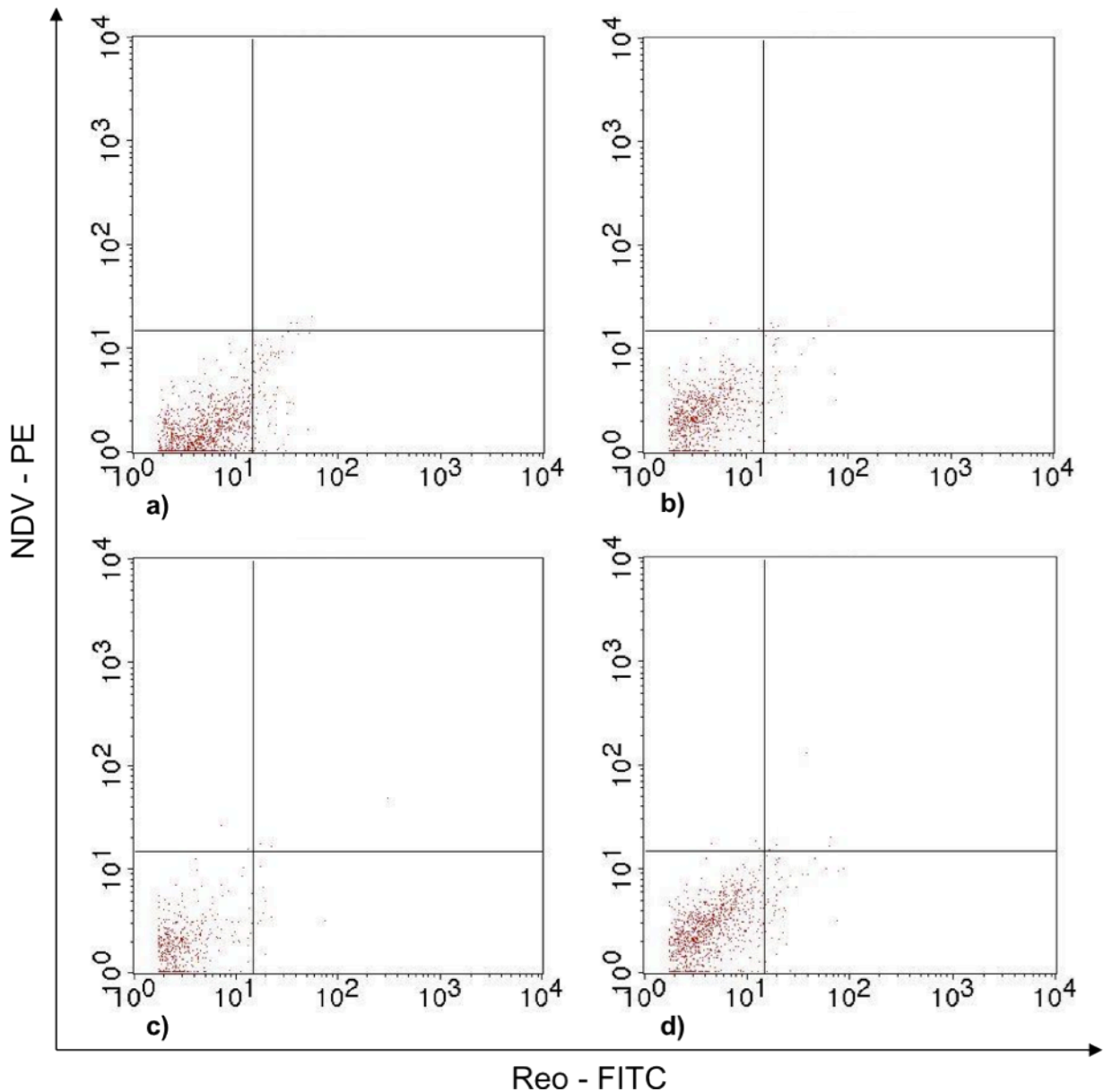


Abb. 7: Darstellung der Messungen Reovirus-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie. Die roten Punkte stellen die gemessenen Zellen dar. Infizierte Zellen sind im unteren rechten Quadranten lokalisiert. Nicht infizierte Zellen sind im unteren linken Quadranten dargestellt. Tumor 45 b) Tumor 46 c) Tumor 47 d) Tumor 48

Zur genauen Bestimmung der Viruslast infizierter Tumoren wurde mittels RT-PCR die Zahl der Viruspartikel, die in einem Gramm Tumorgewebe waren, ermittelt. Bei den Tumoren, die nur mit Reovirus infiziert waren, lag die Konzentration bei $1,28 \cdot 10^8$ Viruspartikel pro g Tumor. Die Ergebnisse für die einzelnen Tumoren sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Zur besseren Vergleichbarkeit der onkolytischen Wirkung von Reovirus wurden die relative Tumorumfangzunahme zusammen mit der gemessenen Viruslast und dem Anteil infizierter Zellen in Abb. 8 für jeden der 4 Maustumoren dargestellt. Man erkennt, dass bei den Tumoren mit der größten relativen Volumenzunahme, z. B. bei Tumor 47, eher eine geringe

Viruskonzentration und relativ wenige virusinfizierte Zellen gemessen wurden. Im Gegensatz dazu wies der Tumor mit der kleinsten Volumenzunahme, Tumor 48, eine hohe Viruskonzentration und relativ viele virusinfizierte Zellen auf.

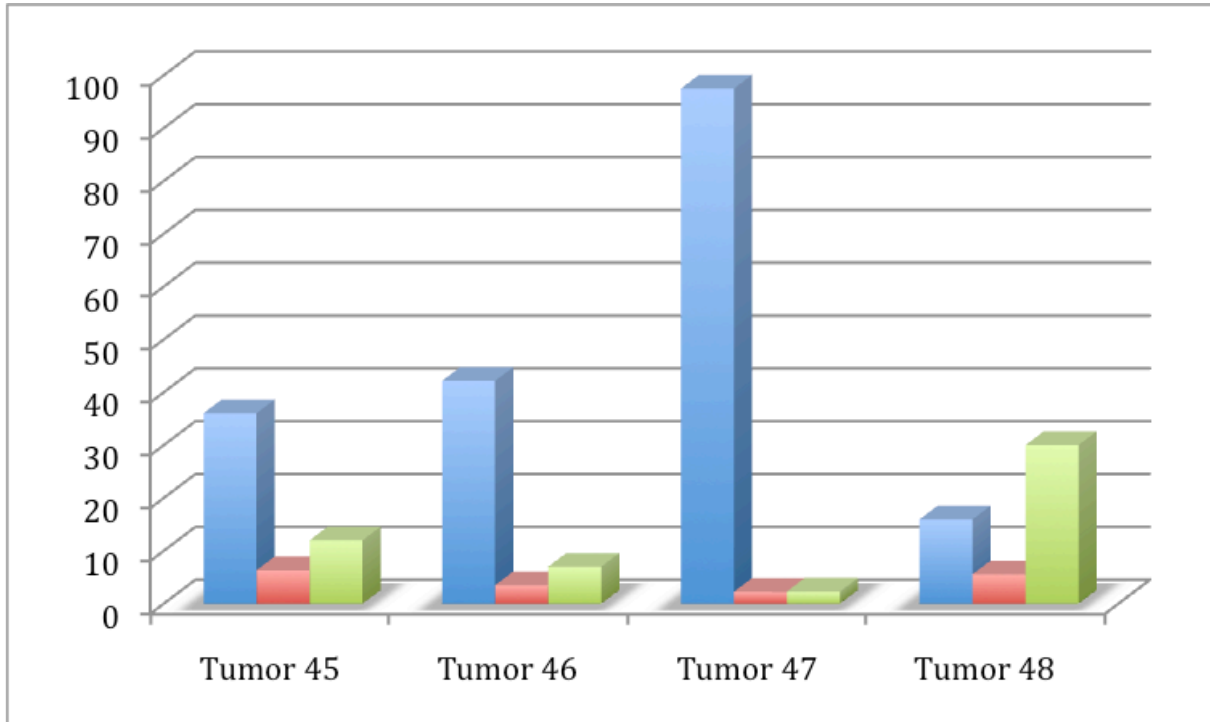
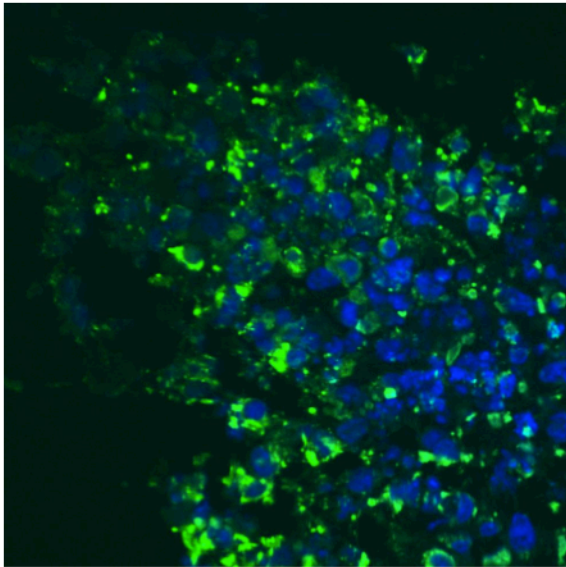
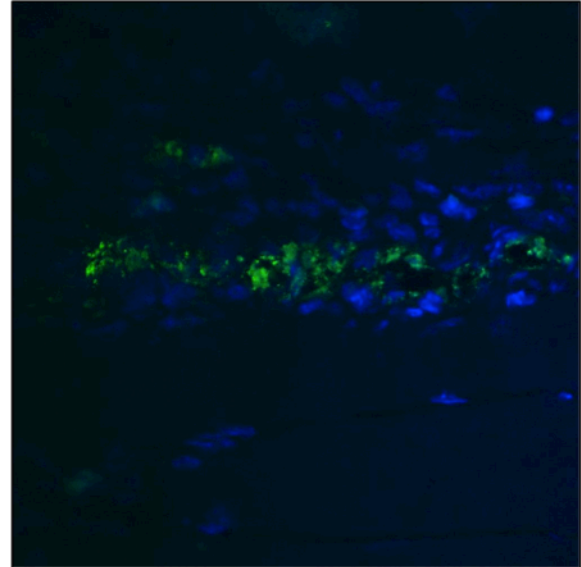


Abb. 8: gemeinsame Darstellung der Tumolvolumenentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen nach intratumoraler Reovirus-Applikation.
 Blauer Balken: relatives Tumolvolumen in % *0,01 des Tumorausgangsvolumens
 Roter Balken: Anteil reovirusinfizierter Zellen in %
 Grüner Balken: Viruslast in Viruspartikel/100 ng Tumorgewebe

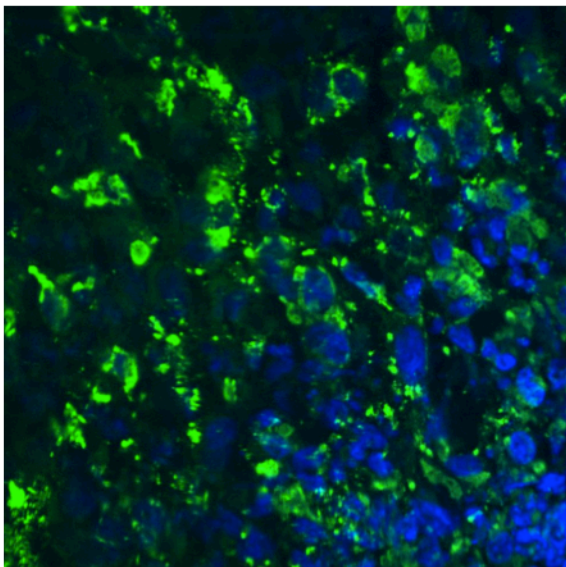
Um festzustellen, wie die histologische Verteilung virusinfizierter Zellen in den mit Reovirus behandelten Tumoren war, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung und anschließend eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Tumor-Gefrierschnitten durchgeführt. In allen Gefrierschnitten der mit Reovirus therapierten Maustumoren wurden virusinfizierte Zellen gefunden. Die überwiegende Mehrzahl an Tumorzellen war nicht mit Reovirus infiziert. Virusinfizierte Tumorzellen wurden clusterartig gehäuft im Gewebe gefunden. In Abb. 9 sind Regionen mit hoher Reovirus-Infektionsrate der Mäuse 45-47 dargestellt. In den virusinfizierten Zellen erkennt man das typische Bild einer zytoplasmatischen Anhäufung von Reovirus-Proteinen, sogenannten Inclusion-bodies, wie dies bei einer Infektion mit Reovirus vom Serotyp III typisch ist (s. Abb. 9). Ein wesentlicher Unterschied der Tumorschnitte der nach 15 Tagen getöteten Mäuse zu denen der am Versuchsende getöteten Mäuse wurde nicht festgestellt.



a)



b)



c)

Abb. 9: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 45-47 nach intratumoraler Applikation von Reovirus. FITC-gekoppelte Anti-Reovirus-Antikörper erscheinen grün. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI ist blau.

a) Maustumor 45 b) Maustumor 46 c) Maustumor 47

4.2.3 Die Wirkung von intratumoral applizierten NDV auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen

Die Mäuse, die nur mit NDV behandelt worden waren hatten die Tumoren mit der zweitkleinsten relativen Volumenzunahme. Bei einer Maus dieser Gruppe wuchs von Anfang an kein makroskopisch messbarer Tumor an, dennoch wurden die Virusapplikationen durchgeführt. Auch nach Tötung und Sektion konnte bei dieser Maus kein Tumor gefunden

werden. Eine Berücksichtigung dieser Maus im Rahmen der durchgeführten Versuche war deswegen nicht möglich.

Auch in der Gruppe, die mit NDV therapiert wurde, wurden 15 Tage nach der Virusinjektion 2 Mäuse getötet, weil sie die in 3.4.7 genannten Kriterien erfüllten. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumoren ein mittleres Tumolvolumen von 1750 % ihres Ausgangsvolumens erreicht.

Lediglich bei einer Maus konnte der Versuch bis zum Ende durchgeführt werden. Diese Maus hatte zum Zeitpunkt ihres Todes einen Tumor mit dem Volumen von 452 % seines Ausgangsvolumens. Abb. 10 zeigt die Entwicklung der Tumolvolumina der 3 mit NDV therapierten Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit. Maus 50 fällt dabei dadurch auf, dass ihr Tumor verglichen mit den anderen beiden behandelten Mäusen langsamer wuchs. Da es sich hierbei nur um eine Maus handelt kann dies natürlich nicht durch eine Signifikanz belegt werden. Allerdings zeigten sich auch in der viralen Analyse des Tumorgewebes Hinweise für eine virusbedingte Tumorreduktion (s. Abb. 12).

