

**Therapie von Hirntumoren (Gliomen)
mit dem onkolytischen Parvovirus H-1 (H-1PV)
Präklinische Untersuchungen zur Optimierung
der Virotherapie *in vitro* und *in vivo***

Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation
(D386)

Nadja Thomas

1.Gutachter: Prof. Dr. Joachim W. Deitmer
2.Gutachter: Prof. Dr. Jörg R. Schlehofer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 04.11.2011

Kaiserslautern, November 2011

**Therapie von Hirntumoren (Gliomen)
mit dem onkolytischen Parvovirus H-1 (H-1PV):
Präklinische Untersuchungen zur Optimierung
der Virotherapie *in vitro* und *in vivo***

Gutachter:
Prof. Dr. Joachim W. Deitmer
Prof. Dr. Jörg R. Schlehofer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Jean Rommelaere am Forschungsschwerpunkt Infektion und Krebs des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Jörg R. Schlehofer und Dr. Jürg P. F. Nüesch im Zeitraum von Juli 2008 bis September 2011 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen erstellt wurde.

Ludwigshafen, den 13.09.2011

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Deitmer für die Bereitschaft diese Arbeit als Vertreter der TU Kaiserslautern zu unterstützen und zu beurteilen; insbesondere für seine Bereitschaft für die Zwischenberichte nach Heidelberg zu kommen und die Hilfe bei der Organisation und Anmeldung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Schlehofer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Kins für die Leitung der Prüfungskommission.

Danken möchte ich Prof. Dr. Jean Rommelaere für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Prof. Dr. Jörg R. Schlehofer und Dr. Jürg P. F. Nüesch danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, sowie die Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt des Weiteren Dr. Irina Kiprianova für die Unterstützung bei der Durchführung der Gewebefärbungen, Manuel Fischer für die Hilfe und Unterweisung bei den Tierversuchen an der Ratte, sowie Renate Geibig für die Hilfe bei den Mausversuchen. Barbara Leuchs danke ich für die Bereitstellung der Virussuspensionen, Matthias Ehrbar für die Unterstützung bei unzähligen Experimenten im 100er Format, Muriel Lavie für die Hilfe bei den Fallstricken der quantitativen RealTime PCR und beim Primerdesign, Claudia Plotzky und Dr. Severine Bär für die Hilfe bei den Versuchen mit den adaptierten Virusklonen und für die Bereitstellung sämtlicher Lösungen und Puffer, sowie für die Aufmunterung während mancher Tiefpunkte. Außerdem danke ich Dr. Severine Bär für die Unterweisung bei der Fluoreszenzmikroskopie, Dr. Michaela Socher für die Probengewinnung bei den Ausscheidungsversuchen und Dr. Werner Nicklas bei der Hilfe bei meinem Tierversuchsantrag. Dr. Jeannine Lacroix möchte ich für die Hilfe bei der Färbung der Nasenschleimhaut Primärkultur aus der Ratte, für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen zum Thema und darum herum danken. Dr. Zahary Raykov danke ich für einige Liter Denhardt`s und Kristallviolett-Lösung.

Ein besonderer Dank geht an das ganze Laborteam 2.214, das mich sehr freundlich aufgenommen hat und mit seinem Humor, sowie mit unzähligen Tassen Kaffee, die Arbeit immens erleichtert hat. Hierbei geht auch ein besonderer Dank an Prof. Dr. Jörg Schlehofer für die einmaligen Laborausflüge und Gartenfeste.

Für die Korrekturen an meiner Arbeit danke ich Dr. Julia Köllner, André ten Haaf, Liana Frey und Alexandra Fischer, die auch die kleinsten Fehler aufgedeckt haben.

Mischa Schwendy möchte ich zusätzlich für die Huggy Bears danken.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt haben und sehr viel Verständnis in allen Lagen für mich zeigten und meinen chronischen Zeitmangel und Stresspegel immer ertragen haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Summary	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Glioblastome	1
1.1.1 Therapie von Glioblastomen	2
1.1.2 Glioblastom Tiermodelle	5
1.2 Onkolytische Viren	7
1.2.1 Onkolytische Viren und Glioblastome	11
1.2.2 Onkolytische Viren und ihre Anwendung <i>in vivo</i> im Organismus.....	12
1.3 Parvovirus H-1	15
1.3.1 Genomorganisation, virale Proteine und Lebenszyklus von H-1PV	16
1.3.1.1 Infektion	17
1.3.1.2 Replikation	19
1.3.1.3 Freisetzung viraler Nachkommen	21
1.3.2 Zytopathogenität und Interaktion mit dem Immunsystem	22
1.3.3 Vorteile einer Anwendung von Parvovirus H-1 zur onkolytischen Virotherapie	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Reagenzien.....	29
2.1.2 Materialien.....	32
2.1.3 Software.....	35
2.1.4 Puffer und Lösungen	36
2.2 Methoden	38
2.2.1 Zellkultur	38
2.2.1.1 Kultivierung von Zellen	38
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	38
2.2.1.4 Wachstumskurven	39
2.2.2 Virusproduktion.....	40
2.2.2.1 Produktion der verwendeten Virusstocks.....	40
2.2.2.2 Virusreinigung durch Iodixanol Gradient	41
2.2.3 Infektionen und Färbungen von Zellen	41
2.2.3.1 Färbung vitaler Zellen mit MTT-Lösung.....	41
2.2.3.2 Messung der Zelllyse mittels LDH-Test	42

2.2.3.3	Bestimmung der Konzentration infektiöser Viren mit Plaque Assay	43
2.2.3.4	Zytotoxizitäts-Assay.....	44
2.2.3.5	Untersuchung der Zytotoxizität und viralen Replikation in Zellen.....	45
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.4.1	DNA-Isolierung.....	45
2.2.4.2	Nachweis viraler DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.4.3	Größenbestimmung von PCR-Fragmenten durch Gelelektrophorese.....	47
2.2.4.4	Messung der viralen DNA-Konzentration durch quantitative-Realtime-PCR... 47	
2.2.4.5	Untersuchung der viralen DNA-Replikation durch Southern Blot-Analyse.....	52
2.2.4.6	Sequenzanalyse von Virusklonen.....	53
2.2.4.7	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	57
2.2.4.8	Nachweis viraler DNA durch Hybridisierung.....	57
2.2.5	Immunhistochemie von Zellen	58
2.2.5.1	Epithelzellfärbung der Primärkultur aus Nasengewebe der Ratte.....	58
2.2.5.2	Nachweis viraler und zellulärer Proteine in Zellen	59
2.2.6	Tierversuche	60
2.2.6.1	Ratte	60
2.2.6.2	Maus	65
2.2.7	Gewebefärbungen.....	66
2.2.7.1	Pathologische Beurteilung von Geweben nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung ...	66
2.2.7.2	Nachweis viraler Proteine in Geweben	66
3	Ergebnisse	68
3.1	Onkolytische Virotherapie von Glioblastomen mit H-1PV <i>in vivo</i>	68
3.1.1	Ausscheidung und Übertragung von H-1PV	68
3.1.1.1	Übertragung von H-1PV zwischen Ratten	68
3.1.1.2	Untersuchung der Ausscheidungsproben	69
3.1.2	<i>Intranasale</i> Applikation von H-1PV	85
3.1.2.1	Nachweis viraler DNA nach intranasaler Applikation.....	85
3.1.2.2	Nachweis von NS-1 nach verschiedenen Applikationsarten im Tumorgewebe	88
3.1.2.3	Apathogenität von H-1PV in normalem Gewebe <i>in vivo</i>	89
3.1.2.4	Nachweis einer Virämie nach H-1PV-Infektion im Rattenmodell	90
3.1.3	Replikation von H-1PV nach onkolytischer Virotherapie von Gliomen.....	93
3.1.3.1	Replikation von H-1PV <i>in vitro</i> unter Zellkulturbedingungen	93
3.1.3.2	Replikation von H-1PV <i>in vivo</i> in der immunkompetenten Ratte	94
3.1.3.3	Untersuchung der Nasenschleimhaut der Ratte	97
3.2	Adaptierung von H-1PV an humane Glioblastomzellen.....	100
3.2.1	Adaptiertes H-1PV <i>in vitro</i>	100
3.2.1.1	Zellen und Wachstum.....	101
3.2.1.2	Bestimmung der Zytotoxizität der Klone in verschiedenen Zelllinien	104
3.2.1.3	Zytotoxizität der adaptierten Virenklone für nicht transformierte Zellen	105
3.2.1.4	Vermehrung der adaptierten Klone in humanen Glioblastom-Zelllinien.....	106
3.2.1.5	Nachweis viraler DNA-Replikation der adaptierten Virusklone	109
3.2.1.6	Bildung infektiöser Nachkommenviren	110

3.2.1.7 Sequenzanalyse	112
3.2.1.8 Auftreten der Deletion von 28 AS im Verlauf der Adaptierung von H-1PV...	115
3.2.1.9 Sequenzanalyse der Passagen 4, 7, 10, 15 und 20 der Adaptation.....	116
3.2.1.10 Infektionseffizienz der adaptierten Virusklone im Vergleich mit H-1PV	119
3.2.1.11 Untersuchung des Rekombinanten Klons 3 in vitro.....	122
3.2.2 Adaptiertes H-1PV <i>in vivo</i>	125
3.2.2.1 Virusproduktion	125
3.2.2.2 Onkolytische Virotherapy mit den adaptierten Virusklonen in der Maus.....	125
3.2.2.3 Detektion der Viren im Tumorgewebe.....	127
3.2.2.4 Sequenzierungen der im Tierversuch verwendeten Virusstocks.....	128
4 Diskussion	130
4.1 Anwendung von H-1PV <i>in vivo</i>	130
4.2 Effizienzsteigerung von H-1PV <i>in vivo</i>	138
4.3 Ausblick	144
5 Literatur	145
6 Anhang	157
6.1 Lebenslauf.....	157
6.2 Veröffentlichungen	159

Zusammenfassung

Die Entwicklung eines neuartigen Therapiekonzeptes erfordert umfangreiche Prüfungen insbesondere für die Sicherheit der Anwendung am Menschen. Die Verwendung des apathogenen, onkoselektiven, replikationskompetenten Parvovirus H-1 (H-1PV) zur onkolytischen Virotherapie bei bösartigen Hirntumoren (Glioblastome) ist eine vielversprechende Alternative (oder Ergänzung) zu den bisherigen Therapien, wie Operation, Chemotherapie und Bestrahlung. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass H-1PV in der Lage ist, nach einmaliger *intratumoraler* oder mehrfacher *intravenöser* Applikation im Rattengliom-Modell eine vollständige Regression des Tumors ohne pathologische Nebenwirkungen herbeizuführen. In Vorbereitung einer klinischen Studie Phase I/IIa mit H-1PV wurden in dieser Arbeit wichtige Aspekte dieser neuartigen Virotherapie untersucht:

1. Ausscheidung und Übertragung von H-1PV *in vivo* in der Ratte

Es konnte gezeigt werden, dass infektiöse Viren in Urin und Speichel unabhängig von der Applikationsart und der Anwesenheit eines Tumors ausgeschieden werden, was bedeutet, dass eine Übertragung von H-1PV durch Tröpfcheninfektion stattfinden könnte. In klinischen Studien muss daher geprüft werden, ob das Virus auch vom Menschen ebenso im Urin und Speichel ausgeschieden wird.

2. *Intranasale* Applikation von H-1PV zur Behandlung von Glioblastomen in der Ratte

Es konnte gezeigt werden, dass H-1PV auch nach *intranasaler* Applikation den Tumor erreicht, dort virale Proteine gebildet werden und in infizierten tumortragenden Tieren die Überlebenszeit signifikant verlängert werden konnte im Vergleich mit den nicht-infizierten Kontrolltieren. Diese Applikationsart wäre eine einfach durchzuführende Art der Anwendung, da sie keinen chirurgischen Eingriff am Gehirn erfordert.

3. Replikation von H-1PV *in vivo* im Rattenmodell

Durch die Fähigkeit von H-1PV in Tumorzellen repliziert zu werden, können nach einer einzigen Virusapplikation einer geringen Dosis initial nicht infizierte Zellen der Tumormasse infiziert und lysiert werden. *In vivo* im Rattengliom-Modell konnte gezeigt werden, dass H-1PV zunächst im ganzen Organismus verteilt wird, nach kurzer Zeit aber im Tumorgewebe angereichert und die Viruskonzentration dort länger aufrecht erhalten bleibt als bei Tieren ohne Tumor. Die Expression des viralen, zytotoxischen Proteins NS-1 war bei allen Applikationsarten auf das Tumorgebiet beschränkt. Die Daten sprechen für eine zumindest begrenzte Vermehrung von H-1PV im Tumorgewebe.

4. Adaptierung von H-1PV an humane Glioblastomzellen

H-1PV gehört zu der Gruppe der Nager-Parvoviren und wird daher in Rattentumorzellen effizienter vermehrt als in humanen Glioblastomzellen. In dieser Arbeit wurden durch Passagieren an eine humane Glioblastomzelllinie adaptierte virale Einzelklone von H-1PV in verschiedenen humanen Glioblastomzellen charakterisiert. Alle Klone konnten sich stärker in diesen vermehren und diese effizienter lysieren. *In vivo* führte einer der Klone zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum und verlängerter Überlebenszeit der Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Analyse der genetischen Mutationen der Klone konnten verschiedene Alterationen detektiert werden, wobei sich die Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV als eher gering erwies, was für eine sichere Anwendung von H-1PV beim Menschen ein Vorteil ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Onkoselektivität von H-1PV durch die Adaptierung nicht verloren ging, was bedeutet, dass auch die adaptierten viralen Klone weiterhin apathogen für nicht transformierte Zellen sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zur Erprobung von H-1PV im Hinblick auf die klinische Anwendung im Menschen. H-1PV erwies sich als einfach zu applizierendes, *in vivo* replikationskompetentes, sicheres und anpassungsfähiges Virus für die onkolytische Virotherapie von Gliomen beim Menschen. Dass H-1PV seine Onkoselektivität durch Adaptation an humane Gliomzellen nicht einbüßte, eröffnet die Möglichkeit das Virus an weitere Krebsentitäten anzupassen und auch dort zur onkolytischen Therapie einzusetzen.