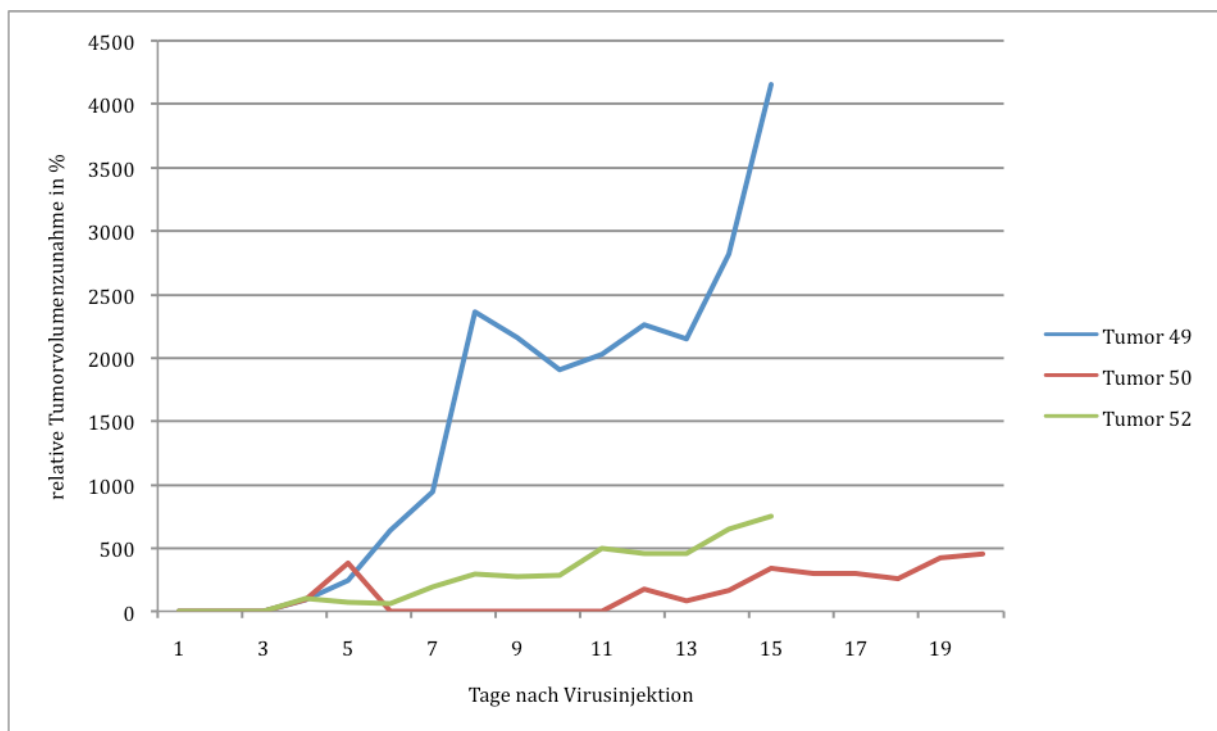


Abb. 10: Verlauf des Tumorwachstums der mit NDV therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion

Zwar wurde in der durchflusszytometrischen Analyse im Vergleich zu den anderen beiden Tumoren kein höherer Anteil an virusinfizierten Tumorzellen nachgewiesen (s. Abb. 11). Bei der Bestimmung der Viruslast jedoch wurden deutlich höhere Viruskonzentrationen pro g Tumorgewebe (im Mittel ca. 10 mal höhere Viruskonzentration als bei den anderen Tumoren dieser Gruppe) in Tumor 50 gefunden (s. Tab. 4 und Abb.12). Die Tumorentwicklung von

Tumor 50 wies in den ersten 7 Tagen p.i. eine Verkleinerungstendenz auf, bevor ab dem 10. Tag p.i. wieder ein Tumorwachstum einsetzte (s. Abb. 10).

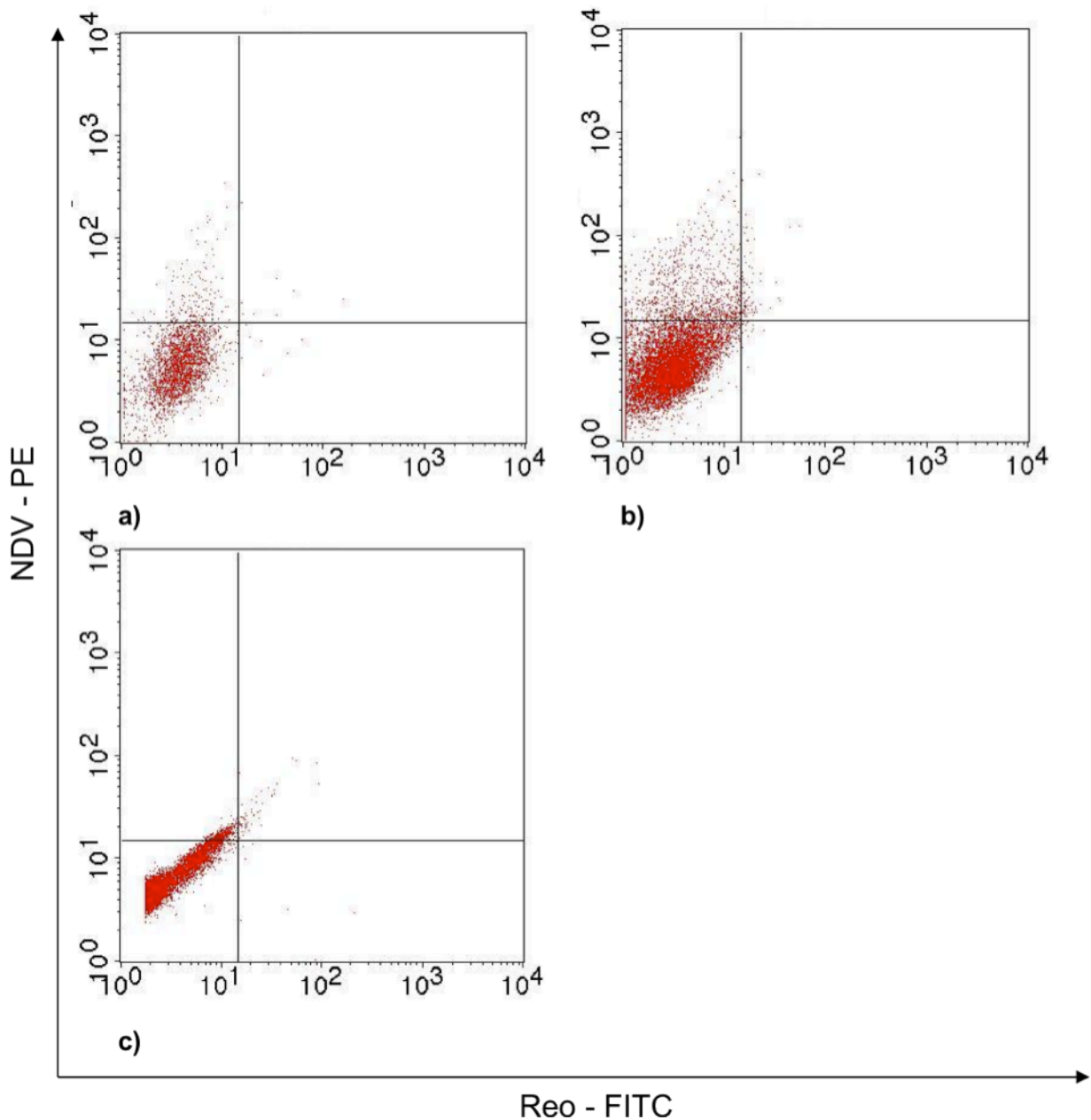


Abb. 11: Darstellung der Messungen NDV-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie. Infizierte Zellen sind im oberen linken Quadranten lokalisiert, nicht infizierte Zellen sind im unteren linken Quadranten dargestellt.
Tumor 49 b) Tumor 50 c) Tumor 52

Durchflusszytometrisch wurde eine relativ geringe Infektionsrate an NDV-infizierten Tumorzellen festgestellt. Im Mittel waren 7,5 % der Tumorzellen virusinfiziert. Dies sind allerdings fast doppelt so viele infizierte Zellen wie bei den Tumoren, die mit Reovirus therapiert worden waren (hier waren nur 4,4 % der Zellen infiziert). In der PCR wurde eine

Viruskonzentration von $7,01663 \cdot 10^{11}$ Viruspartikeln pro Gramm Tumor festgestellt. Die gemessenen Werte für die einzelnen Tumoren sind in Tab. 4 aufgelistet.

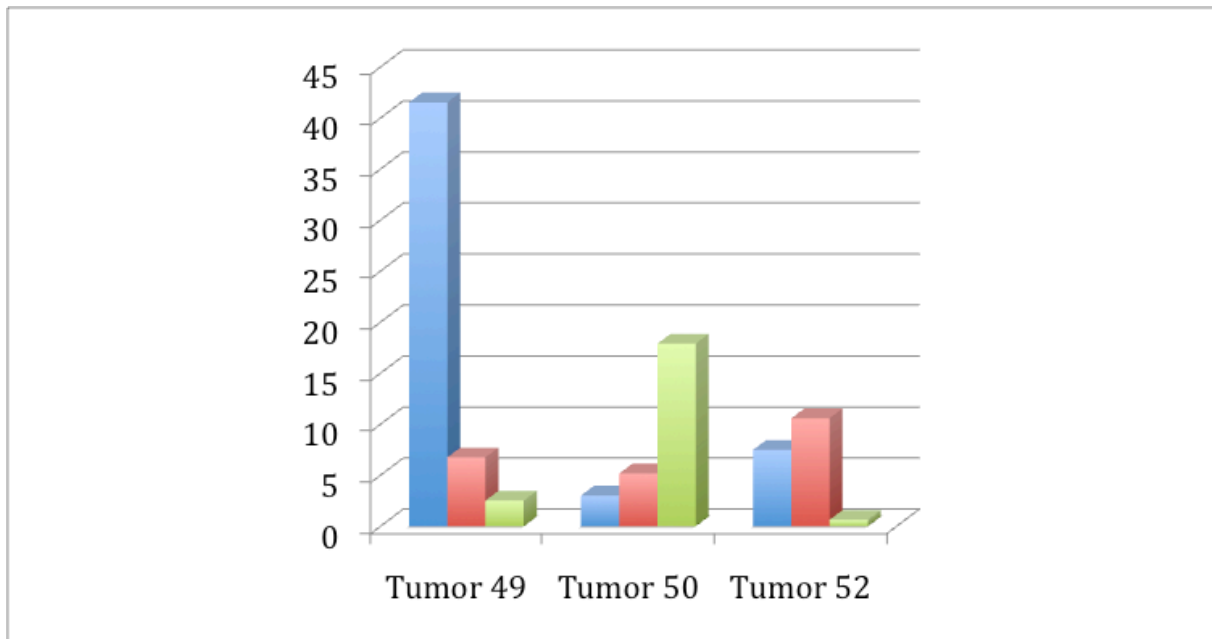


Abb. 12: gemeinsame Darstellung der Tumorumfangentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen, nach intratumoraler Applikation von NDV.

Blauer Balken: relatives Tumorumfang in % * 0,01 des Tumorausgangsvolumens

Roter Balken: Anteil NDV-infizierter Zellen in %

Grüner Balken: Viruslast in Viruspartikel/ 0,01 ng Tumor

Auch für NDV wurden zum Vergleich in Abb. 12 alle drei mit NDV behandelten Tumoren mit der relativen Tumorumfangzunahme, der gemessenen Viruslast und dem Anteil virusinfizierter Zellen dargestellt. Hier sieht man nochmals, dass Tumor 50, der kleinste Tumor, einen hohen prozentualen Anteil virusinfizierter Tumorzellen aufwies. Im Gewebe des größten Tumors, Tumor 49, wurde eine relativ niedrige Viruskonzentration in der PCR gemessen.

Der in der FACS-Analyse gemessene Anteil infizierter Zellen und die in der PCR gemessene Viruskonzentration korrelieren nicht erkennbar miteinander.

Auch für die mit NDV therapierten Tumoren wurde zur Analyse der Virusverteilung im Tumorgewebe eine immunfluoreszenzhistologische Untersuchung durchgeführt. Der größte Teil der Tumorzellen war nicht mit NDV infiziert. Es fanden sich Regionen mit clusterartigen Anhäufungen virusinfizierter Zellen. Erkennbar waren die infizierten Zellen durch die für NDV typische punktförmige Verteilung der Virusproteine im Zytosol (s. Abb. 13).

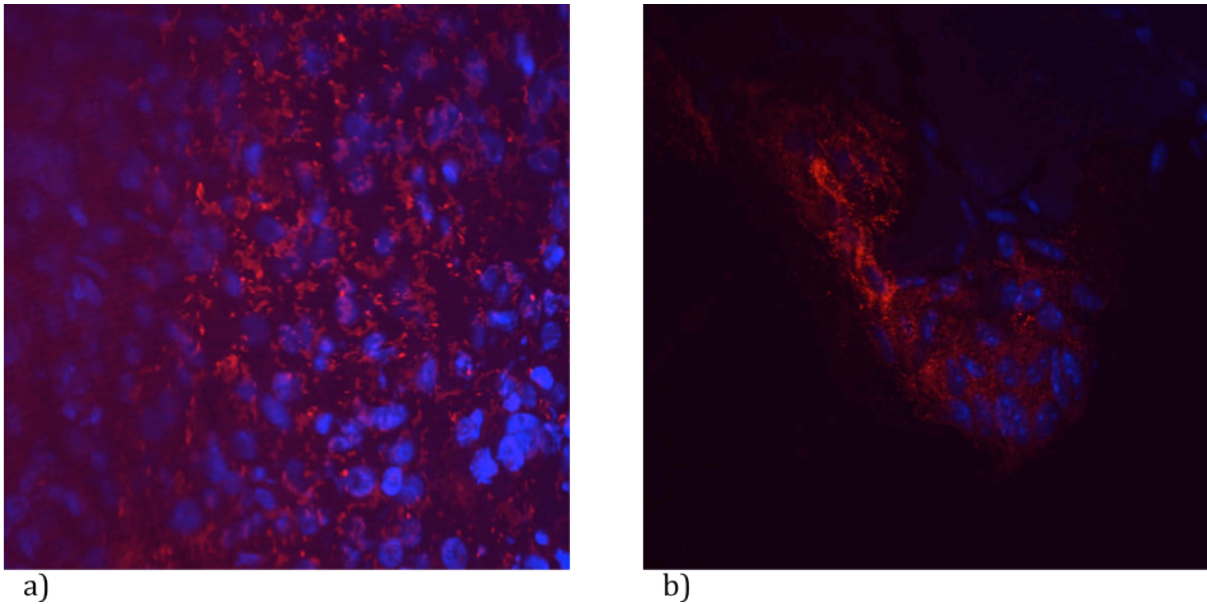


Abb 13: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 49 und 50 nach intratumoraler Applikation von NDV. NDV wurde mit PE-gekoppelten Zweitantikörpern, die rot erscheinen, markiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI ist blau.
a) Maustumor 49 b) Maustumor 50

4.2.4 Die Wirkung von einer intratumoral applizierten Kombination aus NDV und Reoviren auf subkutane Glioblastome bei NMRI-Mäusen

Die Tumoren, die mit beiden Viren behandelt worden waren, hatten anfangs eine relativ langsame Volumenzunahme, doch auch bei Ihnen wuchsen die Tumoren gegen Ende des Versuchs exponentiell (s. Abb.14).

In dieser Versuchsgruppe musste nur 1 Maus aufgrund der in 3.4.7. genannten Bedingungen am 15. Tag p.i. getötet werden. Die anderen Tumoren hatten noch keine für die Mäuse behindernde Größe erreicht, sodass in dieser Gruppe der Versuch mit 3 Mäusen bis zu Ende durchgeführt werden konnte.

15. Tage p.i. hatten die Mäuse in dieser Gruppe eine relative Tumorumfangzunahme von 476 % ihres Ausgangsvolumens. Die übrigen 3 Mäuse wiesen am Versuchsende eine durchschnittliche Tumorumfangzunahme von 930 % ihres Ausgangsvolumens auf.