Summary

The establishment of a novel therapeutic concept needs extensive evaluation, notably of safety, before its application in humans. The use of the apathogenic, replication-competent parvovirus H-1 (H-1PV) for oncolytic virotherapy for human malignant brain tumors (glioblastoma) has been identified as a promising agent for alternative or additional treatment besides conventional surgery, chemo- and radiotherapy. In our group we could demonstrate a complete regression of glioblastoma after a single *intratumoral* or multiple *intravenous* infections in (immunocompetent) rats. In preparation of a clinical trial (phase I/IIa) some crucial issues have been addressed in this work.

1. Excretion and transmission of H-1PV *in vivo* in rats

The excretion of infectious H-1PV via urine and saliva could be demonstrated to be independent of the route of administration and the presence of (permissive) tumor cells. The data suggest a possible airborne transmission between animals. During the clinical trial, it has to be investigated if also in humans H-1PV is excreted via urine and saliva.

2. *Intranasal* application of H-1PV for the treatment of Glioblastoma in a rat model

After a single *intranasal* instillation, H-1PV could be evidenced to reach the brain and express the viral, cytotoxic NS-1-protein exclusively in the tumor tissue, leading to a significantly prolonged survival of infected glioma-bearing animals compared to non-infected controls. The intranasal route of administration would be an easy to perform way for delivering agents to the brain, circumventing surgery.

3. Replication of H-1PV *in vivo* in the rat model

Replication-competent oncolytic viruses have the advantage to yield progeny virus, infecting and destroying remaining tumor cells that were not infected initially after a single application of a small viral dose. H-1PV was found to be distributed over the whole organism but a short time after infection, it was preferentially enriched in the tumor and infectious viral particles persisted longer in the tumor tissue compared to brains of non-tumor bearing animals. Expression of viral proteins (NS-1) was limited to the tumor tissue, indicating a limited replication of H-1PV *in vivo* in the tumor area.

4. Adaptation of H-1PV to human glioblastoma cells

H-1PV belongs to the group of rodent parvoviruses and is replicated more efficiently in transformed rat cells than in human glioblastoma cells. Therefore, viral clones from serial passaging to human glioblastoma cells were characterized in different human glioblastoma cell lines and turned out to be more efficient in replication and cell-killing in those cells. One of the adapted clones led to a significant slower tumor progression *in vivo* and prolonged survival of the animals compared to the wildtype virus. The analysis of genetic changes revealed several characteristic mutations, however with relatively slow mutational speed, what is a benefit for the application in humans. The oncoselectivity of H-1PV was kept during the adaptation process, i.e. non-transformed cells were not killed by the adapted viral clones.

This work contributes to evaluating H-1PV for clinical application in humans. H-1PV was proven to be safe, easy to apply, *in vivo* replication competent and adaptable to improving the treatment of human tumor cells. The fact that adapted H-1PV did not lose its oncoselectivity raises hope for the possibility to adapt H-1PV to further types of cancer and its use for oncolytic virotherapy.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DC	dentritische Zellen (Teil des Immunsystems zur Antigenpresentation nach Pathogenbefall)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	<i>doublestrand</i> DNA (Doppelstrang-DNA)
ssDNA	<i>singlestrand</i> DNA (Einzelstrang-DNA)
dNTPs	Desoxynukleotide für die DNA-Synthese (vier verschiedene: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
<i>E. coli</i>	Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)
et al	<i>et alii</i> (und Andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
GBM	Glioblastoma multiforme
HE	Hämalaun-Eosin (Färbung für Gewebestrukturen)
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LB-Medium	Nährmedium zur Bakterienkultivierung (lysogeny broth)
LDH	Laktatdehydrogenase
LD ₅₀	tödliche Dosis für 50 % der Versuchsteilnehmer (hier meist Zellen)
MTD	maximal tolerierbare Dosis bei Medikamenten
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen (Teil des angeborenen Immunsystems)
NO _x	Stickoxide
NTC	Non Template Control (Negativ- bzw. Wasserkontrolle der PCR)
p.a.	<i>per analysis</i> (zur Analyse)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
qRT-PCR	quantitative <i>RealTime</i> -PCR
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> (zelluläres Protein, wichtig für die zelluläre und virale Replikation)
RNA	Ribonucleinsäure
RNU	Rowett Nude <i>immunodeficient rat</i> (Nacktratte ohne Thymus)
RT	Raumtemperatur
SGT	NS1-interacting small glutamine-rich TPR-containing protein (zelluläres Protein, das mit NS-1 interagiert, Funktion ist bisher nicht bekannt)
TGFβ	<i>transforming growth factor</i> , wird von Tumoren freigesetzt zur lokalen Entzündungshemmung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Größenskalierung

k	Kilo (10^3)
c	Zenti (10^2)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})

Virologische Abkürzungen

AAV	adenoassoziierte Viren
CPE	zytopathischer Effekt verursacht durch Virusinfektion in Zellen, geht mit Veränderungen der Zellmorphologie einher
dRF	doppelte Replikationsform (folgendes Intermediat bei der Parvovirus DNA-Replikation, ds-DNA bestehend aus vier ssDNA-Genomen)
H-1PV	Parvovirus H-1
HSV	Herpes Simplex Virus
MOI	Viruspartikel pro Zelle (multiplicity of infection)
mRF	monomer Replikationsform (erstes Intermediat bei der Parvovirus DNA-Replikation, ds-DNA)
MVM	Minute Virus of Mice
NS-1-3	virales nicht-Struktur Protein 1-3 des Parvovirus H-1
OV	onkolytischer Virus
PFU	Löcher im Zellrasen, entstanden durch einzelne Virenklone (Plaque forming unit)
VP1-2	virale Kapsidproteine 1-2 von H-1PV
VTE	Virus Tris EDTA-Puffer

Materialien

Ac	Acetat
AGS	Astrocyte Growth Supplement
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
LB-Medium	Nährmedium für Bakterien (siehe 2.1.4)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
P/S	Penicillin / Streptomycin
SDS	Natrium dodezylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SSC	tri-Natriumzitat-lösung (saline sodium citrate) (siehe 2.1.4)

Applikationsarten

i.c.	<i>intrazerebral</i>
i.n.	<i>intranasal</i>
i.m.	<i>intramuskulär</i>
i.t.	<i>intratumoral</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
s.c.	<i>subcutan</i>

Restriktionsenzyme

Enzym	Organismus	Schnittstelle
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5` G↓AATT C 3` 3` C TTAA↑G 5`
NcoI	<i>Nocardia corallina</i>	5` C↓CATG G 3` 3` G GTAC↑C 5`
PstI	<i>Providencia stuartii 164</i>	5` C TGCA↓G 3` 3` G↑ACGT C 5`

Quelle: <http://rebase.neb.com/rebase/>

Buchstabencode der Nukleotidbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Einheiten:

°C	Grad Celsius
A	Ampere
bp	Basenpaare
Da	Dalton
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach Infektion)
g	Gramm
h	Stunde
hpi	<i>hours post infection</i> (Stunden nach Infektion)
kb	Kilobasen (1000 Basen)
L	Liter
M	Molar (mol/L)
m	Meter
min	Minuten
nt	Nukleotide
rpm (UpM)	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunden
U	Units (Einheit von Enzymen)
V	Volt
Vg	virale Genome
Vol.	Volumen
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion onkolytischer Viren mit zellulären Signalwegen in Tumoren.....	8
Abbildung 2: Genomorganisation von H-1PV	17
Abbildung 3: Neubauer Zählkammer "improved"	39
Abbildung 4: Plaque Assay Schale	43
Abbildung 5: Infektionsschema der Zytotoxizitätstests	44
Abbildung 6: DNA-Größenmarker für die Gelelektrophorese.....	47
Abbildung 7: Lage der Primer und Sonden der qRT-PCR-Systeme.....	51
Abbildung 8: DNA-Größenmarker für Southern Blot Analysen	52
Abbildung 9: Aufbau eines Southern Blots.....	53
Abbildung 10: Verwendete Rattenstämme	60
Abbildung 11: Knochenstruktur des Rattenschädels coronal	61
Abbildung 12: MRT-Aufnahmen eines Rattengehirns	62
Abbildung 13: Stoffwechselkäfig.....	63
Abbildung 14: Balb/c Nacktmaus	65
Abbildung 15: Ausscheidungsproben nicht infizierter Tiere auf RG2 Zellen	70
Abbildung 16: Effekt von Kotproben infizierter Tiere auf RG2 Zellen.....	71
Abbildung 17: Quantifizierung der DNA-Menge in Urinproben.....	74
Abbildung 18: Effekt von Urinproben auf RG2 Zellen	75
Abbildung 19: Nachweis infektiöser Viren im Nierengewebe	77
Abbildung 20: Nachweis viraler DNA in Speichelproben im zeitlichen Verlauf.....	79
Abbildung 21: Quantifizierung viraler DNA in Speichelproben	80
Abbildung 22: Effekt von Speichelproben auf RG2 Zellen.....	81
Abbildung 23: Effekt von Nasengewebe infizierter Ratten auf RG2 Zellen	83
Abbildung 24: Detektion von H-1PV im Gehirn nach <i>intranasaler</i> Applikation.....	86
Abbildung 25: Nachweis des viralen NS-1 Proteins im Tumorgewebe.....	88
Abbildung 26: Untersuchung pathologischer Veränderungen nach Infektion.....	89
Abbildung 27: Nachweis viraler DNA im Blut.....	90
Abbildung 28: DNA-Replikation von H-1PV <i>in vitro</i>	93
Abbildung 29: Produktion infektiöser Viren <i>in vitro</i>	94
Abbildung 30: DNA-Replikation von H-1PV im Gehirn infizierter Ratten	95
Abbildung 31: Rückgewinnung infektiöser Viren im Gehirn und der Leber.....	96
Abbildung 32: Zellmorphologie der aus der Nase isolierten Primärkultur	98

Abbildung 33: Färbung epithelialer Zellen in der Nasenprimärkultur.....	98
Abbildung 34: Zytotoxizität von H-1PV in der Nasenprimärkultur	99
Abbildung 35: Zellmorphologie der verwendeten Zelllinien.....	102
Abbildung 36: Wachstumskurven der Zelllinien	103
Abbildung 37: Zytotoxizität der Virusklone im Vergleich mit dem Wildtyp.....	104
Abbildung 38: Zytotoxizität der Virusstocks in nicht transformierten Zellen	106
Abbildung 39: Virale Vermehrung <i>in vitro</i>	108
Abbildung 40: DNA-Replikation der adaptierten Virusklone	109
Abbildung 41: Produktion infektiöser Viren im Vergleich mit dem Wildtyp	111
Abbildung 42: Lage der detektierten Mutationen im Genom von H-1PV	114
Abbildung 43: Spezifität der qRT-PCR Detektionssysteme	115
Abbildung 44: Quantifizierung der viralen DNA im Verlauf der Adaptierung.....	116
Abbildung 45: Position der aufgetretenen Deletionen im NS-Bereich	118
Abbildung 46: Infektionseffizienz der Virusklone.....	120
Abbildung 47: Grafische Darstellung der Infektionseffizienz	122
Abbildung 48: Zytotoxizitätsvergleich des rekombinanten Klons 3 mit Klon 3 und H-1PV	123
Abbildung 49: Infektionseffizienz des rekombinanten Klons 3.....	123
Abbildung 50: Tumorwachstum und Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse	126
Abbildung 51: Amplifikation viraler DNA aus Tumorgewebe der Maus	127
Abbildung 52: Nachweis viraler Proteine im Tumorgewebe.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Onkolytische Viren in klinischen Studien bei Glioblastomen	11
Tabelle 2: Zellzahlen für die Wachstumskurven.....	40
Tabelle 3: Standardpräparation für die qRT-PCR.....	50
Tabelle 4: Restriktionsverdau von H-1PV -Segmenten	56
Tabelle 5: Antikörper zur Markierung epithelialer Zellen	58
Tabelle 6: Antikörper zur Markierung viraler und zelluläre Proteine in Zellen	59
Tabelle 7: Antikörper zur Markierung viraler Proteine in Tumorgewebe	67
Tabelle 8: Nachweis viraler DNA in Nierengewebe.....	72
Tabelle 9: Nachweis viraler DNA in Urinproben	73
Tabelle 10: Nachweis infektiöser Viren in Urinproben infizierter Ratten	76
Tabelle 11: Verursachung eines CPE durch Nierengewebe.....	78
Tabelle 12: Nachweis viraler DNA in Speichelproben	78
Tabelle 13: Effekt von Speichelproben auf RG2 Zellen	81
Tabelle 14: Nachweis viraler DNA in Nasengewebe infizierter Ratten	82
Tabelle 15: Effekt von Nasengewebe auf RG2 Zellen.....	84
Tabelle 16: Verteilung viraler DNA in Organen nach intranasaler Applikation von H-1PV ..	87
Tabelle 17: Nachweis viraler DNA im Blut.....	91
Tabelle 18: Übersicht über die Zytotoxizität der Virusstocks.....	105
Tabelle 19: Übersicht über die Vermehrung infektiöser Viren	112
Tabelle 20: Übersicht über die Mutationen der Virusklone am Ende der Adaptierung.....	113
Tabelle 21: Auftreten der Mutationen im Verlauf der Adaptation.....	117
Tabelle 22: Infektionseffizienz der Virusklone im Vergleich mit Wildtyp H-1PV	121
Tabelle 23: Infektionseffizienz des rekombinanten Klons 3.....	124
Tabelle 24: Konzentration der Virusstocks für die Tierversuche	125
Tabelle 26: Sequenzierung der im Tierversuch verwendeten Virusstocks	129

1 Einleitung

1.1 Glioblastome

Krebs ist mit 13 % eine der häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2008 erlagen weltweit 7,6 Millionen Menschen einer Krebserkrankung (WHO, Cancer Fact sheet N°297, february 2011). Davon entfallen ca. 2 % auf Hirntumore, wobei die häufigste Form die primären, bösartigen Gliome (34 %) darstellen, welche im Alter zwischen 50 und 70 Jahren vermehrt auftreten (Deutsche Krebsgesellschaft, www.krebsgesellschaft.de). 80 % aller malignen Hirntumore sind Gliome, zu denen alle Tumore, die glialen Ursprungs sind, wie Astrocytoma, Glioblastoma, Oligodendroglioma, Ependymoma, gemischte Gliome, malignes Glioma NOS und andere neuroepitheliale Tumore zählen (CBTRUS 2007-2008).

Die hier untersuchten Glioblastome der höchsten Risikogruppe (WHO Grad IV) zeichnen sich durch mitotische Aktivität, nekrose-anfällige Neoplasmen, schnelles prä- und postoperatives Wachstum aus und haben eine fatale Prognose (Louis et al, 2007) mit einer Lebenserwartung von weniger als zwölf Monaten bei 80 % aller Patienten (Grossman et al, 2010). Das stark infiltrative Wachstum bei Gliomen führt dazu, dass diese Tumore schwer operabel sind und nie alle bösartigen Zellen durch Bestrahlung bzw. Chemotherapie erreicht werden können. Diese Art von Gehirntumoren zeichnet sich zusätzlich durch eine besonders hohe Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung aus (Shu et al, 1998; Stubb et al, 2006; Iacob & Dinca, 2009). Weiterhin ist es sehr schwer die Wachstumsfront der Zellen zu erfassen, da einzelne Zellen in andere Gebiete auswandern, die bei der Bildgebung dann nicht erfasst werden (Claes et al, 2007). Diese migrierenden Zellen unterscheiden sich von den proliferierenden Tumorzellen, welche nicht migrieren. Der Migrationsprozess orientiert sich hierbei an vorgegebenen Strukturen wie z.B. Myelinfasern oder kleinen Blutgefäßen (Giese & Westphal, 2000). In einer Studie konnte sogar bei 47 % der Patienten eine Ausbreitung des Tumors in die contralaterale Hemisphäre beobachtet werden (Matsukado et al, 1961). Daher ist es trotz neuer Entwicklungen nicht möglich, alle Tumorzellen mit den üblichen Therapieformen zu erreichen (Westphal & Lamszus, 2009). Ein weiteres Problem bei der Behandlung von Glioblastomen, welches mit dem stark infiltrativen Wachstum einhergeht, ist, dass fast alle Glioblastome (80-90 % aller Fälle) nach der Behandlung im Radius von 2 cm um sowie in der Tumorköhle wieder zu wachsen beginnen (Giese & Westphal, 2001; Burton & Prados, 2000). Die Behandlung eines rekurrenden (wiederkehrenden) Glioblastoms erweist sich als noch schwieriger und ist abhängig von der Behandlung des primären Tumors (Kostron & Bauer, 2010). Weiterhin sind Tumore keine homogene Zellpopulation; auch hier gibt es Stammzellen, die sich vom Rest der Tumormasse

physiologisch unterscheiden: Die Stammzellen können sich selbst unbegrenzt erneuern, teilen sich aber selten. Diese Zellen sind dafür verantwortlich, dass Tumore neu entstehen, bzw. nach einer Therapie wiederkehren (Liu et al, 2006). Ein Großteil der Tumorstammzellen bei Glioblastomen kann unter anderem durch die Überexpression des Differenzierungsmarkers CD133 vom Rest der Tumormasse unterschieden werden (Tang et al, 2007). Des Weiteren zeichnen sich diese Zellen durch die gleichen, sich selbst erneuernden Mechanismen wie normale Stammzellen aus: Überexpression von anti-Apoptose Proteinen, Efflux-Transportern etc. (Liu et al, 2006). Oftmals zeigen diese Stammzellen eine verstärkte Resistenz gegen die herkömmlichen Tumorthérapien (Liu et al, 2006; Hatina et al, 2007). Bei der Entwicklung neuer Therapieformen ist es somit sehr wichtig, zwischen Tumorstammzellen und „normalen“ Stammzellen differenzieren zu können (Liu et al, 2006). Nicht zuletzt gilt das Gehirn als immunprivilegiertes Ort. Durch die Blut-Hirn-Schranke ist das Milieu grundsätzlich verschieden vom Rest des Organismus (Barker & Billingham, 1977; Graber & Dhib-Jalbut, 2009).

Zur Beurteilung der Hirntumore und der Therapieplanung wird der Karnofsky Performance Index hinzugezogen. Mit diesem Index werden die Patienten nach Gesichtspunkten wie z.B. Einschränkung der Aktivität, Selbstversorgung und Selbstbestimmung bewertet. Die Skala reicht hier von 100 (keine Einschränkung) bis 0 (Tod) (O`Toole & Golden, 1991). Auch das Alter und etwaige Vorbehandlungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Auswahl der geeigneten Therapieform.

1.1.1 Therapie von Glioblastomen

Die klassische Therapie bei Glioblastomen ist die operative Entfernung von Tumorgewebe, gefolgt von Bestrahlung und anschließender Chemotherapie (Burton & Prados, 2000). Es gibt jedoch weitaus mehr Ansätze zur Bekämpfung dieser Hirntumore, wie z.B. molekulare Therapien (Gentherapie oder Immuntherapie).

Bei den molekularen Therapien wird versucht, durch Manipulation der Tumorzellen diese zum Absterben zu zwingen. Es konnte gezeigt werden, dass primäre Glioblastome einige charakteristische genetische Abberationen tragen, wie z.B. LOH 10q (70 %), EGFR Amplifikation (36 %), p16^{INK4a} Deletion (31 %), p53 Mutationen (28 %), PTEN Mutation (25 %), welche Zielmoleküle für die Gentherapie darstellen können (Ohgaki et al, 2004; Kleihues, 2007, TCGARN, 2008). Als vielversprechende Möglichkeit für eine Anwendung bei Gliomen gelten unter anderem die Hemmung der Wachstumsfaktor-Signalwege (EGF, PDGF, VEGF, HGF/SF, IGF) oder Kinase-Inhibitoren (vgl. Sathornsumetee, 2007); bei Beal et al wird die Anwendung von antiangiogenetischen Medikamenten zur Bekämpfung von Glioblastomen

diskutiert (Beal et al, 2011). Eine weitere Strategie bei der Behandlung von Gliomen ist die Immuntherapie. Hierbei wird versucht, das Immunsystem des Patienten gegen den Tumor zu aktivieren, wobei es dafür unterschiedliche Herangehensweisen gibt:

Das Immunsystem des Tumorpatienten kann z.B. durch eine Infektionen mit anschließender Lyse von Tumorzellen (onkolytische Viren) oder die Stimulation mit Zytokinen zur Anregung einer anti-Tumor Immunantwort (Interleukine / Interferone) aktiviert werden, wobei bei einer Infektion immer auch eine Immunantwort gegen den „Eindringling“ (Virus) erzeugt wird (Prestwich et al, 2009). Um diese zu umgehen, können bestimmte Immunzellen (z.B. dendritische Zellen) *ex vivo* mit durch virale Infektion und Lyse entstandenen Tumorzelllysaten inkubiert und anschließend wieder dem Patienten injiziert werden. Diese Zellen führen dann über Antigenpräsentation der Tumorzelllysate zur Erkennung der im Patienten vorhandenen gleichen Tumorzellen (Moehler et al, 2005). Es gibt auch die Möglichkeit tumorzell-spezifische Antikörper einzusetzen, die den Tumor für das Immunsystem als „fremd“ markieren, was bereits zu vielversprechenden Ergebnissen geführt hat (Melero et al, 2007; Daga et al, 2011). Mittlerweile konnten spezifische Signalkaskaden identifiziert werden, welche bei Glioblastomen verändert sind (s.o.). Dies ermöglicht den Einsatz von Antikörpern, die dann z.B. an einen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) binden und dessen Funktion inhibieren (Rocha-Lime et al, 2007). Auch der Einsatz onkolytischer Viren wird in der Literatur mehrfach als Immuntherapie diskutiert (Prestwich et al, 2008; Prestwich et al, 2009). Alle bisherigen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine Kombination verschiedener Therapiewege am effizientesten wirkt (Stupp et al, 2006).

Eine Besonderheit, die bei Glioblastomen und anderen Hirntumoren besteht, ist die Lage des Tumors im Gehirn. Da das Gehirn ein „besonderes“ Kompartiment darstellt, welches vom Rest des Körpers sowie des Immunsystems durch die Bluthirnschranke getrennt ist, stellt sich vor allem die Frage, wie das Therapeutikum das transformierte Gewebe erreichen kann, ohne großen Schaden im umgebenden gesunden Gewebe zu verursachen (Becher et al, 2006). Hier existieren mehrere Vorgehensweisen:

a) *Intratumorale* Applikation:

Die Verabreichung der unterschiedlichen Medikamente direkt in das Tumorgewebe ist die nahe liegendste Möglichkeit, um das maligne Gewebe zu erreichen und die Auswirkungen lokal zu begrenzen. Dies birgt jedoch die Gefahren eines chirurgischen Eingriffs am Gehirn und begrenzt die zu verabreichende Menge auf Grund der Platzverhältnisse im Schädelknochen. Des Weiteren wird damit oft nur die große Tumormasse erreicht, nicht aber die wenigen, ausgewanderten Zellen, die an anderer Stelle neue Tumorzentren bilden können

(Claes et al, 2009). Mit der Methode der Convection Enhanced Delivery (CED) kann über eine Pumpe das Agenz über einen definierten Zeitraum gleichmäßig ins Tumorgewebe abgegeben werden. Diese Methode hat gegenüber der einmaligen *intratumoralen* Applikation den zusätzlichen Vorteil, dass eine größere Menge des Medikaments über einen längeren Zeitraum abgegeben werden kann. Allerdings ist diese Behandlung limitiert auf Patienten mit kleinen, nicht operablen Tumoren (Giese & Westphal, 2001).

b) *Intravenöse* Applikation:

Hierbei handelt es sich um eine einfache Methode, die keinen größeren Eingriff erfordert und mehrmals wiederholt werden kann. Hier muss jedoch die Blut-Hirnschranke überwunden werden, um das Tumorgewebe zu erreichen (Pardrige, 2002). Des Weiteren sind die Therapeutika direkt mit dem Immunsystem konfrontiert, was zu entzündlichen Prozessen sowie allergischen Reaktion im Organismus führen kann. Bei der *intravenösen* Applikation wird das verwendete Agenz über den ganzen Organismus verteilt, wodurch die Konzentration im transformierten Gewebe stark sinkt. Zusätzlich findet auch direkt eine Degradierung in der Leber statt (De Silva et al, 2010; Fagiolino et al, 2011). Mittlerweile gibt es sehr elegante Möglichkeiten das Medikament nach systemischer Applikation zielgerichtet in das transformierte Gewebe zu bringen, wie z.B. die *carrier*-Zell vermittelte Applikation (Raykov et al, 2004) und virale Vektoren (Dobbelstein, 2003; Tyler et al, 2008).

c) *Intranasale* Applikation:

Für diese Applikation gibt es einige Beispiele, die eine erfolgreiche Ankunft des Medikaments im Gehirn belegen (Bitter et al, 2011; Mistry et al, 2009), da eine direkte Verbindung vom Nasenepithel ins Gehirn über die Axone der Riechzellen besteht (Gil-Carcedo et al, 2000). Es handelt sich somit um eine nicht invasive, sichere und einfache Methode. Des Weiteren wird auf diesem Weg der erste Durchgang durch die Leber inklusive Degradierung des verabreichten Wirkstoffs vor Erreichen des Ziels (ZNS) verhindert (Wen, 2011; Dahl & Mygind, 1998). Wie auch die *intravenöse* Behandlung ist diese Methode wiederholt durchführbar und limitiert die Menge der verabreichten Substanz nicht direkt. Eventuell auftretende toxische Effekte auf die Schleimhäute und die Atemwege müssen im Vorfeld ausgeschlossen werden.