Die relative Tumorumfangzunahme der Mäuse, die mit beiden Viren in Kombination therapiert worden waren, war zu allen Zeitpunkten deutlich kleiner als die der Kontrolltiere (ca. 5 mal weniger relative Volumenzunahme im Vergleich zur Kontrolle) und der Tumore, die nur mit Reovirus therapiert worden waren.

Am 15. Tag p.i. war das mittlere relative Tumorumfang der Mäuse, die beide Viren in Kombination erhalten hatten, auch deutlich kleiner als das der Mäuse, die nur NDV erhalten hatten. Zum Versuchsende allerdings war das relative Tumorumfang der Maus, die nur mit

NDV infiziert worden war, kleiner als das mittlere Volumen der Mäuse, die beide Viren appliziert bekommen hatten (s. Abb. 4).

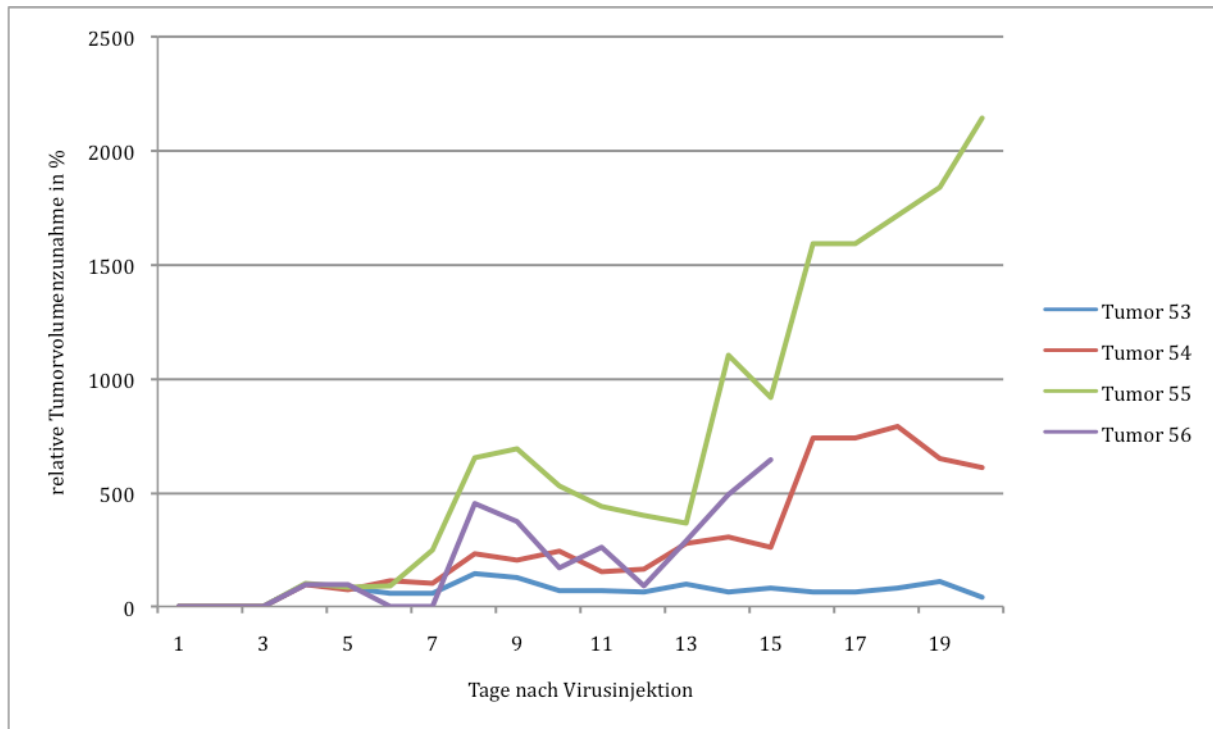


Abb. 14: Verlauf des Tumorwachstums der mit Reovirus und NDV in Kombination therapierten Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Virusinjektion

Um bei den mit beiden Viren therapierten Tumoren die Rate sowohl mono- als auch doppelt infizierter Tumorzellen festzustellen, wurde auch bei diesen Tumoren eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt (s. Abb. 15).

Aus Tabelle 4 kann entnommen werden, dass die Rate virusinfizierter Tumorzellen bei den doppelt infizierten Tumoren deutlich höher war, als bei den Tumoren, die nur mit einem Virus therapiert worden waren. Im Mittel waren hier 21,81 % der Tumorzellen mit beiden Viren infiziert. Im Vergleich dazu waren bei den nur mit NDV therapierten Tumoren im Mittel 7,5 % der Tumorzellen virusinfiziert, bei den mit Reovirus behandelten Tumoren waren im Mittel nur 4,4 % der Zellen virusinfiziert.

Die Anzahl mono-infizierter Tumorzellen bei den mit der Viruskombination therapierten Mäusen war etwas niedriger als die Infektionsrate der nur mit jeweils einem Virus therapierten Mäuse. Bei den mit der Viruskombination therapierten Tumoren waren im Mittel 1,3 % der Tumorzellen nur mit Reovirus infiziert, 6,2 % der Tumorzellen waren allein mit

NDV infiziert.

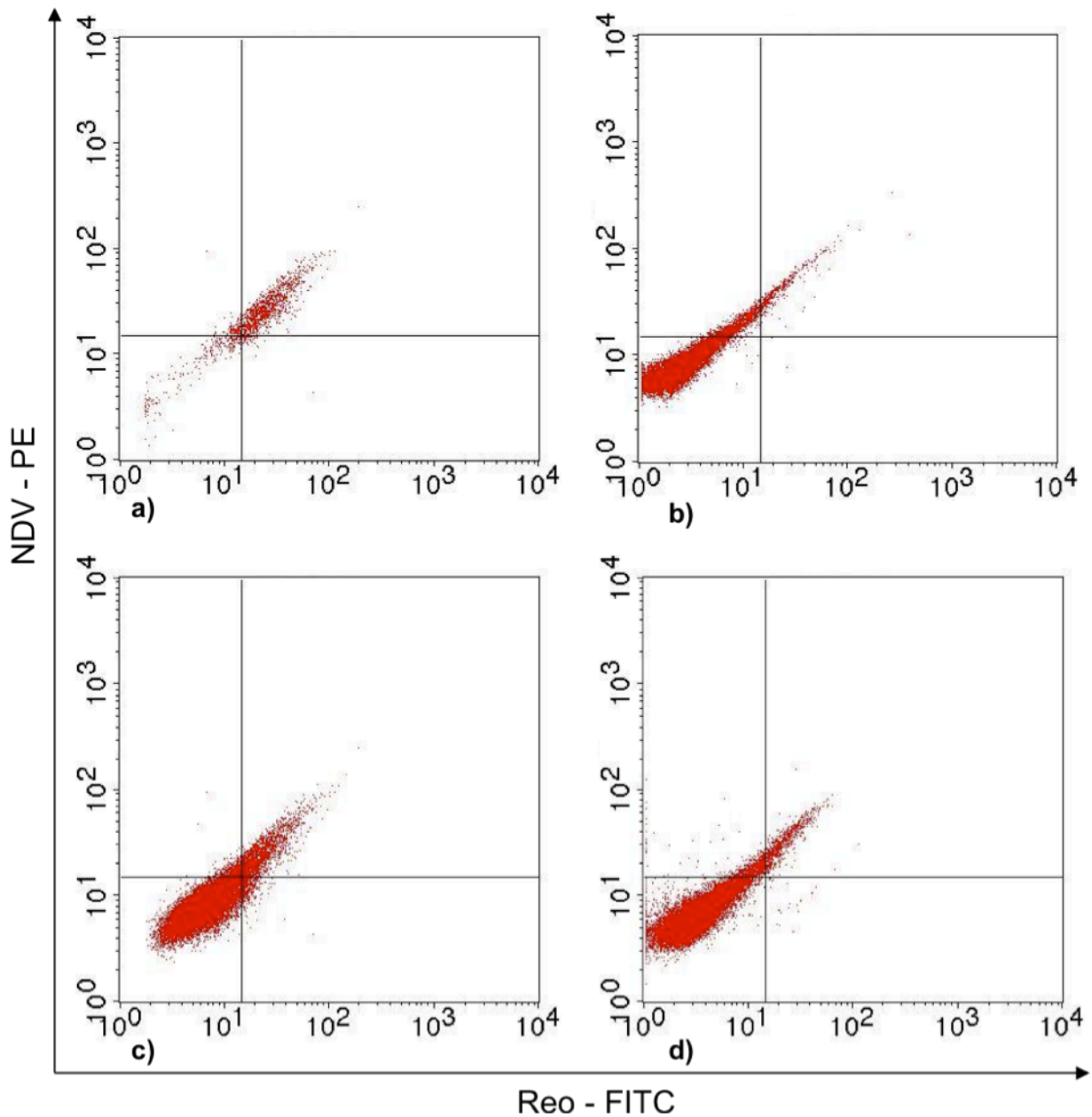


Abb. 15: Darstellung der Messungen NDV- und Reovirus-infizierter Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie. Doppelt infizierte Zellen sind im oberen rechten Quadranten lokalisiert, nicht infizierte Zellen sind im unteren linken Quadranten dargestellt.
Tumor 53 b) Tumor 54 c) Tumor 55 d) Tumor 56

Bei der Maus 53 fiel eine besonders hohe Konzentration doppelt infizierter Tumorzellen von 71,65 % auf. Bei dieser Maus wurde gleichzeitig in der RT-PCR eine sehr hohe Viruslast von $912 \cdot 10^{12}$ Viruspartikel pro g Tumorgewebe gemessen. Dies war auch die Maus mit der geringsten relativen Tumolvolumenzunahme (s. Abb. 16).

Auch bei den anderen doppelt infizierten Tumoren war die Viruslast deutlich höher als bei den mono-infizierten Tumoren. Die Viruskonzentration von NDV war in den doppelt infizierten Tumoren ca. 300 mal höher als in den mono-infizierten Tumoren (s. Tab 4).

Die Konzentration von Reovirus in den doppelt infizierten Tumoren war im Mittel sogar 2.000.000 mal höher als in den mono-infizierten Tumoren (siehe Tab. 4).

Im Mittel wurden in den doppelt infizierten Tumoren $6,39 \cdot 10^{14}$ Reoviruspartikel und $2,388 \cdot 10^{14}$ NDV-Partikel pro g Tumorgewebe gemessen (s. Tab. 4).

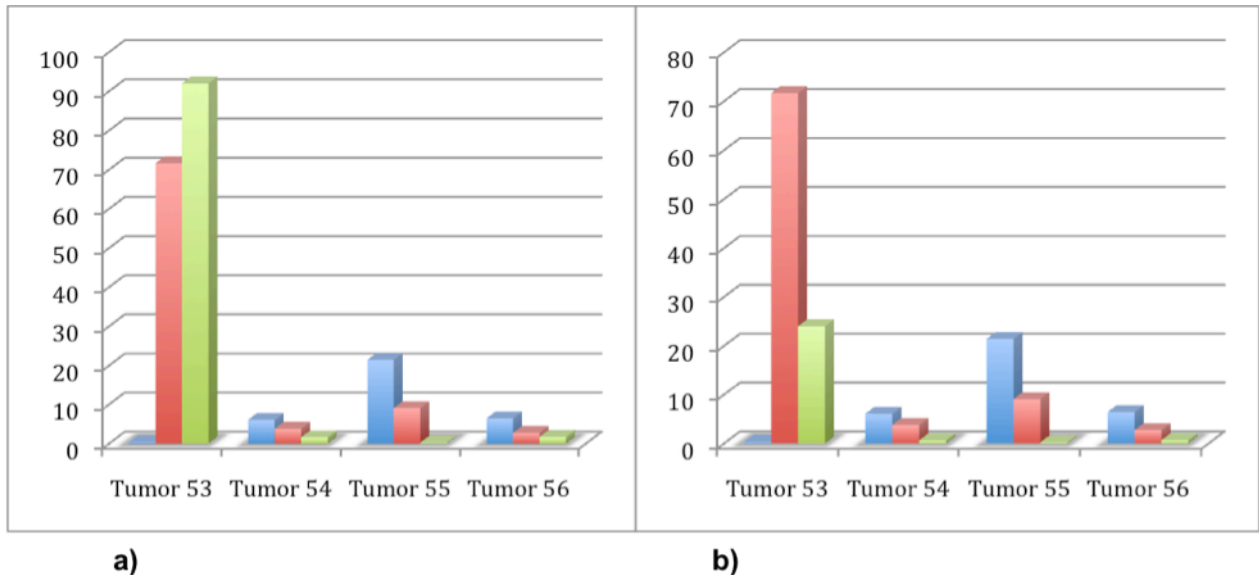


Abb. 16: gemeinsame Darstellung der Tumorzellenentwicklung, der intratumoralen Viruslast und dem Anteil infizierter Tumorzellen von NMRI-Mäusen, nach intratumoraler Applikation von NDV und Reovirus in Kombination.

a) Messungen für NDV b) Messungen für Reovirus

Blauer Balken: relatives Tumorzellvolumen in % * 0,01 des Tumorausgangsvolumens

Roter Balken: Anteil virusinfizierter Zellen in % (nur mit Reovirus und NDV doppeltinfizierte Tumorzellen)

Grüner Balken: Viruslast in Viruspartikel / 10^{-4} ng Tumor für NDV, Viruslast in Viruspartikel pro 10^{-5} ng Tumor für Reovirus

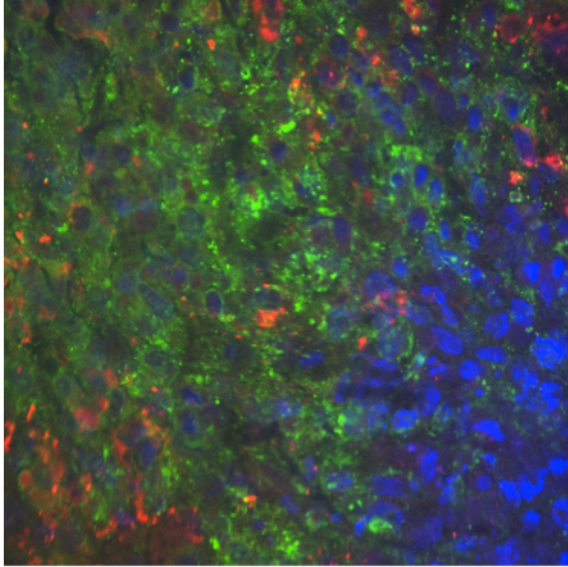
In Abb. 16 fällt besonders der Tumor 53 auf, der ein sehr kleines relatives Tumorzellvolumen bei gleichzeitig sehr hohen Virusinfektionsraten hatte. Hier waren sowohl die Konzentrationen von Reovirus als auch von NDV im Tumorgewebe sehr hoch. Auch die Zahl virusinfizierter Zellen war um ein vielfaches höher als bei den anderen doppelt infizierten Tumoren, 71,6 % der Tumorzellen waren mit beiden Viren infiziert.

Tumor 55, der die größte relative Volumenzunahme hatte, hatte gleichzeitig die niedrigste Viruslast. Insgesamt fällt auf, dass die Viruslast in den relativ groß gewordenen Tumoren eher niedrig ist, in den kleiner gebliebenen Tumoren ist sie eher hoch.