1.1.2 Glioblastom Tiermodelle

Zur präklinischen Untersuchung von Glioblastomen *in vivo* gibt es verschiedene Tiermodelle, durch die das Zusammenspiel des Organismus mit dem Tumor und den zur Behandlung angewendeten Agenzien analysiert werden kann. Bei der Verwendung geeigneter Tiermodelle sind einige Kriterien zu beachten: Die implantierten Zellen sollten glialer Herkunft sein, die Implantation sollte orthotop erfolgen, das Wachstum reproduzierbar und vergleichbar mit dem klinischen Verlauf stattfinden und die Zellen sollten lange vom Tier toleriert werden (Barth, 1998). Bei der Untersuchung von Gehirntumoren ist die orthotope Implantation wünschenswert, jedoch eine Herausforderung, die zusätzlich eine geeignete Bildgebung erfordert. Man muss weiterhin prinzipiell zwischen immundefizienten und immunkompetenten Tiermodellen unterscheiden. Die immundefizienten Tiere tolerieren humane Tumore, ihnen fehlt jedoch eine oder mehrere Komponenten des Immunsystems, das bei der Gliomtherapie eine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Dunn et al, 2007; Wieder et al, 2008; Barcia et al, 2009). Die immunkompetenten Tiere tolerieren nur arteigene Tumore, wobei hier auch bei der Entstehung zwischen den folgenden Arten zu unterscheiden ist (Fomchenko & Holland, 2006): Spontane Tumore entstehen bei genetisch veränderten Mäusen oder Hunden. Diese Tumore bilden sich unvorhersehbar und sind daher nicht reproduzierbar. Des Weiteren sind in diesen Modellen die genetischen Veränderungen in allen Geweben vorhanden und nicht wie im humanen Verlauf ausschließlich im Tumorgewebe zu finden. Somit kann das Ansprechverhalten auf die unterschiedlichen Therapien stark von der Realität abweichen. Die ersten experimentellen Modelle wurden durch Behandlung mit chemischen Karzinogenen (z.B. Dimethylbenzanthracene (DMBA), Tetradeconoylphorbolacetat (TPA)) erzeugt (Alberts et al, 2006). Xenograft-Modelle entstehen durch die Implantation oder Injektion von Tumorzellen, Spheroiden, Tumorstücken oder Tumorzelllinien ins Tier. Diesen Modellen fehlt die stufenweise Mutation, die im Verlaufe des natürlichen Tumorstadiums stattfindet. Weiterhin sind die implantierten Zellen meist durch die Kulturbedingungen stark verändert und haben nicht mehr die gleichen Eigenschaften, wie die ursprünglichen Tumore. Sie haben oftmals auch eine andere Vaskularisierung und verwachsen unter Umständen nicht so stark mit dem umgebenden Gewebe, so dass die Tumormikroumgebung oder die Interaktionen mit der Tumormatrix nur vermindert stattfinden. Bei Xenograft-Tumormodellen kann man weiterhin zwischen allogenen und syngenem Modellen unterscheiden. Bei den allogenen Modellen werden dem Tier Zellen implantiert, die ursprünglich aus einer anderen Linie dieser Art stammen (z.B. Wistar-Ratte und RG2-Zellen), während beim syngenem Modell Zellen der gleichen Art

verwendet werden (z.B. Fischer 344-Ratten und RG2-Zellen). Die Anwendung der verschiedenen Gliommodelle wird mehrfach diskutiert (vgl. Saini et al, 1999; Candolfi et al, 2007, Marumoto et al, 2009; Lun et al, 2010 und Kroeger et al, 2010).

Bei der Untersuchung von Glioblastomen gibt es nicht nur mehrere Möglichkeiten einen Tumor zu erzeugen, es stellt sich auch die Frage, welche Tierart die geeignete für die jeweiligen Experimente ist. Die zur Verfügung stehenden Gliommodelle sind in der Maus, der Ratte oder im Hund etabliert worden.

Da bei der Übertragung der Forschungsergebnisse von relativ kleinen Tieren (Ratte, Maus) auf den Menschen oftmals unvorhergesehene Effekte auftreten, wird versucht, größere *in vivo* Modelle für Hirntumore zu entwickeln. Hierbei ist die Ähnlichkeit von Glioblastomen in Hunden und Menschen sehr auffällig. Weiterhin gibt es Hunderassen, die eine erhöhte genetische Predisposition für Glioblastome haben (z.B. Boxer). Somit könnten diese Rassen ein geeignetes Modell darstellen (Candolfi et al, 2007). Die Maus hat den Vorteil der einfachen und günstigen Haltung, sowie der problemlosen Beschaffung. Des Weiteren konnten Candolfi et al. zeigen, dass syngene Mausmodelle viele Merkmale von humanen Glioblastomen aufweisen (Candolfi et al, 2007). Ein Nachteil bei der Verwendung der Maus als orthotopes Glioblastom-Modell ist die relativ geringe Größe des Gehirns. Dadurch ist erstens die Implantation schwierig, und zweitens ist die Analyse der Gewebe durch die geringe Probengröße begrenzt. Im Zuge dieser Arbeit wurde das allogene Xenograft-Modell Wistar-Ratte und RG2-Zellen, bzw. das Xenograft-Modell RNU-Ratte in Kombination mit humanen U87-Zellen verwendet. Obwohl das RG-2-Modell kontrovers diskutiert wird (Mariani et al, 2006), kam es bei den hier durchgeführten Versuchen niemals zu einer spontanen Tumorregression. Bei Aas et al wird das syngene RG-2-Modell in Fischer 344-Ratten als einfaches und reproduzierbares Glioblastommodell beschrieben (Aas et al, 1995). Die Ratte eignet sich für die durchgeführten Versuche besonders, da das hier verwendete autonome Parvovirus H-1 zu den Nager-Parvoviren gehört und ein natürliches Reservoir in der Ratte hat, jedoch in der Maus nicht vermehrt wird (Hallauer et al, 1972; Wrzesinski et al, 2003). Diese Präferenz von H-1PV wurde in den *in vivo* Versuchen mit den adaptierten Virusklonen versucht zu umgehen, in dem diese Experimente bewusst in einem Mausmodell durchgeführt wurden (siehe 2.2.6.2).

Trotz aller Fortschritte bei der Behandlung sind Glioblastome nach wie vor die häufigsten und bösartigsten primären Hirntumore, die letztendlich zum Tod des Patienten führen. Alle bisherigen Maßnahmen dienen nur der Verlängerung des Lebens und der Verbesserung der

Lebensqualität der Patienten bis zum Tod (Claes et al, 2007). Daher ist es immer noch von großer Wichtigkeit, neue Strategien zu entwickeln, um diesen Patienten zu helfen. Eine neuartige und vielversprechende Therapieform ist die Anwendung von onkolytischen Viren, welche selektiv transformierte Zellen töten.

1.2 Onkolytische Viren

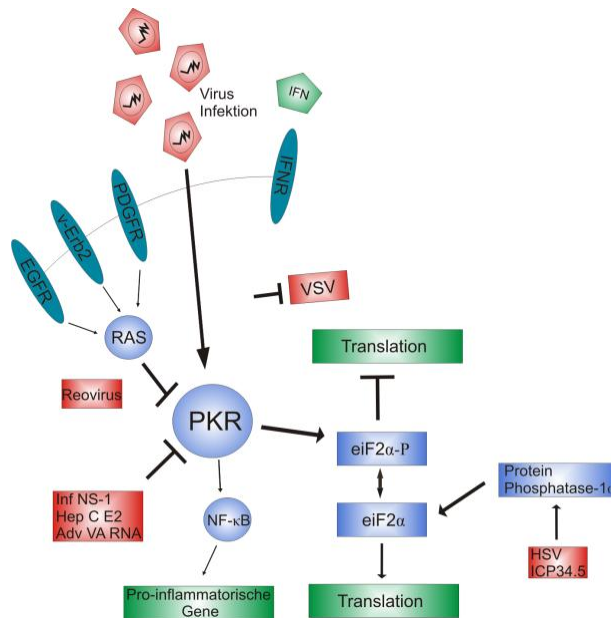
Ein vielversprechender Ansatz in der Krebstherapie sind so genannte onkolytische Viren (OV), welche die Fähigkeit haben, bei geringer Toxizität für normales Gewebe selektiv transformierte Zellen abzutöten (Chiocca, 2002).

Schon vor mehreren Jahrzehnten ist die Forschung auf das onkolytische Potenzial verschiedener Viren aufmerksam geworden. Zuerst wurde eine spontane Verbesserung der Leiden z.B. bei Leukämie-Patienten mit einer parallelen Virusinfektion beobachtet (Biermann, 1953; Pasquinucci, 1971). In den 50er - 80er Jahren wurden verschiedene onkolytische Viren (Rabies Virus, Mumps Virus, Masern Virus, Adenovirus, Newcastle Disease Virus, Sendai Virus, Semliki Virus, Influenza Virus, Egypt 101 Virus, Vaccinia Virus, Herpes Simplex 1 Virus, Reovirus) auf ihre Sicherheit und Effizienz im Menschen untersucht (Chiocca, 2002, Nemunaitis, 1999). Hierbei konnte bei einigen der verwendeten Viren eine starke Onkolyse, aber oftmals auch ein starker Neurotropismus beobachtet werden (Kelly & Russell, 2007). Dies führte zur Entwicklung der zweiten Generation onkolytischer Viren, die durch genetische Veränderungen eine verbesserte Onkoselektivität zeigten. Es gibt dabei mehrere Ansätze, um onkolytische Viren zu generieren: Deletion viraler Gene (z.B. E1B 55kd-Deletion in Adenovirus ONYX-015, Deletion der viralen Thymidin Kinase), die normalerweise zu einer Infektion und Vermehrung in normalen Zellen führen, Insertion von tumor- oder gewebespezifischen Promotoren (z.B. Insertion des tumorspezifischen E2F-Promotors in Adenovirus ONYX-411) sowie Insertion von Suizidgenen (vgl. Dobbstein, 2003; You et al, 2004). Mittlerweile gibt es bereits eine dritte Generation onkolytischer Viren, die so genannten „bewaffneten“ (armed) Viren, die nach der Infektion anti-Tumortransgene exprimieren (Liu et al, 2007; Hermiston & Kuhn, 2002).

Die Untersuchungen der Mechanismen der Onkoselektivität zeigten, dass z.B. die natürlich onkoselektiven Parvoviren prinzipiell von der S-Phase der Wirtszelle abhängig sind um sich zu vermehren. Somit sind sich schnell teilende Zellen, wie bei Tumoren, die bevorzugten Wirte (Cotmore & Tattersall, 2007). In ihrem viralen Lebenszyklus infizieren Viren durch Bindung an spezifische Rezeptoren die Zelle und unterdrücken dort die Apoptose-Signalwege, um ihr Genom zu replizieren. Anschließend werden viraler Nachkommen

produziert und freigesetzt, was mit der Zellyse endet (Chiocca, 2002). In Tumorzellen sind bereits einige apoptotische Signalkaskaden verändert, um das eigene Fortbestehen zu sichern. Abbildung 1 zeigt schematisch zwei Signalkaskaden, die in Tumorzellen häufig verändert sind und wie onkolytische Viren diese für sich nutzbar machen.

A



B

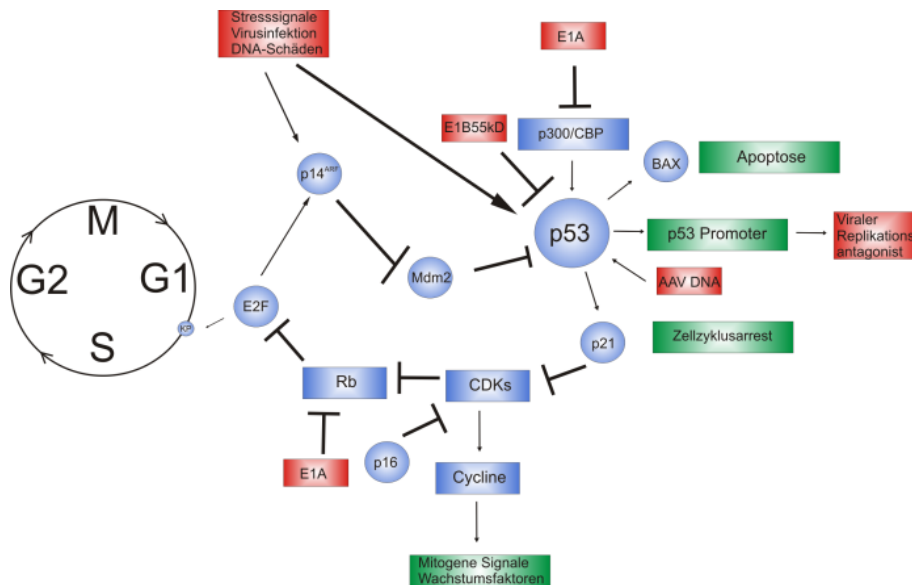


Abbildung 1: Interaktion onkolytischer Viren mit zellulären Signalwegen in Tumoren
 Blau: zelluläre Bestandteile, rot: virale Beteiligung, grün: Auswirkung
A) Interferon und RAS Signalweg und deren Interaktion mit OV bei Tumoren. Durch die Aktivierung der PKR wird die Translation abgeschaltet und die virale Replikation verhindert. RAS inhibiert die PKR. In Tumoren ist RAS oft konstitutiv aktiv. PKR = dsRNA-abhängige Proteinkinase
B) Zellzyklusregulierung durch onkolytische Viren (OV) bei Tumoren. Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führt zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose. Retinoblastom (Rb) entlässt bei seiner Hyperphosphorylierung E2F was zum Übergang der Zelle von der G1 zur S-Phase des Zellzyklus führt. Der Zellzyklus unterliegt durch feedback-loops mehrfach der zellulären Kontrolle. Tumore haben oft einen Defekt im p53, Rb oder p16-Signalbereich.
 verändert nach Chiocca et al, 2002; Everts et al, 2005

Die Doppelstrang-RNA-abhängige Protein Kinase (PKR) reagiert auf Virusinfektionen direkt, indem sie die Proteinsynthese durch die Phosphorylierung von eIF2 α abstellt. eIF2 α kann durch die Proteinphosphatase-1 α wieder dephosphoryliert werden, womit die Proteinsynthese fortgesetzt werden kann. Das virale Protein ICP34.5 des Herpes Simplex Virus (HSV) ist in der Lage die Proteinphosphatase-1 α zu aktivieren, so dass virale Proteine gebildet werden. Zusätzlich wird in nicht transformierten Zellen NF- κ B von der PKR aktiviert, was die Transkription proinflammatorischer Gene zur Folge hat und somit eine antivirale Immunantwort auslöst. Die PKR kann dann wiederum durch die Typ I Interferone (IFN- α/β) aktiviert werden, die auch im Zuge der antiviralen Immunantwort sezerniert werden. Die Aktivierung von RAS, einem Proto-Onkogen (*Rat Sarcoma*), durch den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), v-ERB2 oder den *platelet-derived growthfactor* Rezeptor (PDGFR) inhibiert die PKR (Abbildung 1 A). In vielen Tumorzellen ist die IFN-Signalkaskade dereguliert und die RAS Signalkaskade konstitutiv aktiviert. Dies hilft den Viren bei der Synthese ihrer Nachkommen in diesen Zellen. Des Weiteren haben viele Viren Möglichkeiten entwickelt, in diese Signalkaskaden einzugreifen, beispielsweise inhibieren einige virale Proteine oder RNAs direkt die PKR (Influenza NS-1, Hepatitis C E2, Adenovirus VA RNA und andere). Reoviren sind sogar abhängig von der Aktivierung von RAS für ihre Replikation.