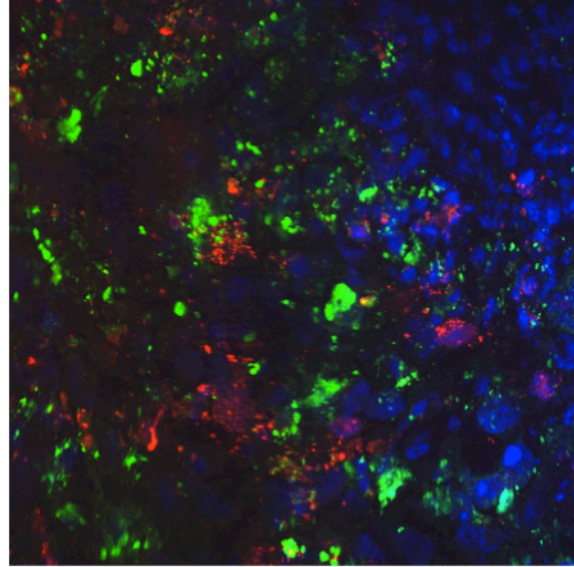
Der in der FACS-Analyse gemessene Anteil infizierter Zellen und die in der PCR gemessene Viruskonzentration scheinen nicht direkt miteinander zu korrelieren.

Um die histologische Verteilung virusinfizierter Zellen in den Tumoren festzustellen, die mit der Viruskombination therapiert worden waren, wurden Gefrierschnitte des Tumorgewebes mit Immunfluoreszenzfärbung hergestellt und mikroskopisch analysiert (s. Abb. 17). In allen

Tumorpräparaten wurden doppelt infizierte Zellen gefunden. Viele Tumorzellen waren aber auch entweder nur mit NDV oder nur mit Reovirus infiziert. Auch in diesen Präparaten wurden wieder clusterartige Anhäufungen virusinfizierter Zellen gefunden. Dazwischen fanden sich viele nicht infizierte Tumorzellen.



a)



b)

Abb. 17: Immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Mäuse 53 und 54 nach intratumoraler Applikation von NDV und Reovirus. NDV wurde mit PE-gekoppelten Zweitantikörpern, die rot erscheinen, markiert. FITC-gekoppelte Anti-Reovirus-Antikörper erscheinen grün. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI ist blau.
a) Maustumor 53 b) Maustumor 54

NDV - Monoinfektion	Viruspartikel/g Tumorgewebe	Anteil virusinfizierter Tumorzellen an der Gesamtzellzahl in %	relatives Tumorendvolumen in % vom Tumorausgangsvolumen
Tumor 49 - NDV	25,2*10 ¹⁰	6,7	4154
Tumor 50 - NDV	179*10 ¹⁰	5,2	452
Tumor 52 - NDV	6,3*10 ¹⁰	10,6	749
Mittelwert - NDV	70,1667*10 ¹⁰	7,5	1785
NDV - Doppeltinfektion			
Tumor 53 - NDV	920*10 ¹²	71,6	40
Tumor 54 - NDV	16*10 ¹²	3,8	607
Tumor 55 - NDV	2,4*10 ¹²	9,1	2142
Tumor 56 - NDV	17*10 ¹²	2,7	643
Mittelwert - NDV	238,85*10 ¹²	21,8	858
Reovirus - Doppeltinfektion			
Tumor 53 - Reovirus	240*10 ¹³	71,6	40
Tumor 54 - Reovirus	6,4*10 ¹³	3,8	608
Tumor 55 - Reovirus	2,4*10 ¹³	9,1	2143
Tumor 56 - Reovirus	6,8*10 ¹³	2,7	644
Mittelwert Reovirus	63,9*10 ¹³	21,8	859
Reo - Monoinfektion			
Tumor 45- Reovirus	12*10 ⁷	6,3	3606
Tumor 46 - Reovirus	7*10 ⁷	3,5	4218
Tumor 47 - Reovirus	2,3*10 ⁷	2,2	9749
Tumor 48 - Reovirus	30*10 ⁷	5,6	1597
Mittelwert - Reovirus	12,825*10 ⁷	4,4	4792

Tab. 4: Darstellung der Viruslast in Viruspartikel pro g Gewebe, des prozentualen Anteils virusinfizierter Zellen und des relativen Tumorendvolumens aller mit Viren behandelten Maustumoren sowie der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen

4.3 Virusinfektion der Organe

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, zu erforschen, ob die Viren sich systemisch in den Organen verbreiten, nachdem sie intratumoral appliziert wurden.

Dazu wurden den toten Mäusen Leber, Gehirn, Herz, Milz und Lungen entnommen. Außerdem wurde den Mäusen zu 3 Zeitpunkten Blut entnommen, das nach Virusmaterial untersucht wurde.

Im Blutserum war zu keinem Zeitpunkt Virusmaterial nachweisbar.

4.4 Systemische Wirkung der Viren nach intratumoraler Applikation

Aus den Beobachtungen der Mäuse konnte keine durch die Viren hervorgerufene Krankheitssymptomatik oder Nebenwirkungen festgestellt werden. Ihr Aktivitätsniveau blieb über den Versuchszeitraum unverändert. Auch an der gefressenen Futtermenge gab es keine Auffälligkeiten. Die einzige feststellbare Symptomatik war eine Gehbehinderung gegen Ende des Versuchs, die auf die Größe und Infiltration des Tumors in der Flanke zurückgeführt werden kann.

4.5 PCR-Analyse der Organe

Das Infektionsmuster der Organe für die beiden Viren war unterschiedlich. NDV allein appliziert konnte nur in der Leber nachgewiesen werden. Reovirus hingegen wurde sowohl in der Leber, als auch im Gehirn und im Herz gefunden. Dabei war die gemessene Viruskonzentration in der Leber am höchsten, im Herz am zweithöchsten und am geringsten im Gehirn.

4.5.1 PCR-Analyse der Organe nach intratumoraler Applikation von NDV

In der PCR-Analyse der Mausorgane der Tiere, die nur NDV intratumoral appliziert bekommen hatten, konnte das Virus nur im Lebergewebe nachgewiesen werden. In keinem der anderen Organe wurde Virusmaterial gefunden.

NDV wurde im Lebergewebe von 6 der 8 Mäusen, die mit NDV therapiert worden waren, nachgewiesen. In der Leber dieser Tiere wurde eine mittlere Viruskonzentration von $59,2 \cdot 10^7$ Viruspartikel pro g Gewebe gemessen.

Bei den Mäusen, die mit beiden Viren in Kombination behandelt wurden, war die durchschnittliche Viruskonzentration im Gewebe um ca. das 10-fache niedriger (s. Abb.18), sie betrug $5,3 \cdot 10^7$ Viruspartikel pro g Gewebe.

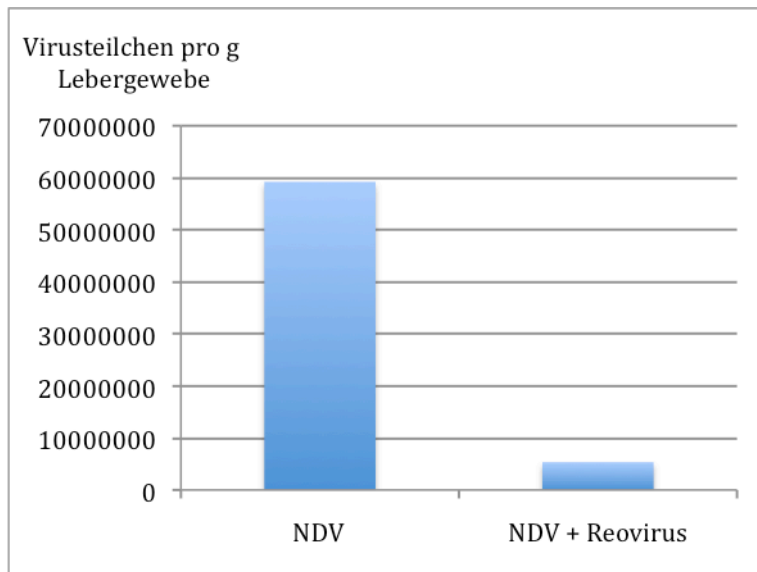


Abb. 18: Vergleich der durchschnittlichen Viruskonzentration in der Mausleber nach intratumoraler Applikation von NDV in Virusteilchen pro g Gewebe

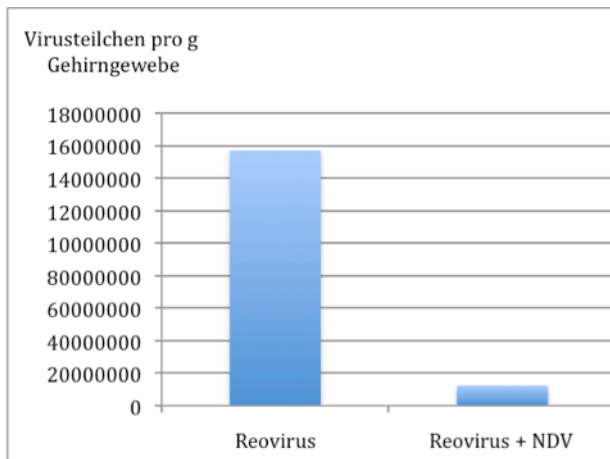
4.5.2 PCR-Analyse der Organe der nach intratumoraler Applikation von Reoviren

Bei den Mäusen, die intratumoral Reovirus appliziert bekommen hatten, wurde in der Leber, im Gehirn und im Herz Reovirus nachgewiesen.

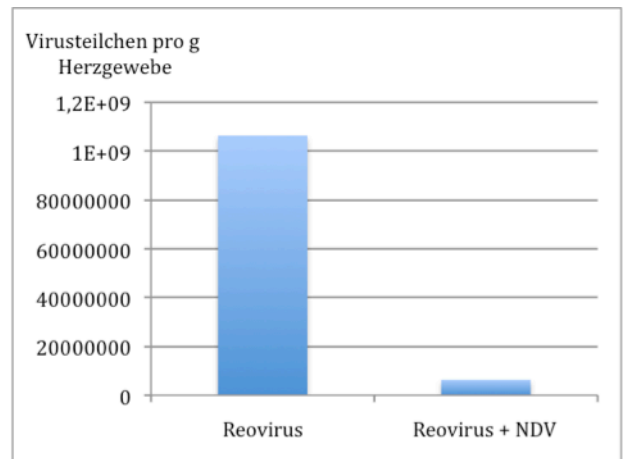
Diese Organe waren bei jeder Maus dieser Gruppe infiziert.

Bei den Mäusen, die nur mit Reovirus therapiert worden waren, fand sich im Gehirn eine mittlere Konzentration von Viruspartikeln von $15,7 \cdot 10^7$ pro g Gewebe. In der Leber wurde eine mittlere Konzentration von $10,3 \cdot 10^9$ Viruspartikeln pro g Gewebe gemessen. Im Herz waren im Mittel $10,6 \cdot 10^8$ Viruspartikel pro g Gewebe (s. Abb. 19).

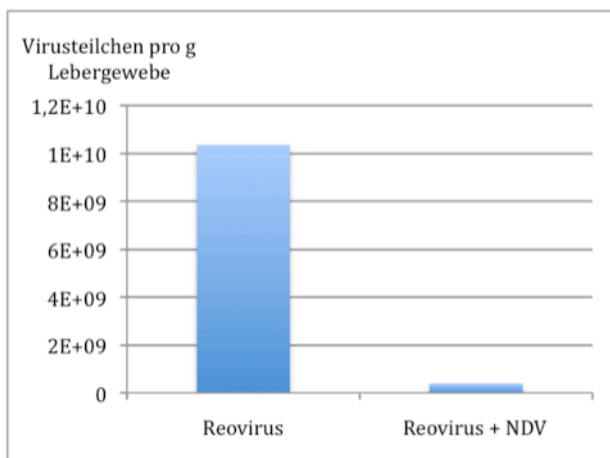
Die Konzentrationen in den Mäusen, die mit beiden Viren behandelt worden waren, waren in den jeweiligen Organen um ungefähr eine Zehnerpotenz niedriger (s. Abb. 19). Im Gehirn war dort eine mittlere Viruskonzentration von $12,4 \cdot 10^6$ Reoviruspartikeln pro g Gewebe, im Herz $63,1 \cdot 10^6$ Reoviren pro g Gewebe und in der Leber $38,6 \cdot 10^7$ Reoviren pro g Gewebe.



a)



b)



c)

Abb. 19: Vergleich der Viruskonzentration in den Mausorganen nach intratumoraler Applikation von Reovirus und Reovirus + NDV in Virusteilchen pro g Gewebe.

a) Gehirngewebe b) Herzgewebe c) Lebergewebe

4.5.3 Vergleich der Viruskonzentrationen in den Organen und den Tumoren

Die Konzentration von NDV in den monotherapierten Mäusen in der Leber war ca. 1000 mal geringer als in den Tumoren.

Die gemessene Viruskonzentration von NDV in der Leber war erstaunlicherweise in den mit beiden Viren therapierten Mäusen um ein 10-faches geringer als in den nur mit NDV therapierten Mäusen.

Im Vergleich zu den Viruskonzentrationen in den doppelt infizierten Tumoren wurden bei diesen Mäusen um 4.000.000 geringere Viruskonzentrationen in der Leber erreicht.

Reovirus wurde wie oben schon beschrieben in der Leber, im Herz und im Gehirn gefunden.

In den nur mit Reovirus therapierten Mäusen wurden in den Organen höhere

Viruskonzentrationen gemessen, als in den Tumoren.

Im Gehirn war die Konzentration von Reovirus nur wenig höher als im Tumor. Im Herz der mit Reovirus behandelten Mäuse war die Konzentration an Reovirus ca. 10 mal höher, als in den Tumoren. In der Leber wurden ca. 100 mal höhere Viruskonzentrationen im Vergleich zu der Konzentration in den Tumoren gemessen.

4.5.4 PCR-Analyse der Organe der mit NDV und Reoviren therapierten Mäuse

In den mit beiden Viren therapierten Mäusen war das Befallsmuster gleich wie das der einzelnen Viren, Reovirus wurde in Leber, Gehirn und Herz gefunden, NDV nur wurde in der Leber nachgewiesen. Allerdings wurden hier viel geringere Viruskonzentrationen in den Organen gemessen.

Die Konzentrationen von Reovirus im Gehirn waren ca. 4.000.000 mal geringer, im Herz ca. 10.000.000 mal geringer und in der Leber ca. 1.500.000 mal geringer als im Tumor.

Auch in den mit Reovirus infizierten Mäusen war die Viruskonzentration in den Organen der Mäuse, die beide Viren appliziert bekommen hatten, geringer. In der Leber war die Viruskonzentration um ca. das 40-fache niedriger, im Gehirn um ca. das 10-fache und im Herz um das ca. 30-fache.

4.6 FACS-Analyse der Organe

Eine FACS-Analyse wurde von folgenden Organen durchgeführt: Tumor, Leber und Gehirn. Die FACS-Analyse der Organe der Mäuse, die mit der Viruskombination therapiert worden waren, hat nicht funktioniert, es liegen daher nur Daten zu den Organen der monoinfizierten Mäuse vor.

4.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit NDV therapierten Mäuse

In der FACS-Analyse der Mäuse, die NDV intratumoral appliziert bekommen hatten, wurden nur in der Leber NDV-infizierte Zellen gemessen. Nur sehr wenige Leberzellen waren virusinfiziert, im Mittel 1,69 %.

4.6.2 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit Reoviren therapierten Mäuse

Bei den mit Reovirus therapierten Mäusen wurden in der FACS-Analyse sowohl im Gehirn als auch in der Leber infizierte Zellen nachgewiesen. Die Infektionsrate war allerdings sehr gering, vor allem im Gehirn wurden kaum infizierte Zellen nachgewiesen. Im Gehirn betrug

die mittlere Infektionsrate 0,98 %. In der Leber waren durchschnittlich 2, 58 % der Zellen infiziert.

4.6.3 Durchflusszytometrische Analyse der Organe der mit einer Kombination aus NDV und Reoviren therapierten Mäuse

Bei den Organen der Mäuse, die mit beiden Viren therapiert worden waren, erbrachte die durchflusszytometrische Analyse leider keine Ergebnisse.

4.7 Gewebsschnitte der Organe

Die Auswertung der gefärbten Kryoschnitte der einzelnen Organe bestätigt im Großen und Ganzen die vorher in der PCR und der FACS-Analyse erhaltenen Ergebnisse. Die Gewebsschnitte der doppelt infizierten Leber, Milz, Herz und Lunge waren leider nicht beurteilbar.

4.7.1 Gewebsschnitte der Organe der mit NDV infizierten Mäuse

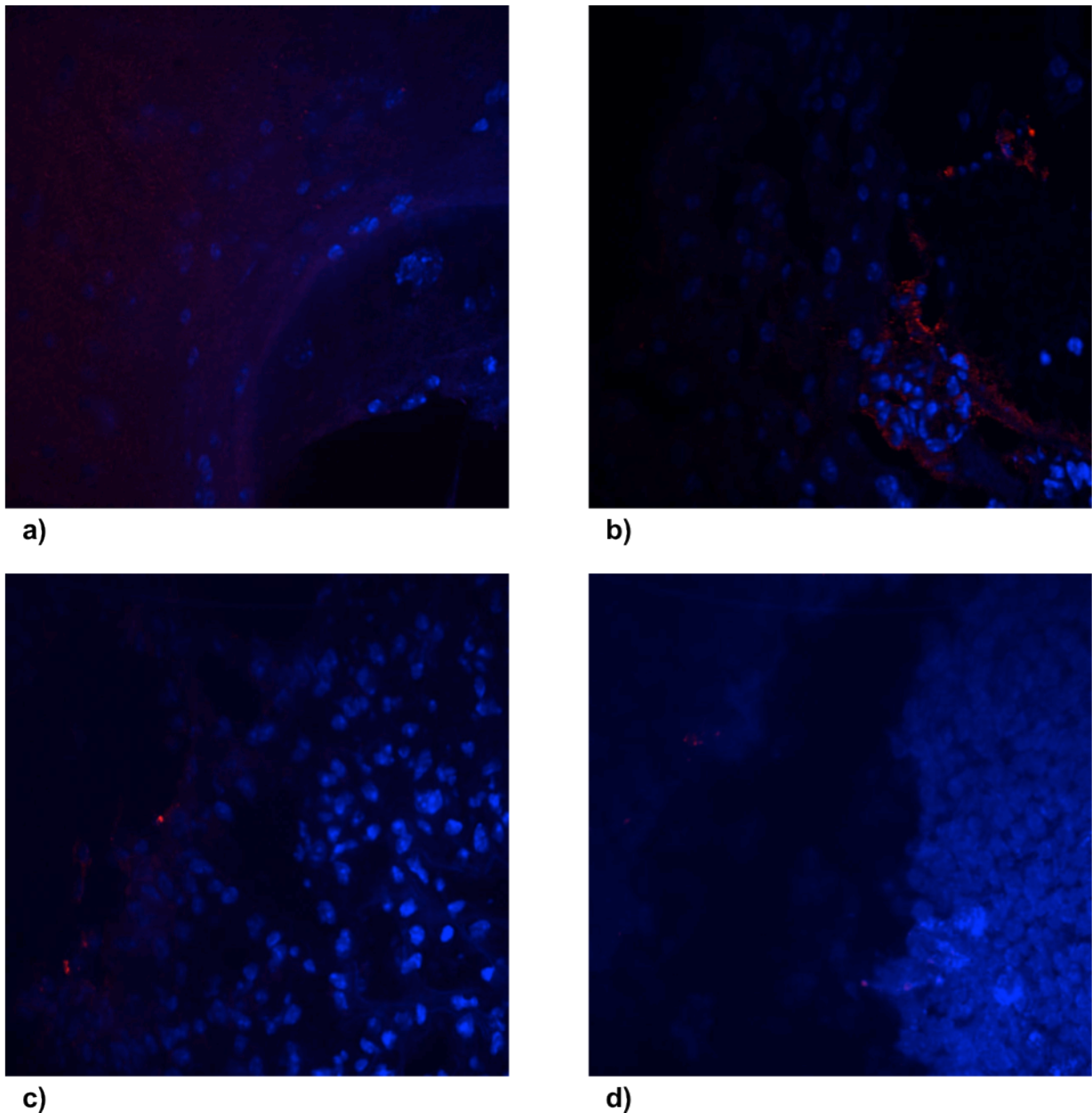


Abb. 20: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Organe der mit NDV therapierten Mäuse. NDV wurde mit PE-gekoppelten Zweitantikörpern, die rot erscheinen, markiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI ist blau.

a) Gehirn b) Leber c) Lunge d) Milz

Von den Gewebsschnitten der Organe der Mäuse, die nur mit NDV therapiert worden waren, konnten nur in 2 Leberpräparaten, den Präparaten der Mäuse 51 und 52 wenige infizierte Zellen gefunden werden. In den Präparaten von Gehirn, Lunge und Milz konnten keine Viren nachgewiesen werden.

Abb. 20 zeigt Präparate der jeweiligen Organe. Im Gewebsschnitt a) ist ein Ausschnitt eines Gehirns einer mit NDV therapierten Maus dargestellt. Im Gehirn konnte NDV nicht sicher

nachgewiesen werden, bei den roten Pünktchen im Gewebsschnitt handelt es sich wahrscheinlich um Hintergrundstrahlung.

Bei Gewebsschnitt b) handelt es sich um einen Ausschnitt eines Leberpräparats einer mit NDV therapierten Maus. Vor allem in der rechten Hälfte des Präparats sieht man NDV als rote Pünktchen im Zytoplasma der Leberzellen. Insgesamt wurden nur wenige infizierte Zellen in den Leberpräparaten der mit NDV therapierten Mäuse gefunden, wobei nur in 2 der 3 Leberpräparate überhaupt Viren gefunden wurden (Leber 49 war negativ, Leber 51 und 52 waren positiv).

Präparat c) zeigt einen Ausschnitt eines Lungenpräparats. In keinem der Lungengewebsschnitte konnte NDV nachgewiesen werden.

Auch die Milz-Präparate (siehe d)) waren alle negativ.

4.7.2 Gewebsschnitte der Organe der mit Reoviren therapierten Mäuse

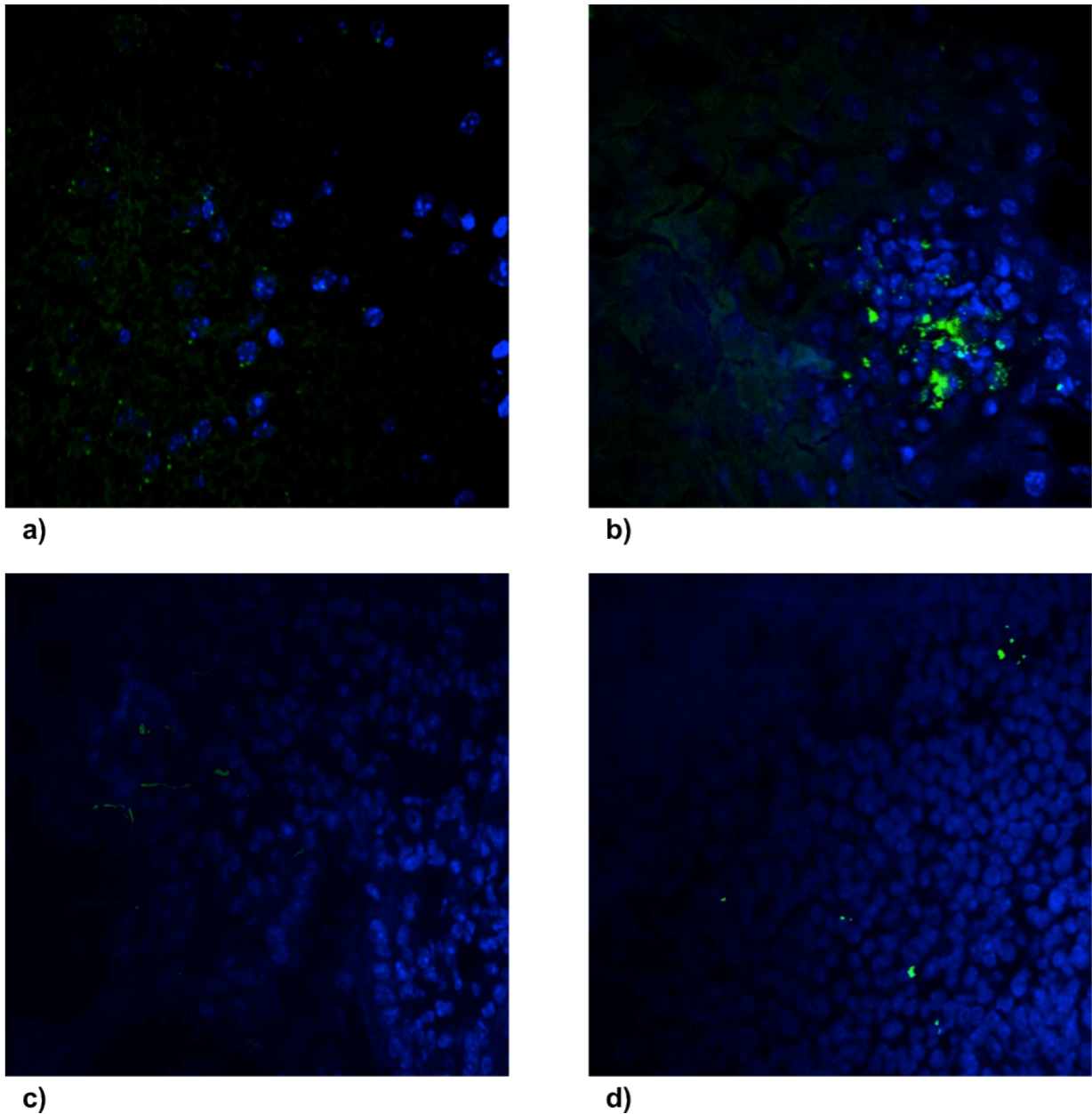


Abb. 21: Immunfluoreszenzhistologisch gefärbte Gefrierschnitte der Organe der mit Reovirus therapierten Mäuse. Reovirus wurde mit FITC-gekoppelte Anti-Reovirus-Antikörpern markiert, die grün erscheinen. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI ist blau.
a) Gehirn b) Leber c) Lunge d) Milz

Abb. 21 zeigt Ausschnitte der Organ-Gewebsschnitte der Mäuse, die nur mit Reovirus therapiert worden waren. Sowohl in Gewebsschnitten der Leber als auch des Gehirns wurden Reovirus-infizierte Zellen gefunden.

Alle Gehirnrpräparate waren Reovirus-positiv. Allerdings waren insgesamt nur wenige der Gehirnzellen mit Reovirus infiziert. Abb. 21 a) zeigt einen Ausschnitt eines Gehirnrpräparats, in dem vor allem links virusinfizierte Zellen zu sehen sind.

In allen Leberpräparaten der mit Reovirus infizierten Zellen wurden virusinfizierte Zellen gefunden. Nur wenige, vereinzelte Zellen waren infiziert (s. Abb. 21 b))

Reovirus-infizierte Zellen konnte in keinem der Lungengewebsschnitte nachgewiesen werden (s. Abb. 21 c)) In den Lungenpräparaten der mit Reovirus therapierten Mäuse wurden keine mit Reovirus infizierten Zellen gefunden.

Auch sämtliche Milz-Präparate der mit Reovirus therapierten Mäuse waren negativ (s. Abb 21 d)).

4.7.3 Gewebeschnitte der Organe der mit beiden Viren infizierten Mäuse

Die Gewebsschnitte der Organe der mit beiden Viren infizierten Organe waren leider nicht beurteilbar.

4.8 Untersuchung der Serumproben der Mäuse auf Anti-Virus-Antikörper

In keiner Serumprobe wurden Anti-Virus-Antikörper gefunden.

Alle Serumproben waren negativ.

Kapitel 5 Diskussion

5.1 Die Kombination von onkolytischen Viren mit anderen antitumoralen

Therapiemethoden

In vielen klinischen Studien konnten bereits gute onkolytische Wirkungen durch viele Viren erzielt werden. Allerdings führte eine Monotherapie mit onkolytischen Viren selten zu einer kompletten Tumorregression.

Um eine bessere antitumorale Wirkung zu erzielen, wurden onkolytische Viren mit anderen Krebstherapien wie Chemotherapie und Bestrahlung kombiniert.

Bei diesen Versuchen erhofft man sich insbesondere einen Synergismus zwischen den Viren und der kombinierten Therapie.

In einer In-vitro-Studie konnten Shikuzo Sei et. al. einen synergistischen Effekt von Reovirus T3D mit verschiedenen Chemotherapeutika auf Zellen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachweisen. Besonders wirksam war das Virus in Kombination mit Taxanen [79].

In einem anderen Versuch wurde das Reovirus (T3D) in Kombination mit Bestrahlung in vitro an verschiedensten Arten von Tumorzellen und in vivo im Mausversuch getestet. Auch in diesen Versuchen konnte eine synergistische Wirkung des Virus in der kombinierten

Therapie beobachtet werden [95].

Die onkolytische Potenz von NDV wurde ebenfalls in Kombination mit Bestrahlung untersucht. Hierzu wurde der NDV-Stamm LaSota Mäusen mit SCC (squamous cell carcinoma) intraperitoneal appliziert. Wurde das Virus nach einer neoadjuvanten Bestrahlung appliziert, so kam es zu einer bis zum Versuchsende (31 Tage später) anhaltenden Tumorregression. Wurde hingegen nur eine der beiden Therapien durchgeführt, konnte keine anhaltende Tumorregression erreicht werden [15].

In vitro wurde die onkolytische Wirksamkeit von NDV in Kombination mit Retinsäure auf Neuroblastomzellen erforscht. Auf die kombinierte Therapie reagierten die Neuroblastomzellen um das Achtfache sensibler als auf die Monotherapie mit NDV [70].

5.2 Die Kombination mehrerer onkolytischer Viren miteinander

Aufgrund zahlreicher, vielversprechender Studienergebnisse über die onkolytische Wirksamkeit von NDV und Reoviren entstand in der Arbeitsgruppe Graf an der Universitätsklinik des Saarlandes die Idee, diese Viren miteinander zu kombinieren und zu erforschen, ob dadurch bessere onkolytische Wirkungen auf humane Glioblastomzellen erzielt werden können. In vitro wurden bei der Kombination der Viren signifikant bessere onkolytische Wirkungen auf humane Glioblastomzellen als bei der Monotherapie mit den einzelnen Viren nachgewiesen (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Die Viren schienen sich im Hinblick auf ihre onkolytische Potenz synergistisch zu verhalten. Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit in vivo am Mausmodell bestätigt werden.

5.3 Die Bedeutung dieses Versuchs im Hinblick auf die onkolytische Wirksamkeit von Reoviren und NDV in Kombination auf Glioblastome

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der onkolytischen Wirkung einer Kombinationstherapie aus Reoviren und NDV im Mausversuch nach intratumoraler Applikation in subkutane humane Glioblastomtumoren. Es sollte gezeigt werden, ob die Viren im soliden Tumor onkolytische Wirkungen entfalten können. Insbesondere sollte nachgewiesen werden, ob die Viren, wenn sie in Kombination gegeben werden, eine stärkere onkolytische Wirkung entfalten, als wenn sie als Monotherapie appliziert werden. Auch ob die Viren in kombinierter Applikation die Infektionsrate im Tumor verändern, sollte erforscht werden.