Eine zweite in Tumorzellen oft deregulierte Signalkaskade ist der p53-Tumorsuppressor-Signalweg. Die Aktivierung von p53 in Folge von DNA-Schäden, Stresssignalen oder einer Virusinfektion führt durch p21 zur Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), zum Zellzyklusarrest und über Bax zur Apoptose der Zelle. Das Adenovirus Protein E1A bindet und inhibiert z.B. p300/CBP (CREB binding protein) einen Co-Aktivatoren von p53, was die Aktivierung von p53 unterbindet. Der Tumorsuppressor p53 wird durch die Bindung an Mdm2 degradiert. Mdm2 wiederum kann durch p14^{ARF} inhibiert werden, welches ebenfalls ein Tumorsuppressor Protein ist, das wie p53 durch Stresssignale und mitogene Signale wie E2F aktiviert wird. Der Tumorsuppressor p16 reguliert das Eintreten der Zelle in den Zellzyklus, indem er den CDK4/CDK6-cyclin-D-Komplex blockiert. Dieser Komplex führt normalerweise zur vermehrten Phosphorylierung von Retinoblastom (RB), welches darauf den Transkriptionsfaktor E2F entlässt. E2F vermittelt die Transkription verschiedener Gene, die in Zusammenhang mit dem Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus stehen, wie z.B. die Thymidin Kinase, Cyclin A und E. Einige dieser Enzyme führen zur verstärkten Produktion von dNTPs in der Zelle. E2F wird durch hypophosphoryliertes Retinoblastom (pRB) blockiert. Somit führt die Inaktivierung von pRB indirekt über p14^{ARF} zur Aktivierung

von p53 und fungiert als Sicherheitsmechanismus während des Zellzykluses. Die Inaktivierung von p53 oder der pRB-Signalwegen in Tumoren oder durch Viren führt somit zum Kontrollverlust der Zelle über den Zellzyklus (Abbildung 1 B). Einige Viren machen sich das zum Vorteil, indem sie mit diesen Zellzyklus-Signalwegen interagieren oder die veränderten Gegebenheiten in den Tumorzellen ausnutzen; z.B. benutzen HSV-Stämme mit Mutationen im Thymidinkinase (TK)-Gen die aktive Form der Tumorzelle um ihre eigenen Gene zu vervielfältigen und werden dadurch gleichzeitig onkoselektiv. Das Adenovirusprotein E1A bindet zum Beispiel an RB und sorgt für die Freisetzung von E2F, um sich zu vermehren. Somit können Viren mit inaktivem E1A-Protein nur selektiv in Tumorzellen mit defekten p16/RB-Signalwegen repliziert werden (Chiocca, 2002, Everts 2005). Die Kenntnisse der Interaktion von Viren mit diesen Signalwegen können bei der genetischen Verbesserung der Onkoselektivität von Viren helfen. Jedoch gibt es auch einige natürlich onkoselektive Viren, die nicht genetisch verändert werden müssen, wie z.B. Reoviren, das New Castle Disease Virus, das Vesicular Stomatitis Virus oder die hier verwendeten autonomen Parvoviren (Vile et al, 2002).

Die Effektivität der bisher in klinischen Studien getesteten OV's im Vergleich zu den präklinischen Untersuchungen war bisher nur begrenzt (Aghi & Martuza, 2005; Zemp et al, 2010). Somit wurde versucht, die Effizienz der Virotherapie durch Kombination mit den Standardmethoden wie Bestrahlung oder Chemotherapie zu erhöhen. Die meisten untersuchten onkolytische Viren zeigten in Kombination mit den Standardtherapieverfahren einen synergistischen Effekt, wie z.B. die Anwendung von Myxoma Virus in Kombination mit Rapamycin, einem Immunsuppressor, bei Gliomen (Lun et al, 2010) oder die Anwendung von HSV in Kombination mit Bestrahlung bei Lungenkrebs (Adusumilli et al, 2005). Bei Post et al wird gezeigt, dass die Verwendung von Adenoviren in Kombination mit Chemotherapie, Bestrahlung oder Gentherapie das Ergebnis der Tumorthherapie stark verbesserte (Post et al, 2003). Auch eine Kombination der Virotherapie mit HDAC-Inhibitoren zeigte bereits erste vielversprechende Ergebnisse (Nguyen et al, 2008). Im Allgemeinen erwies sich die Verwendung von onkolytischen Viren und Standardtherapien in Kombination als effektiver wie die Monotherapien. Einige Kombinationen von onkolytischen Viren mit Standardtherapien werden bereits in klinischen Studien untersucht. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz des Adenovirus Ad-TK in Kombination mit Suizidgentherapie gegen Gliome (Everts & van der Poel, 2005).

1.2.1 Onkolytische Viren und Glioblastome

Glioblastome bieten sich für die Anwendung von onkolytischen Viren an, da es bisher keine zufriedenstellende Therapie gibt (s.o.). Onkoselektive Viren können einzelne Tumorzellen infizieren, die für eine Operation oder Bestrahlung nicht zugänglich sind, was bei hoch infiltrativem Wachstum von Gliomen ein Vorteil ist. Durch ihre Fähigkeit vom Wirt repliziert zu werden, kann nach einmaliger Infektion eine große Menge an Tumorzellen infiziert werden. Wollmann et al haben das Potenzial einiger onkolytischer Viren, wie z.B. Vesicular Stomatitis Virus, Sindbis virus, Minute Virus of Mice und anderen, *in vitro* in verschiedenen Gliomzelllinien und *in vivo* im Mausmodell verglichen und die Verwendung als vielversprechend diskutiert (Wollmann et al, 2005). Die kleinen onkolytischen Viren, z.B. aus der Gruppe der autonomen Parvoviren, sind in der Lage, nach systemischer Applikation die Blut-Hirnschranke zu durchqueren, wodurch die Gefahren eines chirurgischen Eingriffs umgangen werden können (Geletneky et al, 2010). Mittlerweile wurden bereits einige onkolytische Viren in klinischen Studien bei Glioblastomen angewendet. Tabelle 1 zeigt Beispiele von onkolytischen Viren und deren Anwendung bei Patienten mit Glioblastomen. Bei diesen Studien war der onkolytische Effekt gering, jedoch traten nur bei zwei Patienten schwache Nebenwirkungen auf (Haseley et al, 2009; Zemp et al, 2010). Innerhalb dieser Studien konnte keine maximal tolerierbare Dosis (MTD) erreicht werden. Daher wird die Applikation von OV's ins Gehirn als sicher angenommen.

Tabelle 1: Onkolytische Viren in klinischen Studien bei Glioblastomen

Virus	Bezeichnung	Wildtyp / genetische Manipulation	Applikation
HSV-1	1716	GM	i.t./ i.a.b.
HSV-1	G207	GM	i.t./ i.a.b.
Adenovirus	ONYX-015	GM	i.a.b.
New Castle Disease virus	NDV-HuJ	WT	i.v.
New Castle Disease virus	MTH-68/H	mesogen angepasst	i.v.
Reovirus	Reolysin	WT	i.t.

Verändert nach Haseley et al, 2009; Zemp et al, 2010, GM = genetisch manipuliertes Virus, WT = Wildtyp Virus, i.t. = intratumorale Applikation, i.v. = intravenöse Applikation, i.a.b. = in das angrenzende Gehirngewebe nach Tumorresektion (in adjacent brain)

1.2.2 Onkolytische Viren und ihre Anwendung *in vivo* im Organismus

Bei der Anwendung onkolytischer Viren *in vivo* gibt es einige Aspekte zu überdenken. Wie bereits beschrieben, ist die Applikationsart ein wesentlicher Faktor. Bisher wurden die meisten Versuche mit intratumoraler Applikation durchgeführt (Zemp et al, 2010; Prestwich et al, 2008), um die Verteilung im Organismus und die Konfrontation mit dem Immunsystem möglichst gering zu gestalten (De Silva et al, 2010). Weitere Möglichkeiten, die Viren zielgerichtet in das transformierte Gewebe zu bringen, sind die Modifizierung der Kapside, die arterielle Applikation oder die Herstellung bispezifischer Antikörper (Prestwich et al, 2008). Ein anderes Hindernis bei der Verwendung onkolytischer Viren ist die antivirale Immunantwort durch Aktivierung von *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRPs), die an Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) binden und damit zur Antigenpräsentation und Erkennung infizierter Zellen führen. Dies würde zu einer frühzeitigen Eliminierung des Virus führen, und unter Umständen das Tumorstadium nicht wesentlich beeinflussen, da hier nur die infizierten Zellen erkannt würden. Zu diesen PRPs zählen unter anderem auch die *toll-like* Rezeptoren (TLRs), die im Gehirn von den Mikroglia und den Astrozyten exprimiert werden (Prestwich et al, 2009; Zemp et al, 2010). Die typische antivirale Immunantwort wird durch Typ I-Interferone (IFN- α/β) erzeugt. Diese Interferone verändern den Zellmetabolismus und limitieren somit die virale Replikation, wie in Abbildung 1 A gezeigt (Zemp et al, 2010). Auch neutrophile Granulozyten, Makrophagen (im Gehirn Mikroglia), natürliche Killerzellen (NK) und Kupferzellen sind an der antiviralen Immunantwort beteiligt (De Silva et al, 2010). Bei Lun et al ist beschrieben, dass HSV z.B. nach i.v.-Applikation vom Komplementsystem und im Gehirn von den Mikroglia effektiv beseitigt wird (Lun et al, 2010). Doch gerade bei der Therapie von Tumoren mit onkolytischen Viren gibt es immer mehr Hinweise auf eine entscheidende Rolle des Immunsystems bei der Zerstörung des Tumorgewebes (Prestwich et al, 2008; Prestwich et al, 2009; Bridle et al, 2010). Es konnte auch mehrfach beobachtet werden, dass mit onkolytischen Viren behandelte Tiere anschließend immun gegen eine wiederholte Implantation der gleichen Tumorart waren (Bridle et al, 2010, Geletneky et al, 2010).

Das Gehirn ist hierbei ein Sonderfall, da es durch die Blut-Hirn-Schranke vom restlichen Körper und somit von den im Blut zirkulierenden Immunzellen getrennt ist. Weiterhin haben die Neurone im Gehirn nur limitierte regenerative Fähigkeiten und müssen daher speziell geschützt werden. Für diese Aufgabe stehen hauptsächlich regulatorische T-Zellen und Mikroglia zur Verfügung (Graber & Dhib-Jalbut, 2009). Damit Tumore im zentralen Nervensystem wachsen können, bilden sie ein spezielles immunsupprimierendes Milieu (z.B.

durch die Freisetzung von TGF β , IL-10 und NO $_x$), bzw. rekrutieren Immunzellen, die bei der Tumorprogression helfen (z.B. myeloide Suppressor Zellen, regulatorische T-Zellen oder Tumor-assozierte Makrophagen) (Prestwich et al, 2008). Des Weiteren sind Tumore keine homogene Zellpopulation, ein Anteil besteht immer aus nicht-transformierten Zellen, die das Tumorstadium unterstützen (z.B. Fibroblasten und Endothelzellen). Dies bedeutet, dass nicht alle Zellen eines Tumors permissiv für onkolytische Viren sind. Zusammen mit der von Tumoren gebildeten extrazellulären Matrix bilden diese Zellen eine natürliche Barriere für den Eintritt von Viren (Vaha-Koskela, 2007). Somit stellt sich die Frage, wie onkolytische Viren die antivirale Immunantwort und die immunsupprimierte Mikroumgebung von Tumoren überwinden und das Immunsystem gegen den Tumor aktivieren können, bevor sie selbst vom Wirtsimmunsystem beseitigt werden.

Es gibt dabei mehrere Ansätze, die bereits erste Erfolge zeigten, wie z.B. die Manipulation der Tumormikroumgebung durch Matrixmetalloproteasen oder die Ko-Injektion von Kollagenase in Kombination mit einer HSV-Infektion. Auch die Anwendung von Hyaluronidase und Relaxin mittels adenoviraler Vektoren zeigte eine verbesserte Infektion der Tumormasse (De Silva et al, 2010). Als weitere Möglichkeit kann die Tumolvaskularisierung im Sinne der onkolytischen Virotherapie verändert werden, wobei hier kontroverse Daten existieren, die zeigen, dass anti- und pro-angiogenetische Therapien unterstützend wirken können. HSV induziert z.B. eine verstärkte Angiogenese bei Gliomen, was mit einer verstärkten Infiltration von Immunzellen einhergeht (Kurozumi et al, 2008, Wojton & Kaur et al, 2010). Die Manipulation der Immunantwort zur Unterstützung der OV's ist nicht trivial. Versuche mit Cyclophosphamid als Immunsuppressor verminderten die Anzahl der tumorassozierten Makrophagen, welche für die Angiogenese wichtige Zytokine sezernieren um die Versorgung des Tumors zu verbessern (Sica, 2011); eine hohe Dosierung von Cyclophosphamid führte jedoch zu einer Toxizität im gesunden Gewebe, da keine neutralisierenden Antikörper gebildet wurden, was wiederum zu einer Vermehrung von Reoviren in normalen Zellen führte (Qiao et al, 2008). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass OV's in der Lage sind eine Rekrutierung von NK-Zellen ins Tumorgewebe zu verursachen, was dann durch Antigenpräsentation letztendlich zur Bildung CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen führte. Die Infektion mit Reoviren konnte unter anderem eine Aktivierung der dendritischen Zellen (DCs) auslösen (De Silva et al, 2010). Eine vielfach angenommene Theorie könnte erklären, wie onkolytische Viren eine Immunantwort erzeugen, die auch gegen den Tumor gerichtet ist: Durch die Infektion werden Entzündungssignale durch virale Kapside oder Nukleinsäuren erzeugt, dadurch werden z.B. NK-Zellen rekrutiert. Diese

Gefahrensignale aktivieren auch dendritische Zellen (DCs), was dann zur vermehrten Phagozytose infizierter Zellen führt. Ein zweiter Arm dieser anti-Tumor-Immunantwort wird durch die vom Virus verursachte Zellyse von Tumorzellen erzeugt. Somit kommen die DCs in Kontakt mit Tumorzellysaten und können diese vermehrt präsentieren. Dieser Vorgang nennt sich „cross-presentation“. Dadurch wird die Bildung von zytotoxischen T-Zellen stimuliert, die dann den Tumor als fremd erkennen und zerstören. Gleichzeitig werden bei der Lyse von Tumorzellen durch die Viren erneut virale Strukturen freigesetzt, die dann wieder zur Produktion von Entzündungs- und Gefahrensignalen führen (Prestwich et al, 2008). Bei der Manipulation der Immunantwort kommt es darauf an, gezielt die antivirale Immunantwort zu verringern und die anti-Tumor-Immunantwort zu steigern. Dies ist jedoch ein oft schwieriger Spagat (Prestwich et al, 2008 & 2009; Zemp et al, 2010; Wojton & Kaur, 2010).

Ein wesentlicher Faktor bei der Anwendung onkolytischer Viren ist der Sicherheitsaspekt, insbesondere bei replikationskompetenten Viren. Hierbei ist nicht nur die Sicherheit des behandelten Patienten von Bedeutung, sondern auch die eventuelle Übertragung des Virus in die Bevölkerung zu analysieren (Vile et al, 2002). Eine weitere große Herausforderung ist nach wie vor die Produktion von genetisch homogenen Virusstocks, da Viren immer eine gewisse genetische Vielfalt aufweisen (Neumanaitis, 1999; Nemunaitis, 1999; Wisher, 2002). Des Weiteren kann die genetische Instabilität von onkolytischen Viren dazu führen, dass die vorher eingeführten genetischen Veränderungen für eine verbesserte Onkoselektivität oder Onkolyse wieder verloren gehen (Chiocca, 2002). Das ideale onkolytische Virus sollte folgende Eigenschaften haben: Es sollte selektiv transformierte Zellen inklusive deren Stammzellpopulation infizieren, dort vermehrt werden und die Zellen schließlich zerstören, idealerweise ohne schwere Nebenwirkungen in gesundem Gewebe zu verursachen. Es sollte genetisch relativ stabil sein, möglichst nicht ins Genom des Wirtes integriert werden und am Ende der Therapie inaktiviert werden können. Nicht zuletzt muss es unter GMP-Bedingungen mit ausreichend hohem Titer und Reinheit produziert werden können (Vile et al, 2002; Wisher, 2002).

Im Zuge dieser Arbeit wurde das autonome Parvovirus H-1 verwendet. Es erfüllt mehrere der genannten Kriterien eines idealen onkolytischen Virus, z.B. ist es natürlich onkoselektiv, integriert sein Genom nicht in die Wirtszelle und ist apathogen bei der Applikation beim Menschen (Toolan et al, 1965; LeCesne et al, 1993).

1.3 Parvovirus H-1

Das Parvovirus H-1 (H-1PV) gehört zu der Familie der Parvoviren (Parvoviridae, lat. *Parvus* = klein), die mit einem Durchmesser von 25 nm zu den kleinsten bekannten Viren gehören. Sie sind nicht-umhüllte Viren und haben ein Einzelstrang-DNA Genom von 5 kb, das aus nur zwei großen Transkriptionseinheiten besteht. Somit sind sie streng abhängig von den zellulären Faktoren ihres Wirtes (Kerr et al, 2006).

Die Familie der Parvoviridae lässt sich in zwei Unterfamilien, die Parvovirinae und die Densovirinae gliedern. Bei den Parvovirinae gibt es fünf Gattungen: Die Parvoviren, die Dependoviren, die Erythroviren, die Amdoviren und die Bocaviren. H-1 gehört zu der Unterfamilie Parvovirinae und darin zu der Gattung Parvovirus. Zu dieser Familie gehören auch das Minute Virus of Mice (MVM), Kilham Rat Virus (KRV), Feline Panleukopenia Virus (FPV), LuIII Virus (LuIIIV), Mouse Parvovirus 1 (MPV-1) sowie das Porcine Parvovirus (PPV). Die Mitglieder der Parvoviren sind bei ihrer Infektion „autonom“ im Gegensatz zu der Gattung der Dependoviren, die zur Replikation die Hilfe eines anderen Virus benötigen. Hierzu zählen die Adeno-assoziierten Viren (AAV) (Tattersall, 2006). Das in dieser Arbeit verwendete Parvovirus H-1 wurde 1960 erstmals von Helene W. Toolan aus Tumorexenotransplantaten (HEP-1 Zellen) in immundefizienten Ratten isoliert (Toolan et al, 1960) und daher zunächst als Tumorerursacher eingestuft. Schnell wurde jedoch festgestellt, dass dieses Virus, wie andere Parvoviren auch, im Gegenteil onkolytische Fähigkeiten besitzt (Rommelaere & Cornelis, 1991). Da H-1PV in der Lage ist, verschiedene transformierte humane und Ratten-Zelllinien zu infizieren, ist der natürliche Wirt nicht eindeutig festzulegen, dennoch wird es bei den Rattenparvoviren eingeordnet, da es von MVM klar durch seine Apathogenität in Mauszellen unterschieden werden kann (Wrzesinski et al, 2003). Als mögliche Wirtszelle im Menschen werden lymphatische Zellen diskutiert, da *in vitro* eine persistente Infektion und Replikation in B- und T-Zelllinien beobachtet werden konnte (Bass & Hetrick, 1978; Faisst et al, 1990). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einige Parvoviren Zellen des hämatopoetischen Systems, wie lymphatische, myeloide und erythroide Vorläuferzellen, befallen (Cornelis et al, 2006).

Die onkolytischen Eigenschaften von Parvoviren beruhen auf ihrer Fähigkeit das Wachstum von Tumoren zu verhindern bzw. zu vermindern oder ganz zu stoppen, die Rückbildung von Tumoren auszulösen, das Anwachsen von Tumortransplantaten zu verhindern und ein verlängertes Überleben in tumortragenden Tieren herbeizuführen (Cornelis et al, 2006; Dupressoir et al, 1989). Weiterhin konnte eine ausgeprägte Onkoselektivität nachgewiesen werden. Parvoviren wie MVM oder H-1PV sind in der Lage transformierte und normalen

Zelle gleichen Ursprungs zu infizieren, werden aber selektiv nur in den transformierten Zellen repliziert und lysieren diese dann bei der Freisetzung ihrer Nachkommen (Rommelaere & Cornelis, 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zellen durch maligne Transformation sensitiv für die Replikation von H-1PV werden (Chen et al, 1986; Faisst et al, 1989).

1.3.1 Genomorganisation, virale Proteine und Lebenszyklus von H-1PV

Bei den Parvoviren ist das Minute Virus of Mice ein Modellorganismus, an dem die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden. Dieses Virus ist dem hier verwendeten Parvovirus H-1 sehr ähnlich, daher wird angenommen, dass viele Prozesse dort in ähnlicher Weise stattfinden. Das Parvovirus H-1 trägt in seinem Kapsid eine Kopie des linearen 5176 Basen langen DNA-Einzelstranges mit negativer Polarisierung (Berns, 1990). An den Enden befinden sich palindromische Sequenzen von 120-420 Basen, die Haarnadelstrukturen bilden. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der so genannten „*rolling-hairpin*“-Replikation der Parvoviren (Kerr et al, 2006). Die Sequenz der Parvovirus-DNA hat einen relativ hohen GC-Gehalt (41-53 %), was mit der sehr hohen Kodierungsrate einhergeht (Cotmore & Tattersall, 2006). Das Genom besteht aus zwei großen Transkriptionseinheiten (eine frühe und eine späte Einheit), drei Leserastern (ORF 1-3) und acht Genprodukten die in gleicher Richtung transkribiert werden (von 3' nach 5'). Auf Grund der geringen Größe des Genoms werden die verschiedenen Proteine (NS-1-3, VP1-2) durch multiple Spleißvarianten aus demselben Genombschnitt erzeugt (Morgan & Ward, 1986). Für die Transkription der einzelnen Genabschnitte sind zwei Promotoren verantwortlich: Der P4-Promotor für die NS- oder *rep*-Gene und der P38-Promotor für die VP- oder *cap*-Gene (Cotmore & Tattersall, 2006). Die für die einzelnen Proteine kodierenden Sequenzabschnitte des Genoms sind in Abbildung 2 zusammen mit den verschiedenen Spleißvarianten angegeben.

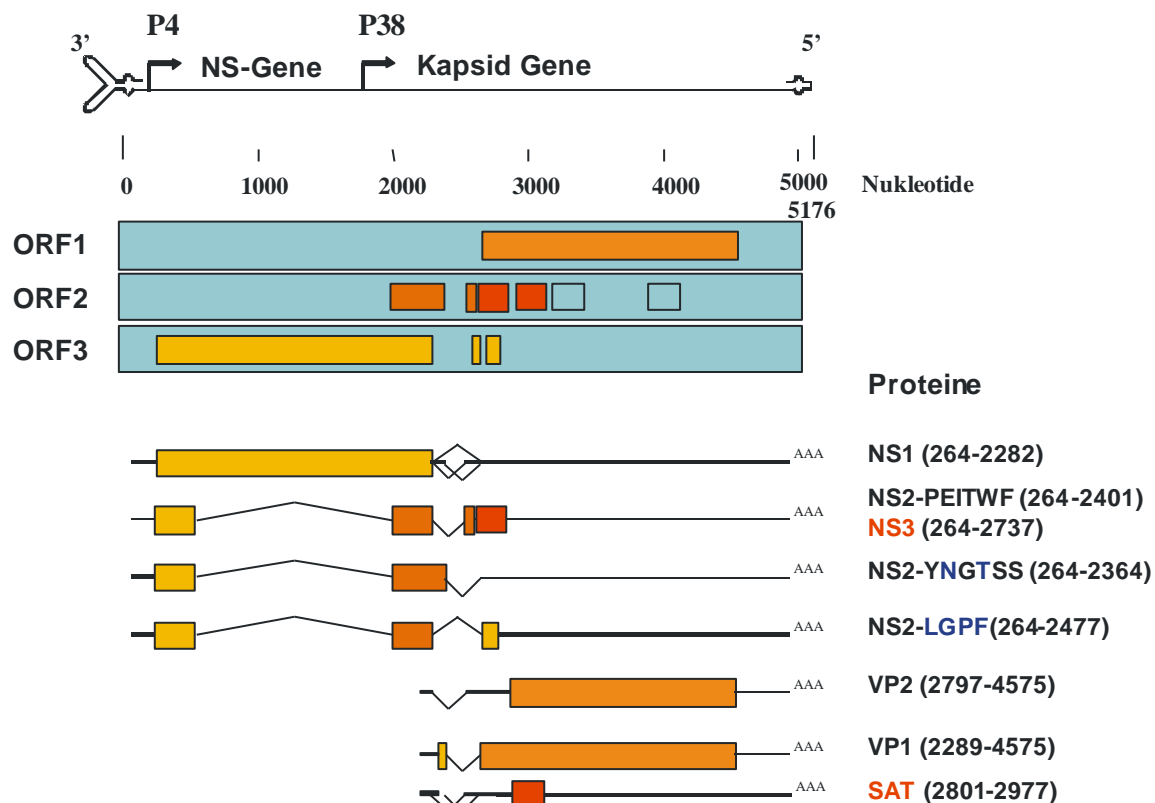


Abbildung 2: Genomorganisation von H-1PV

Aufbau und Organisation des Genoms von H-1PV von 3'-nach 5' mit den *hairpin*-Strukturen am C und N-Terminus. Im oberen Teil der Abbildung ist das Genom von H-1PV mit der Lage der Promotoren, die für die Transkription der NS- (P4) und der Kapsid(VP)-Gene (P38) verantwortlich sind, dargestellt. Darunter sind die 3 großen Transkriptionsuntereinheiten (ORF 1-3) des Genoms mit Kästchen für die kodierenden Bereiche angeben. Im unteren Teil sind die verschiedenen Spleißvarianten der mRNA, die für die einzelnen Proteine kodieren, zu sehen. Dünne Linien zeigen die Introns, die bei der Prozessierung entfernt werden. Mit freundlicher Genehmigung von J. P. F. Nüesch