Außerdem war es wichtig zu erfahren, ob sich die Viren nach lokaler, intratumoraler Applikation systemisch auszubreiten und andere Organe infizieren. Die Wirkung der Viren

auf die jeweils befallenen Mausorgane sollte erforscht werden, um eventuelle Nebenwirkungen der onkolytischen Therapie mit Viren zu erfahren.

Grundlage für diese Tierversuche waren die Arbeiten der AG Graf, bei denen in vitro eine signifikant bessere onkolytische Wirkung der Kombination aus NDV und Reoviren an humanen Glioblastomzellen im Vergleich zur Monotherapie mit den Viren nachgewiesen wurde.

In den vorliegenden Versuchen wurde leider bei keinem der Tumoren eine vollständige und anhaltende Tumorregression erreicht. Alle Tumore, sowohl die, die mit den einzelnen Viren behandelt worden waren, als auch die Tumore, die eine Viruskombination appliziert bekommen hatten, zeigten eine Tumorprogression. Die erhoffte Wirkung, dass die Tumoren durch die Viren vollständig zerstört werden würden, trat leider nicht ein.

Trotzdem beeinflussten die Viren das Tumorwachstum entscheidend. Die Tumoren, in denen die höchste Viruslast gemessen wurde, zeigten gleichzeitig die kleinste Tumolvolumenzunahme, egal, ob eine Monotherapie oder eine Kombinationstherapie der Viren appliziert worden war (siehe Tumor 45, 48, 50, 53).

5.3.1 Die onkolytische Wirksamkeit von NDV auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch

NDV zeigte in diesem Mausversuch eine gute onkolytische Wirksamkeit auf Glioblastome. Die Mäuse, die nur mit NDV therapiert worden waren, zeigten eine geringere relative Tumolvolumenzunahme als die Mäuse der Kontrollgruppe. Besonders der Tumor von Maus 50 blieb klein und bildete sich zeitweise sogar so weit zurück, dass er makroskopisch nicht messbar war (s. Abb.10). In diesem Tumor wurde gleichzeitig eine sehr hohe NDV-Viruslast gemessen (s. Tabelle 4; Abb. 12).

In den Tumoren 49 und 52 war die Viruskonzentration zu niedrig, um eine ausreichend hohe Infektionsrate für eine effiziente onkolytische Wirkung zu erreichen und um eine Tumorregression zu bewirken. Im Rahmen eines mathematischen Modells über die Tumorthherapie mit onkolytischen Viren wurde in diesem Zusammenhang errechnet, dass onkolytische Viren wirkungslos bleiben, wenn die Infektionsrate niedriger ist als die Todesrate der durch die Virusinfektion getöteten Zellen. In diesem Fall sterben infizierte Tumorzellen, ohne dass die Viren ausreichend Zeit haben, andere Tumorzellen zu infizieren. Sowohl in Tumor 49 als auch in Tumor 52 wurden im Vergleich zu Tumor 50 nur sehr niedrige Viruslasten gemessen (Abb. 12, Tabelle 4). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass NDV

in höheren Konzentrationen wirksam ist. So hohe Viruskonzentrationen wurden in diesen Tumoren allerdings nicht erreicht.

Alle Tumoren waren sehr kompakt, sodass sich die Virusinjektion sehr schwierig gestaltete und das Virus fast ausschließlich in die Mitte des Tumors appliziert werden konnte. Die Viren konnten so nur die unmittelbar an die Injektionsstelle angrenzenden Zellen befallen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der immunhistologischen Gefrierschnitte. Hier wurden nur wenige virusinfizierte Tumorzellanhäufungen über die Gewebepräparate verteilt gefunden. Diese virusinfizierten Bereiche waren wahrscheinlich die Zellen in unmittelbarer Nähe von der Injektionsstelle. Ein mathematisches Modell [104] zeigt, dass onkolytische Viren diffus über den Tumor verbreitet appliziert werden sollten, um sich schneller ausbreiten zu können als die Tumorzellen. Es sollte vermieden werden, die Viren nur ins Zentrum oder nur in die Peripherie des Tumors zu applizieren. In der vorliegenden Versuchsreihe war das aufgrund der hohen Dichte der Tumoren nicht möglich. Eine diffus über den Tumor verteilte Applikation des Virus wird sicherlich auch ein problematischer Faktor in späteren klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren werden, insbesondere bei Patienten mit Hirntumoren.

In diesem Versuch wurde ein nicht replikationsfähiges NDV eingesetzt, sodass sich das Virus nicht vermehren konnte, um auf diese Weise weiter peripher liegende Zellen zu befallen. Dies ist ein weiterer Grund für die Tumorprogression.

In der mit NDV behandelten Versuchsgruppe hatte eine Maus, Maus 51, zu keinem Zeitpunkt einen sichtbaren Tumor entwickelt. Trotzdem wurden bei ihr die Virusapplikationen an der Stelle durchgeführt, an der der Tumor hätte wachsen müssen. Möglicherweise war bei ihr der Tumor nicht angewachsen. Es könnte aber auch sein, dass der Tumor bei der ersten Virusapplikation sehr klein war. In diesem Fall hätte eine zur Tumorgöße relativ hohe Viruskonzentration auf die Tumorzellen eingewirkt. In einem solch kleinen, nur aus wenigen Tumorzellen bestehender Tumor könnte NDV in der Lage sein, alle Tumorzellen zu erreichen, zu infizieren und zu zerstören.

5.3.2 Die onkolytische Wirksamkeit von Reoviren auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch

Die Wirkung von Reoviren in der Monotherapie in diesem Versuch war unbefriedigend. Die Tumoren, die nur mit Reoviren behandelt worden waren, erreichten die höchste prozentuale Tumolvolumenzunahme aller Gruppen. Obwohl in den Versuchen Reoviruskonzentrationen appliziert worden waren, die standardmäßig in Versuchen eingesetzt worden waren [98], bei

denen eine Tumorregression erreicht worden war, war die Viruskonzentration in diesen Versuchen nicht ausreichend.

Die gemessene Viruslast war in den besonders großen Tumoren sehr niedrig. Das lässt sich damit erklären, dass die applizierte Konzentration an Reoviren zu niedrig war, um onkolytisch zu wirken. Dafür spricht auch, dass in den besonders großen Tumoren, Tumor 46 und 47, eine sehr geringe Viruslast gemessen wurde. In den beiden kleineren Tumoren, Tumor 45 und 48, wurde hingegen eine höhere Viruslast gemessen. Vor allem in Tumor 48, dem kleinsten Tumor, wurde die höchste Viruskonzentration nachgewiesen (s. Abb. 8, Tabelle 4). Auch in dieser Versuchsgruppe korreliert also eine höhere intratumorale Viruslast mit einer kleineren Tumorumfangzunahme.

Diese Ergebnisse weisen auf eine zu geringe Anfangsdosis an onkolytischen Viren hin. Auch mathematisch wurde bestätigt, dass eine zu niedrige Infektionsrate mit Viren zu keiner effizienten Tumorregression führen kann. In diesem Fall vermehren sich die Tumorzellen schneller als die Viren, so dass diese nicht schnell genug infektiöse Nachkommen bilden können, um alle Tumorzellen zu infizieren und zu zerstören. Im Vergleich zu den erfolgreichen In-vitro-Versuchen, bei denen das Virus auf einen einschichtigen Zellrasen gegeben wurde, wurde das Virus bei den In-vivo-Versuchen in kompakte Tumoren appliziert. Eine Vermehrung und Ausbreitung der Viren auf einem einschichtigen Zellrasen ist einfacher als eine Virusvermehrung durch die kompakten, vielschichtigen Strukturen eines Tumors. Schwierig gestaltete sich auch die Virusinjektion, die aufgrund der Komplexität des Tumors nur in dessen Mitte möglich war. Die Viren mussten sich von dort aus über den ganzen Tumor verbreiten, um auch periphere Tumorabschnitte zu erreichen, was offensichtlich nicht geglückt ist. Dies zeigen auch die histologischen Untersuchungen, bei denen nur vereinzelt clusterartige Anhäufungen von virusbefallenen Tumorzellen gefunden worden waren. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um die Zellen, die in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle waren. Da die Tumoren auch Bindegewebe enthielten, hatten die Reoviren hier ein zusätzliches Hindernis für ihre Verbreitung.

Da in diesem Versuch keine effiziente onkolytische Wirkung des Reovirus nachgewiesen werden konnte, sollte der Versuch mit höheren Viruskonzentrationen wiederholt werden.

5.3.3 Die onkolytische Wirksamkeit einer Kombination aus NDV und Reoviren auf subkutane Glioblastome in diesem Versuch

Reoviren und NDV in Kombination waren onkolytisch gut wirksam, nachdem sie intratumoral appliziert worden waren. Die Tumoren der mit beiden Viren therapierten Mäuse

hatten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen eine geringe relative Volumenzunahme (s. Abb. 4 und Abb. 14). Die relative Tumorumfangzunahme war in den ersten Versuchstagen geringer als in allen anderen Versuchsgruppen. Bis zum Versuchsende blieb sie kleiner als die der Kontrollgruppe und die der mit dem Reovirus therapierten Versuchsgruppe. 15 Tage nach der Virusinjektion wurden einige Versuchstiere getötet, wobei von der Versuchsgruppe der mit beiden Viren therapierten Tumore nur eine Maus aufgrund der in 3.4.7 genannten Kriterien getötet werden musste. In der mit NDV allein therapierten Gruppe blieb ab diesem Zeitpunkt nur eine Maus übrig, die den Versuch bis zum Ende durchführen konnte. Diese Maus wies eine sehr geringe Tumorumfangzunahme auf, die kleiner war als die mittlere relative Tumorumfangzunahme der drei Mäuse in der Gruppe der mit beiden therapierten Viren. Somit ist der Vergleich der beiden Versuchsgruppen miteinander für die letzten Versuchstage nur eingeschränkt möglich, die Ergebnisse sollten nochmals in einer Wiederholung des Versuchs bestätigt werden.

Trotzdem deuten die Versuchsergebnisse darauf hin, dass Reoviren und NDV in Kombination appliziert eine bessere onkolytische Wirkung zeigten als die einzeln verabreichten Viren. In den Tumoren, die mit beiden Viren therapiert worden waren, wurden viel höhere Virusinfektionsraten erreicht als in den mit den einzelnen Viren therapierten Tumoren. Die Zahl der Zellen, die mit beiden Viren infiziert waren, war verglichen mit den monotherapierten Tumoren sehr hoch (ca. dreimal so viele NDV-infizierte Zellen und fünfmal so viele reovirusinfizierte Zellen im Vergleich zu den monoinfizierten Tumoren). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Viren einen synergistischen Effekt im Hinblick auf die Infektionsrate der Tumorzellen haben.

Noch eindrücklicher war der Vergleich der Viruskonzentration der mit der Kombination therapierten Tumoren zu den monotherapierten Tumoren. Die Viruskonzentration der Reoviren war in den mit der Viruskombination behandelten Tumoren ca. 2.000.000-mal höher, für NDV 300-mal höher als in den mit den einzelnen Viren therapierten Tumoren. Dies bedeutet auch, dass die virusinfizierten Tumorzellen der Tumoren, die mit der Kombination behandelt worden waren, pro Tumorzelle viel mehr Viren enthielten. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Viren im Hinblick auf die Infektion von Tumorzellen synergistisch wirksam sind.

In den Tumoren, in denen die Anzahl virusinfizierter Tumorzellen besonders hoch war, war gleichzeitig auch die Viruskonzentration besonders hoch. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Virusverbreitung über den Tumor hinweg erleichtert wird, wenn in den einzelnen Tumorzellen mehr Viren sind.

Besonders fällt dies bei Tumor 53 auf, bei dem 71,56 % der Zellen mit beiden Viren infiziert waren, gleichzeitig wurden hier extrem hohe Viruskonzentrationen erreicht, die ca. 50-100-mal höher waren als die Viruskonzentrationen in den anderen Tumoren dieser Versuchsgruppe (s. Tabelle 4).

Dieser Tumor war gleichzeitig der einzige Tumor aller Versuchsgruppen, der im Versuchsverlauf eine Tumolvolumenabnahme zeigte und beim Versuchsende nur 40 % seines Ausgangsvolumens aufwies (s. Abb. 17 und Tabelle 4). Die Entwicklung dieses Tumors zeigt, dass die Viren onkolytisch wirksam sind, dass aber in diesen Versuchen die Viruskonzentrationen nicht hoch genug waren, um die Tumoren ganz zu zerstören. Auch die anderen Tumoren dieser Versuchsgruppe zeigen wieder eine Korrelation der Tumorgröße mit der Viruskonzentration. In Tumor 55, dem Tumor mit der größten Volumenzunahme, wurden die niedrigsten Viruskonzentrationen gemessen. In Tumor 54 und 56 wurden höhere Viruskonzentrationen gemessen als in Tumor 55, gleichzeitig hatten diese Tumoren eine geringere relative Volumenzunahme. Dies zeigt nochmals, dass eine höhere Viruskonzentration eine bessere onkolytische Wirkung bedingt.

5.4 Die Wirkung von NDV und Reoviren nach intratumoraler Applikation auf verschiedene Mausorgane

Die beiden Viren zeigten Unterschiede bei der Infektion der Organe.

NDV als Monotherapie appliziert infizierte nur die Leber der Mäuse.

Das Reovirus hingegen wurde sowohl in der Leber als auch im Gehirn und im Herz gefunden.

Dabei war die gemessene Viruskonzentration in der Leber am höchsten, am zweithöchsten war die Konzentration im Herz und am geringsten war die Viruskonzentration im Gehirn.

Die hohen Viruskonzentrationen beider Viren in der Leber lassen sich eventuell damit erklären, dass die Leber das Blut im Sinne ihrer Entgiftungsfunktion von Viren gereinigt hat.

Auch in anderen Arbeiten wurde eine Infektion der hier aufgeführten Organe durch das Reovirus beschrieben. Bei Versuchen an neugeborenen Nacktmäusen löste das Reovirus nach seiner Applikation sowohl schwere Myokarditiden als auch Enzephalitiden aus [42].

In einem anderen Versuch konnte ein Wildtyp-Reovirus vom Typ 3 Dearing nach intrakranieller Infektion in C57/BL6 –Mäuse in Milz, Leber, Herz und Intestinaltrakt nachgewiesen werden [8].

Reovirus Typ 3 Dearing wurde auch nach dessen intraperitonealer Applikation in der Leber, im Gehirn, im Herz und im Intestinaltrakt von Mäusen nachgewiesen [35].

Die Konzentrationen sowohl des Reovirus als auch von NDV waren in den Mäusen niedriger, die mit der Viruskombination behandelt worden waren. Im Moment gibt es für diese Ergebnisse noch keine Erklärung. Bestätigen sich diese Ergebnisse in späteren Versuchen, so wäre eine Therapie mit der Viruskombination zu bevorzugen, da so die Infektionsrate gesunder Organe niedriger gehalten werden könnte.