1.3.1.1 Infektion

Der parvovirale Lebenszyklus in der Wirtszelle beginnt mit der Bindung des Virus an einen Rezeptor. Für einige Parvoviren konnte der Transferrinrezeptor (CPV) oder der Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor (AAV2) als Bindungsstelle identifiziert werden (Vihinen-Ranta et al, 2004). Der Rezeptor für die Internalisierung von H-1PV ist hingegen noch nicht bekannt (Rommelaere et al, 2005), für MVM konnte jedoch eine Bindung an Sialinsäurereste in der Membran gezeigt werden (Kerr et al, 2006). Hierbei spielt die Kapsidhülle eine wesentliche Rolle. Das Kapsid der Parvoviren besteht aus 60 Molekülen VP2 und 12 Molekülen VP1 und ist in ikosaedrischer Form aufgebaut (Kongsvik et al, 1974). Von diesem Kapsid ist unter anderem der Wirtstropismus und die Erkennung durch antivirale Antikörper abhängig (Agbandje-McKenna & Chapman, 2006). Das Kapsid von H-1PV besitzt eine große Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen, kann aber mehrere strukturelle Veränderungen auf dem Weg von der Zellmembran bis zum Nukleus durchlaufen, die zum Teil pH-abhängig sind (Vihinen-Ranta et al, 2002). Dabei werden in verschiedenen Phasen und an verschiedenen Stellen Teile

des Genoms aus dem Kapsid geschoben und prozessiert (Parrish, 2010). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine endosomale Ansäuerung für die Infektion entscheidend ist (Ros et al, 2002). Nach der Bindung an den entsprechenden Rezeptor werden die Viren sehr schnell, wahrscheinlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose, in die Zellen aufgenommen (Vihinen-Ranta et al, 2004), durch endosomalen Transport in die Nähe des Zellkerns gebracht und dort ins Zytoplasma entlassen. Der genaue Mechanismus, der zur Freisetzung der viralen Partikel aus den Endosomen führt, ist bisher nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das N-terminale Ende des VP1-Proteins ein Phospholipase A₂-Motif (PLA₂) beinhaltet, welches durch die Präsentation außerhalb des Kapsid aktiviert wird. Somit könnte eine Veränderung der endosomalen Membran durch die PLA₂ an der Freisetzung der viralen Partikel ins Zytoplasma beteiligt sein (Zádori et al, 2001; Mani et al, 2005). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die PLA₂-Aktivität für die Infektiosität der Viren von entscheidender Bedeutung ist (Tijssen et al, 2006). Vom Zytoplasma werden die Viren entlang von Zytoskelettbestandteilen (Mikrotubuli) dann aktiv in den Kern transportiert, wobei z.B. Teile des MVM-Gnoms, die aus dem Kapsid herausragen, durch das Proteasom prozessiert werden (Ros et al, 2002). Der Transport in den Nukleus erfolgt über die Kernporen und ist ein aktiver, ATP-abhängiger Vorgang, welcher durch Kernlokalisationssequenzen (KLS) gesteuert wird. Einige KLS konnten im N-terminalen Bereich des VP1-Proteins nachgewiesen werden. Dieses Proteinstück kann durch strukturelle Kapsidänderungen in Abhängigkeit von den intrazellulären Gegebenheiten zeitweilig aus dem Kapsid ragen (Vihinen-Ranta et al, 2002). Der Transport vom Zytoplasma in den Kern ist eher langsam und dauert oft mehrere Stunden (Vihinen-Ranta et al, 2004, Kerr et al, 2006). Auf dem Weg in den Zellkern eines Wirtes wird das 5'-Ende des Genoms mit dem kovalent gebundenen NS-1 entfernt, innerhalb des Kerns bindet aber sehr schnell wieder ein NS1-Protein an die virale DNA (Cotmore & Tattersall, 1989; Kerr et al, 2006). Die Größe der Kernporen ist hier der limitierende Faktor für die Größe der viralen Partikel. Im Nukleus wird die DNA aus den Kapsiden freigesetzt, wobei bisher nicht geklärt wurde, wie dieser Vorgang abläuft. Es sind zwei Möglichkeiten denkbar: 1. Das 3'-Ende des Genoms wird durch strukturelle Kapsidänderungen freigesetzt und die DNA-Replikation startet, wobei die DNA aus dem Kapsid gezogen wird. 2. Die Kapside werden im Kern degradiert (Kerr et al, 2006).

1.3.1.2 Replikation

Die DNA-Replikation der Parvoviren folgt einem *rolling-hairpin*-Mechanismus der dem *rolling-circle*-Mechanismus von Bakterien ähnelt, aber speziell an die Gegebenheiten von Parvoviren adaptiert ist (Cotmore & Tattersall, 2006). Für die virale Amplifikation ihres Genoms sind die Parvoviren streng von der S-Phase des Zellzyklus der Wirtszelle abhängig, können diese aber nicht selbst einleiten. Das bedeutet, dass die Viren in der Zelle persistieren, bis diese in die S-Phase geht. Dabei müssen sie es schaffen unerkannt zu bleiben (Kerr et al, 2006). Für die DNA-Vermehrung rekrutieren die Parvoviren die zelluläre DNA-Polymerase, welche jedoch ein ds-DNA-Stück als Primer benötigt, um den ss-DNA-Strang von 5' nach 3' zu vervollständigen. Dafür besitzen Parvoviren die *hairpin*-Strukturen, die auf beiden Seiten des Genoms aus palindromischen Sequenzen bestehen, welche sich dann zu einem komplementären ds-DNA Bereich zusammenlagern und somit als Primer für die DNA-Polymerase fungieren. Diese *hairpin*-Strukturen beinhalten die *origins of replication* und unterscheiden sich auf beiden Seiten des Genoms. Sie sind mit dafür verantwortlich, dass bei MVM und auch H-1PV überwiegend Minusstrang-DNA gebildet und in die neuen Kapside verpackt wird (Cotmore & Tattersall, 1994, Cotmore & Tattersall, 2005).

Die Vermehrung der viralen DNA ist stringend von Cyclin A abhängig, was wiederum für den Übergang des Zellzyklus in die S-Phase verantwortlich ist (Bashir et al, 2000). Durch den Übergang in die S-Phase wird E2F freigesetzt, was zur Stimulierung des P4-Promotors führt, der für die Synthese der NS-Proteine verantwortlich ist (siehe 1.2, Deleu et al, 1999). Das virale NS1-Protein bindet kovalent an die virale DNA und rekrutiert zelluläre Transkriptionsfaktoren, wodurch der zelluläre Replikationskomplex so umprogrammiert wird, dass vorwiegend virale DNA gebildet wird (Kradny & Ward, 1995). Hierbei spielen unter anderem die zellulären Proteine RPA (ss-DNA-binde-Protein: Replikationsprotein A) und GMEB (Transkriptionsfaktor: glucocorticoid-modifying element-binding protein) eine entscheidende Rolle (Christensen & Tattersall, 2002). Durch die Kombination mit GMEB kann NS1 seine Seiten- und Strang-spezifische *nicking*-Aktivität ausüben, deshalb wird dieser auch Parvovirus Initiationsfaktor (PIF) genannt (Christensen et al, 2001). Die ss-DNA wird dann von der zellulären DNA-Polymerase zum Doppelstrang (mRF: monomere replikative Form), und während der *rolling-hairpin*-Replikation zu tetrameren (dRF: doppelte replikative Form) oder höheren Konkatemeren vervielfältigt. Diese werden dann am Ende des Replikationszyklus in ss-DNA-Genome geschnitten und in die Kapside verpackt (Cotmore & Tattersall, 2006). Für die Translation der VP-Proteine wird die Aktivierung des P38-Promotors durch NS-1 über dessen Transaktivierungsdomäne benötigt (Legendre &

Rommelaere, 1992); NS1 stimuliert aber auch zusätzlich seinen eigenen Promotor P4 über einen positiven *feed-back loop* (Rhode et al, 1985). Da jedoch nie eine direkte Bindung von NS-1 an die Promotoren gezeigt werden konnte, ist eine Beteiligung zellulärer Proteine nicht auszuschließen. Zum Beispiel konnte eine Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor SP1 bei der Stimulierung der Promotoren gezeigt werden (Kradly & Ward, 1995). Die nach der Translation im Zytoplasma gebildeten Proteine müssen für den Bau und die Beladung der Kapside wieder in den Zellkern transportiert werden. NS1 besitzt hierfür Kernlokalisierungssignale, wohingegen NS2 so klein ist, dass es einfach durch die Kernporen hindurch gelangen kann. Das NS2-Protein hat jedoch einen Abschnitt, der zur Ausschleußung aus dem Kern führt (siehe unten), daher befinden sich > 70 % der gebildeten NS2-Proteine im Zytoplasma. (Nüesch, 2006).

Während des Replikationszyklus üben die NS-Proteine weitere pleiotrope Funktionen aus, welche durch die Menge an Proteinen, deren intrazellulärer Verteilung und der zeitlich unterschiedlichen Phosphorylierung durch Proteinkinasen C (PKC λ & PKC η) reguliert werden (Cotmore & Tattersall, 1986; Corbau et al, 2000; Lachmann et al, 2003; Daeffler et al, 2003; Nüesch, 2006). Die Phosphorylierung von NS1 durch Proteinkinasen spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Amplifikation und der Koordinierung des *rolling-hairpin*-Mechanismus, sowie bei der Bildung von NS-Komplexen mit sich selbst und zellulären Proteinen, wobei NS1 auch als Adapter für die Interaktion verschiedener zellulärer Proteine fungieren könnte (Nüesch, 2006). Für NS1 wurden weiterhin diverse funktionelle Domänen charakterisiert. Wilson et al konnten zeigen, dass NS-1 mehrere enzymatische Aktivitäten ausüben kann: Eine ATPase und eine ATP-abhängige Helikase Domäne wurden identifiziert (Wilson et al, 1991). Somit kann NS1 durch ATP-Hydrolyse Energie für den Aufbau von Proteinkomplexen und die Trennung der ds-DNA-Stücke der *replication-origins* während der Replikation und für seine 3`-5`-Helikase-Aktivität aufbringen (Christensen & Tattersall, 2002). Weiterhin gilt NS1 als verantwortlich für die Zytotoxizität von Parvoviren für transformierte Zellen (Caillet-Fauquet et al, 1990, Mousset et al, 1994; Anouja et al, 1997).

Das virale NS2 Protein wird von der gleichen Transkriptionseinheit wie NS1 kodiert, ist jedoch 140-230 nt kürzer je nach Parvovirusart (Vihinen-Ranta & Parrish, 2006, vgl. Abbildung 2). Das NS2 Protein bildet drei Unterformen (PEITWF, LGPF, YNGTSS; vgl. Abbildung 2), deren Bedeutung bisher nicht geklärt ist (Valle, Riolobos, Almendral, 2006). Es konnte aber gezeigt werden, dass NS2 für die Replikation im natürlichen Wirt des Virus (Ratte) benötigt wird (Li & Rhode, 1991). Für das virale Protein NS2 konnte bisher keine enzymatische Funktion gezeigt werden, es interagiert jedoch mehrfach mit zellulären

Proteinen (CRM1 & Proteine der 14-3-3 Familie). Der nukleare Exportrezeptor CRM1 spielt eine Rolle bei der Ausschleusung der Viren aus dem Zellkern (Eichwald et al, 2002), während die Proteine der 14 3 3 Familie an der Regulation von Proteinkinasen und Phosphatasen beteiligt sind (Brockhaus et al, 1996). Weiterhin wird vermutet, dass NS2 eine Helferfunktion für NS1 ausübt, mit dem es zusammen für die Zytotoxizität der Viren verantwortlich ist (Brandenburger et al, 1990).

Die Funktion der Proteine SAT und NS3 konnte bisher nicht geklärt werden. SAT gehört jedoch auch zu den Nicht-Struktur-Proteinen, dessen Expression aber vom Kapsidgenpromotor P38 kontrolliert wird (Zadori et al, 2005).

1.3.1.3 Freisetzung viraler Nachkommen

Nach der Replikation der viralen Genome und Synthese der Proteine werden neue Kapside aus den VP-Proteinen gebildet. Die im Zytoplasma gebildeten Proteine VP1 und VP2 werden durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung prozessiert (Valle, Riolobos, Almendral, 2006). Sie lagern sich zu Trimeren, wahrscheinlich aus zwei VP2 und einem VP1 zusammen und werden dann durch ihre Kernlokalisierungssignale (VP1: nuclear localisation sequence (NLS), VP1 & VP2: nuclear localisation motif (NLM)) in den Zellkern transportiert (Lombardo et al, 2000 & 2002, Kerr et al, 2006). Im Zellkern bilden sich charakteristische Strukturen, die so genannten Parvovirus-assoziierte *replication bodies*, in denen eine Anreicherung von VP-Trimeren, NS-Proteinen und viraler DNA mit zellulären Proteinen (SGT, PCNA) beobachtet werden kann (Cziepluch et al, 2000). Dort werden dann aus den VP-Proteinen die Kapside zusammengesetzt, wobei gezeigt werden konnte, dass VP2 alleine in der Lage ist, Kapside zu bilden, während VP1 eine Rolle bei der späteren Infektiosität der Partikel spielt (Tullis et al, 1993). Weiterhin wird eine Funktion von VP1 bei der Packung der viralen DNA in die Kapside sowie bei der „Reifung“ der vollen Kapside angenommen (Kerr et al, 2006). Bei der Verpackung der viralen DNA ins Kapsid konnte eine Interaktion von NS1, das kovalent an das 5'-Ende der neu synthetisierten DNA gebunden ist, mit den Kapsidproteinen beobachtet werden. Hierbei ist jedoch noch nicht geklärt, wie der zeitliche Ablauf stattfindet, ob zuerst die Kapside vollständig gebildet werden, oder NS1 schon während des Zusammenbaus an die Kapside bindet. Das Genom wird jedoch von 3' nach 5' ins Kapsid geschoben, woran die Helikase-Aktivität von NS-1 beteiligt ist (King et al, 2001). Anschließend werden die vollen Kapside aus dem Kern, mit Hilfe einer *nuclear exition sequence* (NES) im N-terminale Ende von VP2, welches aus dem fertigen Kapsid herrausragt, ausgeschleust (Agbandje-McKenna et al, 1998, Kerr et al, 2006). Die Ausschleusung der

Viren aus der Zelle erfolgt in Vesikeln entlang des Zytoskeletts und ist abhängig von Gelsolin, einem Protein, das am Abbau von Aktinfilamenten beteiligt ist (Bär et al, 2008). Die Zelllyse wird erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion ausgelöst, da zuerst neue Viren gebildet werden müssen (Daeffler et al, 2003).