Die Mäuse, die nur mit Reoviren therapiert worden waren, wiesen in den gesunden Organen höhere Viruskonzentrationen als in den Tumoren auf. Da das Virus intratumoral appliziert worden war und die Tumorzellen theoretisch für die Viren sehr gute zytogentische Voraussetzungen bieten sollten, wurde in den Tumoren eine deutlich höhere Viruskonzentration erwartet als in den Organen. Dass die Ergebnisse in diesen Versuchen gegenteilig ausfielen, ist aktuell nicht erklärbar. Um diese Ergebnisse zu bestätigen oder zu widerlegen, sollte dieser Versuch im Rahmen von späteren Arbeiten wiederholt werden.

Ein sehr positives Ergebnis war, dass die Mäuse trotz der Organinfektion durch die Viren keinerlei Krankheitssymptome zeigten. Die Viren wurden während des ganzen Versuchszeitraums gut von den Mäusen vertragen und lösten keine Nebenwirkungen aus. Allerdings besteht durchaus die Möglichkeit, dass die Viren bei längerer Versuchsdauer Krankheiten ausgelöst hätten. Eine Arbeit, in der das Reovirus vom Typ 3 Dearing SCID-Mäusen intraperitoneal appliziert wurde, zeigte schwere, durch das Virus ausgelöste Symptome. Die Tiere entwickelten im Verlauf des Versuchs eine schwere Hepatitis und starben nach 77+/- 22 Tagen [35].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche dauerten nur bis zum 20. Tag nach der Virusinjektion, also lange bevor eine Krankheit mit längerer Inkubationszeit manifest werden konnte.

5.4 Antikörpernachweis in den Serumproben

In keiner Serumprobe wurden Anti-Virus-Antikörper gefunden. Möglicherweise waren die Mäuse aufgrund ihres defekten Immunsystems nicht in der Lage dazu, Antikörper gegen Viren zu produzieren. Allerdings kann eine Anti-Virus-Antikörperbildung nicht ganz ausgeschlossen werden, da möglicherweise die Affinität von Antigenen und Antikörpern nicht ausreichend hoch war, um im Versuch eine sichtbare Reaktion auszubilden.

5.5 Zukünftige Aufgaben in der Forschung der Therapie von NDV und Reoviren in Kombination

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Kombination von NDV und Reoviren eine bessere onkolytische Wirksamkeit hat als die Gabe der einzelnen Viren. Allerdings beruhen diese Ergebnisse auf sehr kleinen Tierzahlen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sollten deswegen mit größeren Versuchsgruppen wiederholt werden, um statistische Signifikanzen nachweisen zu können.

Es wäre sinnvoll, die Versuche mit höheren Viruskonzentrationen zu wiederholen, da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die eingesetzten Viruskonzentrationen zu niedrig für eine effiziente onkolytische Wirkung waren.

Außerdem ist eine Beobachtung der Versuchstiere über längere Zeiträume hinweg wichtig, um sicher zu gehen, dass lange Inkubationszeiten und höhere Viruslasten zu keinen schwerwiegenden virusverursachten Erkrankungen führen.

Weiterhin sollte in späteren Versuchen bestätigt werden, dass eine Viruskombination tatsächlich zu niedrigeren Infektionsraten in den gesunden Mausorganen führt, und es sollte erforscht werden, was die molekularbiologischen Gründe dafür sind.

Zusätzlich ist es wichtig zu erforschen, ob das Reovirus gesunde Organe tatsächlich in hohen Raten infiziert und warum dies so ist.

Zukünftiges Ziel der Forschung mit onkolytischen Viren an Glioblastomen ist es, am Ende Glioblastom-Patienten zu behandeln und eine Therapie zu finden, die in der Lage ist, das Glioblastom erfolgreich zu heilen.

Kapitel 6 Literaturverzeichnis

1. Aghi M, Martuza RL (2005) Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene* 24:7802-7816
2. Anderson BD, Nakamura T, Russell SJ, Peng KW (2004) High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res* 64:4919-4926
3. Arrese I, Gonzalez P, Miranda P, Perez-Nunez A, Pascual B, Lobato RD (2005) [Oncolytic viral therapy of gliomas: review of the literature]. *Neurocirugia (Astur)* 16:158-168
4. Batliwalla FM, Bateman BA, Serrano D, Murray D, Macphail S, Maino VC, Ansel JC, Gregersen PK, Armstrong CA (1998) A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire. *Mol Med* 4:783-794
5. Benencia F, Courreges MC, Conejo-Garcia JR, Mohamed-Hadley A, Zhang L, Buckanovich RJ, Carroll R, Fraser N, Coukos G (2005) HSV oncolytic therapy upregulates interferon-inducible chemokines and recruits immune effector cells in ovarian cancer. *Mol Ther* 12:789-802
6. Bierman HR, Crile DM, Dod KS, Kelly KH, Petrakis NL, White LP, Shimkin MB (1953) Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer* 6:591-605
7. Bluming AZ, Ziegler JL (1971) Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 2:105-106
8. Boehme KW, Guglielmi KM, Dermody TS (2009) Reovirus nonstructural protein sigma1s is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19986-19991
9. Cassel WA, Murray DR, Phillips HS (1983) A phase II study on the postsurgical management of Stage II malignant melanoma with a Newcastle disease virus oncolysate. *Cancer* 52:856-860
10. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC (2003) Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8:237-249
11. Chiocca EA (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2:938-950
12. Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, Louis DN, Hochberg FH, Barker F, Kracher J, Grossman SA, Fisher JD, Carson K, Rosenblum M, Mikkelsen T, Olson J, Markert J, Rosenfeld S, Nabors LB, Brem S, Phuphanich S, Freeman S, Kaplan R, Zwiebel J (2004) A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther* 10:958-966
13. Clarke P, DeBiasi RL, Goody R, Hoyt CC, Richardson-Burns S, Tyler KL (2005) Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation. *Viral Immunol* 18:89-115
14. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA, Lee PW (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282:1332-1334
15. Covic D, Ivankovic S, Hirsil N, Rupcic B, Samija M, Jurin M (2006) Combined action of virus injection and local tumor irradiation on tumor growth in mice. *Coll Antropol* 30:185-189

16. Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, Csatory CM (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol* 67:83-93
17. de Ridder LI, Laerum OD, Mork SJ, Bigner DD (1987) Invasiveness of human glioma cell lines in vitro: relation to tumorigenicity in athymic mice. *Acta neuropathologica* 72:207-213
18. Deb A, Haque SJ, Mogensen T, Silverman RH, Williams BR (2001) RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway. *J Immunol* 166:6170-6180
19. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15:4215-4224
20. Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994) Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 32:2898-2903
21. Douglas JT, Kim M, Sumerel LA, Carey DE, Curiel DT (2001) Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors. *Cancer Res* 61:813-817
22. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoeediting. *Nat Immunol* 6:722-729
23. Farsetta DL, Chandran K, Nibert ML (2000) Transcriptional activities of reovirus RNA polymerase in re-coated cores. Initiation and elongation are regulated by separate mechanisms. *J Biol Chem* 275:39693-39701
24. Fishelson Z, Donin N, Zell S, Schultz S, Kirschfink M (2003) Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol Immunol* 40:109-123
25. Fisher KD, Stallwood Y, Green NK, Ulbrich K, Mautner V, Seymour LW (2001) Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther* 8:341-348
26. Flanagan AD, Love R, Tesar W (1955) Propagation of Newcastle disease virus in Ehrlich ascites cells in vitro and in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:82-86
27. Forsyth P, Roldan G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, Cairncross G, Matthews MV, Markert J, Gillespie Y, Coffey M, Thompson B, Hamilton M (2008) A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther* 16:627-632
28. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E, Irving CS, Galun E, Siegal T (2006) Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* 13:221-228
29. 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 (2000) A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 6:798-806
30. Gnant MF, Noll LA, Irvine KR, Puhlmann M, Terrill RE, Alexander HR, Jr., Bartlett DL (1999) Tumor-specific gene delivery using recombinant vaccinia virus in a rabbit model of liver metastases. *J Natl Cancer Inst* 91:1744-1750
31. Gooding LR (1994) Regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect Agents Dis* 3:106-115
32. Granoff A, Hirst GK (1954) Experimental production of combination forms of virus. IV. Mixed influenza A-Newcastle disease virus infections. *Proc Soc Exp Biol Med* 86:84-88

33. Green NK, Herbert CW, Hale SJ, Hale AB, Mautner V, Harkins R, Hermiston T, Ulbrich K, Fisher KD, Seymour LW (2004) Extended plasma circulation time and decreased toxicity of polymer-coated adenovirus. *Gene Ther* 11:1256-1263
34. Greentree LB (1983) Hodgkin's disease: therapeutic role of measles vaccine. *Am J Med* 75:928
35. Haller BL, Barkon ML, Vogler GP, Virgin HWt (1995) Genetic mapping of reovirus virulence and organ tropism in severe combined immunodeficient mice: organ-specific virulence genes. *J Virol* 69:357-364
36. Hansen RM, Libnoch JA (1978) Remission of chronic lymphocytic leukemia after smallpox vaccination. *Arch Intern Med* 138:1137-1138
37. Harrington KJ, Karapanagiotou EM, Roulstone V, Twigger KR, White CL, Vidal L, Beirne D, Prestwich R, Newbold K, Ahmed M, Thway K, Nutting CM, Coffey M, Harris D, Vile RG, Pandha HS, Debono JS, Melcher AA Two-stage phase I dose-escalation study of intratumoral reovirus type 3 dearing and palliative radiotherapy in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* 16:3067-3077
38. Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R (2004) HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther* 11:1648-1658
39. Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I, Dummer R (1998) The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9:2363-2373
40. Heyman M, Grander D, Brondum-Nielsen K, Cederblad B, Liu Y, Xu B, Einhorn S (1994) Interferon system defects in malignant T-cells. *Leukemia* 8:425-434
41. Horn FL, Gerd; Moc, Isabelle; Grillhös, Christian; Berghold, Silke; Schneider, Nadine; (2005) *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium Stuttgart*
42. Hoyt CC, Richardson-Burns SM, Goody RJ, Robinson BA, Debiassi RL, Tyler KL (2005) Nonstructural protein sigma 1s is a determinant of reovirus virulence and influences the kinetics and severity of apoptosis induction in the heart and central nervous system. *J Virol* 79:2743-2753
43. Ichikawa T, Chiocca EA (2001) Comparative analyses of transgene delivery and expression in tumors inoculated with a replication-conditional or -defective viral vector. *Cancer Res* 61:5336-5339
44. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:95-109
45. Ikeda K, Ichikawa T, Wakimoto H, Silver JS, Deisboeck TS, Finkelstein D, Harsh GRt, Louis DN, Bartus RT, Hochberg FH, Chiocca EA (1999) Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 5:881-887
46. Karev GP, Novozhilov AS, Koonin EV (2006) Mathematical modeling of tumor therapy with oncolytic viruses: effects of parametric heterogeneity on cell dynamics. *Biol Direct* 1:30
47. Karl F. Masuhr MN (2007) *Neurologie. Thieme, Stuttgart*
48. Kaufman HL, Deraffle G, Mitcham J, Moroziewicz D, Cohen SM, Hurst-Wicker KS, Cheung K, Lee DS, Divito J, Voulo M, Donovan J, Dolan K, Manson K, Panicali D, Wang E, Horig H, Marincola FM (2005) Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest* 115:1903-1912

49. Khabar KS, Al-Haj L, Al-Zoghaibi F, Marie M, Dhalla M, Polyak SJ, Williams BR (2004) Expressed gene clusters associated with cellular sensitivity and resistance towards anti-viral and anti-proliferative actions of interferon. *J Mol Biol* 342:833-846
50. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusio P, Kaye SB, Hong WK, Kim DH (2000) 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. *Nat Med* 6:879-885
51. Li Y, Yu DC, Chen Y, Amin P, Zhang H, Nguyen N, Henderson DR (2001) A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 61:6428-6436
52. Liu TC, Kim D (2007) Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions. *Cancer Res* 67:429-432
53. Loken SD, Norman K, Hirasawa K, Nodwell M, Lester WM, Demetrick DJ (2004) Morbidity in immunosuppressed (SCID/NOD) mice treated with reovirus (dearing 3) as an anti-cancer biotherapeutic. *Cancer Biol Ther* 3:734-738
54. Lorence RM, Reichard KW, Katubig BB, Reyes HM, Phuangsab A, Mitchell BR, Cascino CJ, Walter RJ, Peeples ME (1994) Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy. *J Natl Cancer Inst* 86:1228-1233
55. Lorence RM, Roberts MS, O'Neil JD, Groene WS, Miller JA, Mueller SN, Bamat MK (2007) Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Curr Cancer Drug Targets* 7:157-167
56. Maisner A, Mrkic B, Herrler G, Moll M, Billeter MA, Cattaneo R, Klenk HD (2000) Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J Gen Virol* 81:441-449
57. Marcato P, Shmulevitz M, Lee PW (2005) Connecting reovirus oncolysis and Ras signaling. *Cell Cycle* 4:556-559
58. Minuk GY, Paul RW, Lee PW (1985) The prevalence of antibodies to reovirus type 3 in adults with idiopathic cholestatic liver disease. *J Med Virol* 16:55-60
59. Mullen JT, Tanabe KK (2002) Viral oncolysis. *Oncologist* 7:106-119
60. Mundschau LJ, Faller DV (1994) Endogenous inhibitors of the dsRNA-dependent eIF-2 alpha protein kinase PKR in normal and ras-transformed cells. *Biochimie* 76:792-800
61. Nagai Y, Hamaguchi M, Toyoda T (1989) Molecular biology of Newcastle disease virus. *Prog Vet Microbiol Immunol* 5:16-64
62. Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC (2005) Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5:965-976
63. Park MS, Garcia-Sastre A, Cros JF, Basler CF, Palese P (2003) Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* 77:9522-9532
64. Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ, Markert JM (2000) Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2208-2213
65. Pasquinucci G (1971) Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet* 1:136
66. Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Sterman D, Marshall JL, Goldberg S, Gross P, O'Neil JD, Groene WS, Roberts MS, Rabin H, Bamat MK, Lorence RM (2002) Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* 20:2251-2266
67. Phillips RJ, Samson AC, Emmerson PT (1998) Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Arch Virol* 143:1993-2002

68. Raj K, Ogston P, Beard P (2001) Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* 412:914-917
69. Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, Chew KL, Hann B, Weinberg V, Schmitt LD, McCormick F (2002) Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res* 62:3812-3818
70. Reichard KW, Lorence RM, Katubig BB, Peeples ME, Reyes HM (1993) Retinoic acid enhances killing of neuroblastoma cells by Newcastle disease virus. *J Pediatr Surg* 28:1221-1225; discussion 1225-1226
71. Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Andrews J, Romel L, Hatfield M, Rubin J, Kirn D (2001) Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther* 8:1618-1626
72. Riede U-NW, Martin; Schaefer, Hans-Eckart (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie Thieme, Stuttgart*
73. Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Target Oncol* 5:161-165
74. Roberts MS, Lorence RM, Groene WS, Bamat MK (2006) Naturally oncolytic viruses. *Curr Opin Mol Ther* 8:314-321
75. Russell SJ (2002) RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther* 9:961-966
76. Sanchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Leonart ML, Martin P, Anaya A, Ramon y Cajal S (1996) Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 13:1083-1092
77. Schattner A (1984) Therapeutic role of measles vaccine in Hodgkin's disease. *Lancet* 1:171
78. Schirmacher V, Schlag P, Liebrich W, Patel BT, Stoeck M (1993) Specific immunotherapy of colorectal carcinoma with Newcastle-disease virus-modified autologous tumor cells prepared from resected liver metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 690:364-366
79. Sei S, Mussio JK, Yang QE, Nagashima K, Parchment RE, Coffey MC, Shoemaker RH, Tomaszewski JE (2009) Synergistic antitumor activity of oncolytic reovirus and chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer* 8:47
80. Selb B, Weber B (1994) A study of human reovirus IgG and IgA antibodies by ELISA and western blot. *J Virol Methods* 47:15-25
81. Shah AC, Benos D, Gillespie GY, Markert JM (2003) Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J Neurooncol* 65:203-226
82. Sinkovics JG (1991) Viral oncolysates as human tumor vaccines. *Int Rev Immunol* 7:259-287
83. Sinkovics JG, Horvath JC (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol* 16:1-15
84. Smith GL, Vanderplasschen A (1998) Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol* 440:395-414
85. Steele TA, Hauser CC (2005) The role of interferon-alpha in a successful murine tumor therapy. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:487-493
86. Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emmerson PT (1993) RNA editing in Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 74 (Pt 12):2539-2547
87. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC (2000) Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6:821-825

88. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17:3351-3362
89. Strong JE, Lee PW (1996) The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol* 70:612-616
90. Taqi AM, Abdurrahman MB, Yakubu AM, Fleming AF (1981) Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1:1112
91. Ten RM, Blank V, Le Bail O, Kourilsky P, Israel A (1993) Two factors, IRF1 and KBF1/NF-kappa B, cooperate during induction of MHC class I gene expression by interferon alpha beta or Newcastle disease virus. *C R Acad Sci III* 316:496-501
92. Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL (1999) Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 10:385-393
93. Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS (1996) The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220:152-162
94. Toyoda T, Sakaguchi T, Hirota H, Gotoh B, Kuma K, Miyata T, Nagai Y (1989) Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 169:273-282
95. Twigger K, Vidal L, White CL, De Bono JS, Bhide S, Coffey M, Thompson B, Vile RG, Heinemann L, Pandha HS, Errington F, Melcher AA, Harrington KJ (2008) Enhanced in vitro and in vivo cytotoxicity of combined reovirus and radiotherapy. *Clin Cancer Res* 14:912-923
96. Vile R, Ando D, Kirn D (2002) The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Ther* 9:1062-1067
97. Weaver BK, Ando O, Kumar KP, Reich NC (2001) Apoptosis is promoted by the dsRNA-activated factor (DRAF1) during viral infection independent of the action of interferon or p53. *FASEB J* 15:501-515
98. Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, Shi ZQ, Johnston RN, Nishikawa S, Lee PW, Forsyth PA (2001) Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst* 93:903-912
99. Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120
100. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ (1990) Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical biochemistry* 186:328-331
101. Wittwer CT, Garling DJ (1991) Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *BioTechniques* 10:76-83
102. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22:130-131, 134-138
103. Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ, Ralph SJ (1997) Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 272:28779-28785
104. Wu JT, Byrne HM, Kirn DH, Wein LM (2001) Modeling and analysis of a virus that replicates selectively in tumor cells. *Bull Math Biol* 63:731-768
105. Zorn U, Dallmann I, Grosse J, Kirchner H, Poliwoda H, Atzpodien J (1994) Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by Newcastle disease virus. *Cancer Biother* 9:225-235

106. Zulkifli MM, Ibrahim R, Ali AM, Aini I, Jaafar H, Hilda SS, Alitheen NB, Abdullah JM (2009) Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurol Res* 31:3-10

Kapitel 7 Publikation/Danksagung

Publikation

The combined effects of oncolytic reovirus plus Newcastle disease virus and reovirus plus parvovirus on U87 and U373 cells in vitro and in vivo.

Alkassar M, Gärtner B, Roemer K, Graesser F, Rommelaere J, Kaestner L, Heckel I, Graf N
Journal of Neuro-Oncology; 2011 May 24

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Norbert Graf für die Überlassung des Dissertationsthemas, die freundliche und kompetente Beratung und die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe.

Besonders möchte ich meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Muhannad Alkassar für seine Unterstützung bei dieser Arbeit danken. Er half mir beim Erlernen zahlreicher Methoden und stand mir bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite. Auch für die Durchführung der LightCycler-Messungen, der FACS-Messungen und die Anzucht der Viren möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Virologie für das freundliche Arbeitsklima und die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt den beiden medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Ruth Nord und Frau Barbara Best, die mir bei Fragen und Problemen jederzeit hilfsbereit, geduldig und aufmunternd zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Tierstalls für ihre freundliche Hilfe bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Ohne euch wäre das, was ich bisher erreicht habe, nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr mich bedingungslos unterstützt habt und dass ihr immer für mich da wart!

Kapitel 8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname	Isabell Heckel
Geburtstag und -ort:	8. April 1986 in Biberach an der Riß
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

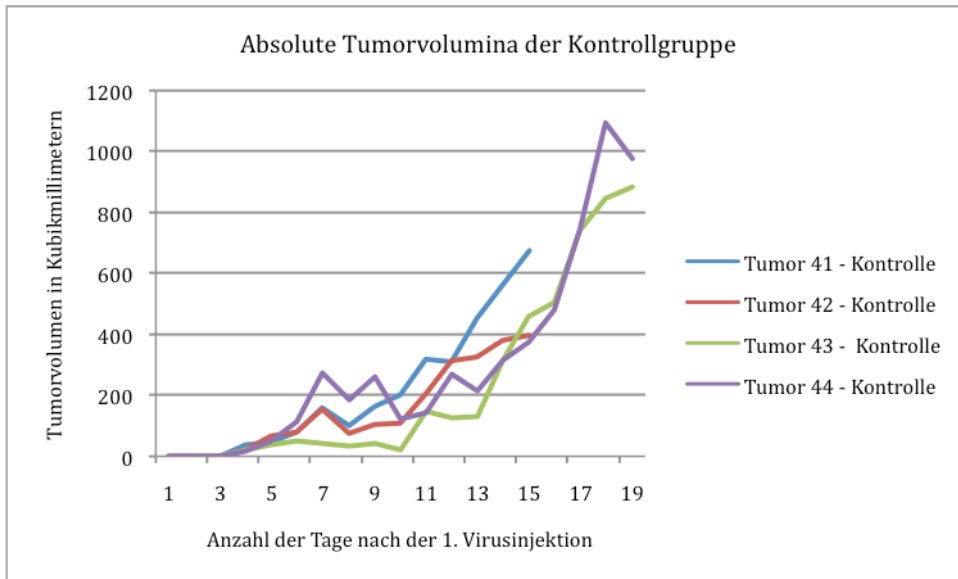
1992 – 1996	Grundschule des Bischof-Sproll-Bildungszentrums
1996 – 2005	Pestalozzi-Gymnasium

Studium

10. 2005	Beginn des Medizinstudiums an der Universität des Saarlandes
09. 2007	erste ärztliche Prüfung
10. 2007 – 02. 2008	Auslandsemester in Frankreich an der Université Louis Pasteur Strasbourg im Rahmen von ERASMUS
05. 2008	Beginn der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation an der Klinik für pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Universität des Saarlandes
08. 2010 – 12. 2010	1. Terial des Praktischen Jahres: Chirurgie am Ospedale regionale di Locarno
12. 2010 – 04. 2011	2. Terial des Praktischen Jahres: Innere Medizin am Universitätsklinikum des Saarlandes
04. 2011 – 07. 2011	3. Terial des Praktischen Jahres: Anästhesie am Universitätsklinikum des Saarlandes

Kapitel 9 Anhang

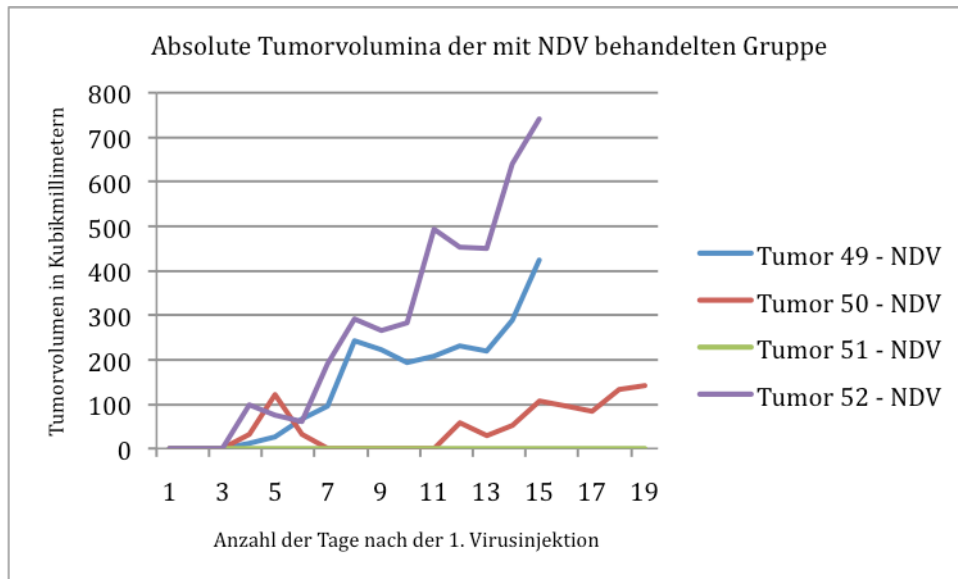
9.1 Absolute Tumorumina der Kontrollgruppe



Anzahl der Tage nach der 1. Virusinjektion	Tumor 41 - Kontrolle	Tumor 42 - Kontrolle	Tumor 43 - Kontrolle	Tumor 44 - Kontrolle
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	36	19	21	16
5	44	64	38	49
6	79	75	50	112
7	159	154	41	273
8	100	73	33	186
9	161	100	40	259
10	200	105	21	122
11	319	204	146	144
12	308	312	127	268
13	454	325	130	213
14	562	380	316	315
15	675	397	457	374
16			504	480
17			743	744
18			847	1094
19			884	975

Absolute Tumorumina der Kontrollgruppe in mm³

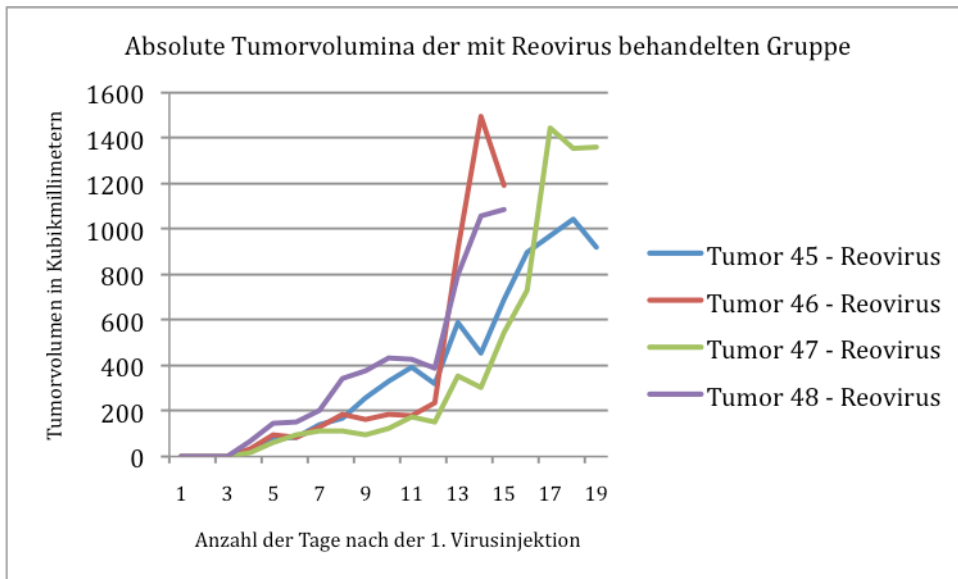
9.2 Absolute Tumorumina der mit NDV behandelten Gruppe



Anzahl der Tage nach der 1. Virusinjektion	Tumor 49 - NDV	Tumor 50 - NDV	Tumor 51 - NDV	Tumor 52 - NDV
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	10	31	0	99
5	25	120	0	75
6	65	31	0	61
7	96	0	0	190
8	241	0	0	292
9	221	0	0	267
10	194	0	0	282
11	207	0	0	493
12	231	57	0	454
13	219	28	0	449
14	288	51	0	641
15	424	108	0	741
16		95	0	
17		82	0	
18		131	0	
19		141	0	

Absolute Tumorumina der mit NDV behandelten Gruppe in mm³

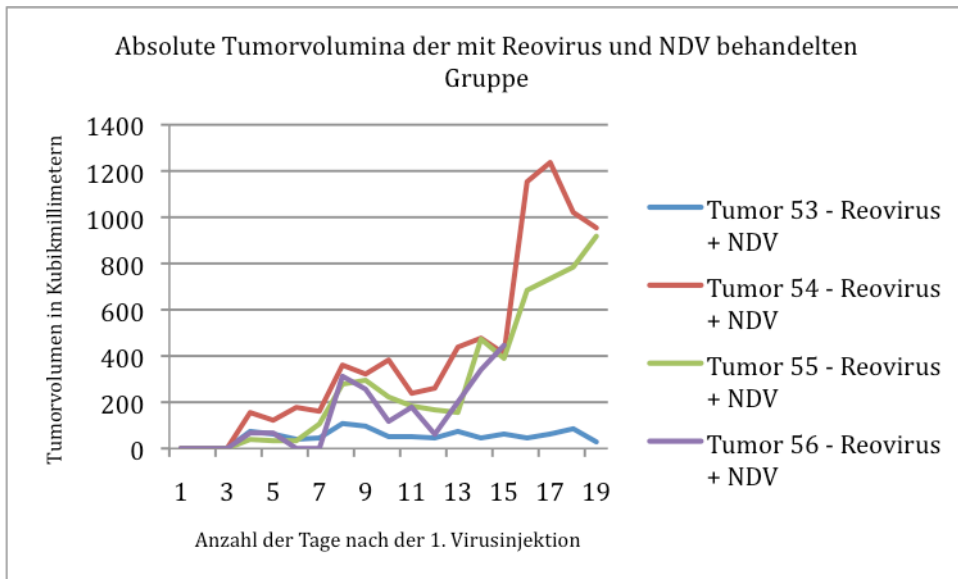
9.3 Absolute Tumorumina der mit Reovirus behandelten Gruppe



Anzahl der Tage nach der 1. Virusinjektion	Tumor 45 - Reovirus	Tumor 46 - Reovirus	Tumor 47 - Reovirus	Tumor 48 - Reovirus
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	25	28	14	68
5	73	91	58	143
6	82	84	95	152
7	135	129	107	201
8	162	184	112	344
9	254	163	94	375
10	330	182	119	435
11	389	179	171	429
12	318	233	151	388
13	586	912	350	799
14	450	1496	303	1056
15	686	1190	546	1086
16	897		728	
17	972		1445	
18	1044		1355	
19	918		1360	

Absolute Tumorumina der mit Reovirus behandelten Gruppe in mm³

9.4 Absolute Tumorumina der mit NDV behandelten Gruppe



Anzahl der Tage nach der 1. Virusinjektion	Tumor 53 - Reovirus + NDV	Tumor 54 - Reovirus + NDV	Tumor 55 - Reovirus + NDV	Tumor 56 - Reovirus + NDV
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	75	157	43	69
5	62	122	36	68
6	44	179	38	0
7	47	164	106	0
8	108	363	280	314
9	95	321	296	259
10	53	386	225	119
11	51	242	187	182
12	47	263	172	65
13	76	439	158	200
14	49	477	473	340
15	62	410	392	446
16	49	1156	683	
17	61	1237	735	
18	84	1020	788	
19	30	952	918	

Absolute Tumorumina der mit NDV und Reovirus behandelten Gruppe in mm³