Im Laufe des viralen Lebenszyklus sind die Parvoviren, trotz ihres kleinen Genoms von nur 5 kb, in der Lage Zellen zu infizieren, die Kontrolle über die zelluläre Replikationsmaschinerie zu übernehmen und starke zytopathologische Veränderungen hervorzurufen, die dann letztendlich zum Tod der Wirtszelle führen. Diese pathologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene, sowie im Organismus sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.3.2 Zytopathogenität und Interaktion mit dem Immunsystem

Parvoviren wie H-1PV sind (wie bereits beschrieben) mit einem natürlichen Onkotropismus ausgestattet. Sie werden bevorzugt in transformierte Zellen repliziert, lysieren diese und sind apathogen für die parentalen, nicht transformierten Zellarten. Diese Eigenschaft beruht z.T. auf den in transformierten Zellen veränderten Signalwegen, was zu einer verbesserten Replikation der Viren in diesen Zellen führt (Rommelaere & Cornelis, 1991). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Freisetzung des Zellzyklusaktivators E2F alleine nicht genügt, um die virale Replikation zu ermöglichen (Deleu et al, 1998). Hingegen führt die Aktivierung von RAS zur Stimulation des MAPK-Signalweges, was wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren (ATF/CREB-Familie) aktiviert, die dann an den P4-Promotor binden und diesen stimulieren können (Perros et al, 1995). Der P4-Promotor enthält weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Transformation von Zellen spielen und eine Auswirkung z.B. auf c-Myc oder SV40largeT haben (Cornelis et al, 2006). Um die entsprechenden Zellen sensitiv für die Zytotoxizität von H-1PV zu machen, reicht die Expression der Oncogene c-Myc und Ha-Ras nicht aus, jedoch führt eine Mutation von p53 zu einer Sensitivität von z.B. Rattenfibroblasten und anderen Zellen für das Virus (Telerman et al, 1993; Cornelis et al, 2006). Weiterhin wird die Rolle von Hormonen bei der Auslösung eines toxischen Effekts von H-1PV angenommen (Vanacker et al, 1993). Die Pathogenität von H-1PV scheint somit stark abhängig von der passenden Wirtsspezies und intrazellulärer Faktoren zu sein. Herrero Y Calle konnte zeigen, dass sich die Replikation und Zytotoxizität von H-1PV sogar in verschiedenen transformierten Zellen der gleichen Krebsentität unterscheidet (Herrero Y Calle et al, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass transformierte

und nicht transformierte Zellen keine unterschiedliche Effizienz bei der Aufnahme der Viren oder der Akkumulation viraler DNA zeigen, dass aber die Transkriptionsrate bei transformierten Zellen und somit die mRNA-Menge erhöht ist (Cornelis et al, 1990). Somit wird die Zytotoxizität von H-1PV für verschiedene Zellen offenbar auf dem Transkriptionslevel reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass auch in nicht transformierten Zellen virale DNA und NS-1 detektiert werden kann, die Infektion dort aber abortiv verläuft (Mousset et al, 1994).

H-1PV ist in der Lage, zytostatische und zytotoxische Effekte in den permissiven Zellen zu verursachen. Hierbei wurden die Dysregulierung von zelleigenen Promotoren, Einzelstrang-DNA-Brüche sowie die Veränderung der zellulären Proteinsynthese und Phosphorylierung beobachtet (Anouja et al, 1997; Legendre et al, 1992; Op De Beeck et al, 2001). Die Infektion mit H-1PV führt in der Zelle zu so genannte zytopathischen Effekten (CPE), die als morphologische Änderungen der Zellen zu beobachten sind. Die Zelle rundet sich ab und löst sich von der Oberfläche der Zellkulturschale. Diese Veränderungen werden durch Zellzykularrest am S/G2 Übergang, die Umprogrammierung intrazellulärer Signalwege und den Abbau von Zytoskelettfilamenten wie Aktin, Vimentin und Tropomyosin verursacht (Nüesch et al, 2005). Erst in einer späten Phase der Infektion, nachdem neue Viren produziert wurden, kommt es dann zum Zelltod und der Lyse, wobei die restlichen intrazellulären viralen Partikel freigesetzt werden. Der Zelltod kann, in Abhängigkeit von der Wirtszelle, auf verschiedenen Wegen eintreten (Daeffler et al, 2003; Nüesch, 2006). Die Induktion von beiden Apoptosewegen über Caspase 8 und 9 wurde für Parvoviren in Abhängigkeit von der Wirtszelle durch das Auftreten von *apoptotic bodies* beschrieben (Rayet et al, 1998; Cornelis et al, 2006). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Caspase 8–Apoptoseweges ohne die Bindung von Liganden (TNF, Fas Ligand, TRAIL) an die sogenannten Todesrezeptoren (*death-receptors*) stattfinden kann (Ohshima et al, 1998; Rayet et al, 1998; Di Piazza et al, 2007). Parvovirus H-1 kann auch zu einem nekrotischen Tod der Zelle führen, wenn die intrazelluläre NAD-Konzentration abnimmt (Ran et al, 1999). Die Anwesenheit von Kathepsin B in Gliomen nach Infektion mit H-1PV deutet auch auf einen nicht-apoptotischen Zelltod hin (Di Piazza et al, 2007). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass nach einer Infektion mit H-1PV das NS-1-Protein zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies führt, welche dann die infizierte Zelle in die Apoptose treiben (Hristov et al, 2010).

In vivo konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit Nagerparvoviren im Tier oftmals zu einer verlängerten DNA-Persistenz in der Niere mit anschließender Ausscheidung über Urin führt (Parrish, 2006). Der Übertragungsweg von H-1PV zwischen Tieren ist bisher nicht bekannt, aber für andere Parvoviren konnte die Übertragung durch Urin (Ratvirus; Jacoby et al 1996) oder Stuhl (Canine Parvovirus; Hueffer et al, 2004) nachgewiesen werden. Nach der Infektion von Tieren und auch Menschen (Toolan, 1965) konnten im Serum Antikörper gegen H-1PV nachgewiesen werden, wobei die Bildung antiviraler Antikörper nicht immer zwangsläufig zur Beendigung der Infektion führt (Guglielmino et al, 1978; Kerr et al, 2006; Rommelaere et al, 2010). Unter bestimmten Umständen führte eine Infektion mit H-1PV zu pathologischen Veränderungen. In neugeborenen Mastomys-Mäusen und bei neonataler Infektion von Hamstern kam es zu pathologischen Erscheinungen (Toolan, 1960; Haag et al, 2000). Bei Li und Rhode traten sogar lethale Infektionen bei neugeborenen Ratten auf (Li & Rhode, 1991). Pathologische Effekte traten jedoch immer nur bei früher Infektion (bei neonataler oder intrauteriner Infektion) der Tiere auf, offenbar bedingt dadurch, dass sich die Zellen in der Entwicklung der Tiere vermehrt teilen (ähnlich wie Tumorzellen) und somit sensitiv für zytopathische H-1PV-Effekte sind.

Jedoch konnte bei der Infektion von humanen kindlichen Astrozyten, humanen Gliazellkulturen und embryonalen Fibroblasten *in vitro* kein toxischer Effekt von H-1PV beobachtet werden (Lacroix et al, 2010). Bei Infektionen im Menschen zeigte sich, dass H-1PV apathogen ist und bisher keine maximal tolerierbare Dosis erreicht wurde (Toolan, 1965; Le Cesne, 1993). Weiterhin scheint H-1PV im Menschen nicht zu persistieren und aus dem Organismus nach einer bestimmten Zeit wieder verdrängt zu werden. Welche Rolle hierbei das Immunsystem spielt oder ob das Virus einfach ausgeschieden wird, ist bisher nicht geklärt, jedoch konnte 40 Tage nach Infektion kein Virus im Blut, im Tumor oder der Leber der behandelten Patienten nachgewiesen werden (Toolan, 1965). Interessanterweise gab es bei einer experimentellen Infektion Hinweise dafür, dass H-1PV sich im Tumorgewebe vermehrte, ebenso wurde in nicht-infizierten Metastasen virale DNA nachgewiesen (Le Cesne, 1993).

Die Pathogenität von H-1PV *in vivo* ist auf die direkte virale Zelllyse und wahrscheinlich auch auf Immunvorgänge zurückzuführen. Es konnten direkte und indirekte Effekte der Virusinfektion auf das Immunsystem des Wirtes beobachtet werden (Rommelaere et al, 2010). Prinzipiell sind Teile des angeborenen (NK-Zellen) sowie des adaptiven Immunsystems (T-Zellen) in der Lage, durch die Infektion mit Parvovirus H-1 aktiviert zu werden. Moehler et al konnten zeigen, dass H-1PV in der Lage ist humane Antigen-

präsentierende Zellen und zytotoxische T-Zellen zu stimulieren (Moehler et al, 2005). Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Immunkomponenten ist zurzeit ein Schwerpunkt der Parvovirusforschung. Interessanterweise trat nach einer *intratumoralen* Infektion im Rattenmodell keine starke lokale Entzündungsreaktion auf (I. Kiprianova, persönliche Mitteilung). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Infektion mit MVM in der Maus die NK-Zellpopulation aktiviert wird, aber keine Typ I Interferone im Tumorgebiet detektiert werden konnten. Während im Serum der Tiere ein hoher Antikörpertiter nachweisbar war, war die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen eher gering (Rommelaere et al, 2005). Nach Infektion von Melanomzellen mit H-1PV konnte die Freisetzung des Hitzeschockproteins HSP72 beobachtet werden, dadurch kam es dann zur Antigenpräsentation und einer Tumorummunität (Srivastava, 2002; Moehler et al, 2003). Wie oben bereits beschrieben, ist das Auslösen einer T-Zell-vermittelten anti-Tumor-Immunität durch die virusinduzierte Lyse von Tumorzellen die wahrscheinlichste Interaktion mit dem Immunsystem, die dann zur vollständigen Beseitigung des Tumors beiträgt (Moehler et al, 2003; Prestwich et al, 2008; Rommelaere et al, 2010). Dies wäre auch eine Erklärung für den langanhaltenden Schutz der Versuchstiere vor einer neuen Tumorzellimplantation (challenge), ohne dass die Anwesenheit des Virus erneut festgestellt werden konnte (Guetta et al, 1986; Rommelaere et al, 2010).

1.3.3 Vorteile einer Anwendung von Parvovirus H-1 zur onkolytischen Virotherapie

Das im Zuge dieser Arbeit verwendete Parvovirus H-1 hat einige Vorteile, die für seine Anwendung für die onkolytische Virotherapie beim Menschen sprechen:

- a) H-1PV ist ein natürlich vorkommendes onkoselektives sowie onkolytisches Rattenvirus. Es muss daher nicht genetisch verändert werden, was ein bedeutender Sicherheitsaspekt ist.
- b) In der Bevölkerung liegt keine Prä-Immunität gegen H-1PV vor (Siegl et al, 1984). Bei einer Untersuchung der Mitarbeiter unserer Abteilung konnte gezeigt werden, dass H-1PV wenig infektiös ist; da auch bei den Tierpflegern, die in täglichem Kontakt mit infizierten Tieren sind, keine Antikörper gegen H-1PV nachgewiesen werden konnten (J. Lacroix, nicht veröffentlichte Daten).
- c) Das onkolytische Potenzial von H-1PV konnte bereits mehrfach *in vitro* und *in vivo* in der Ratte und der Maus gezeigt werden: z.B. bei humanen Burkitt Lymphomzellen (Angelova et al, 2009a), bei Ratten und humanen Gliomen *in vitro* und *in vivo* (Herrero Y Calle et al, 2004; Geletneky et al, 2010; Kiprianova et al, 2011), bei der Therapie von Lungenmetastasen von Morris Hepatomen (MH3924A) in der Ratte (Raykov et al, 2004), bei

Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und im Mausmodell (Grekova et al, 2011), bei humanen Zervixkarzinomen und Mammakarzinomen in der Maus (Dupressoir et al, 1989; Faisst et al, 1998; Van Pachterbeke et al, 1993, 1997).

d) Bei der Anwendung von H-1PV im Menschen konnten bisher keine Pathogenität und keine ernsthaften Nebenwirkungen festgestellt werden, es gab sogar Hinweise auf virale Replikation im Tumorgewebe und in nicht infizierten Metastasen konnte Virus nachgewiesen werden (Toolan et al, 1965; Le Cesne, 1993).

f) Obwohl bei allen behandelten Menschen und Tieren antivirale Antikörper und eine Virämie im Blut auftraten, war die virusinduzierte Immunantwort vergleichsweise gering (Rommelaere et al, 2005 & 2010). Somit geht die Infektion nicht mit einer für den Patienten eventuell kritischen Entzündung einher.

g) Bei Wolter et al konnte gezeigt werden, dass das Kilham rat virus preferenziell die Lymphknoten als Reservoir nutzt und dort eine verstärkte IFN γ -Antwort erzeugt, die bei der anti-tumoralen Immunantwort eine Rolle spielt (Wolter et al, 2009). Diese Eigenschaft wird auch für die anderen Parvoviren diskutiert.

h) Ebenso stellte sich heraus, dass H-1PV einen Vakkzinierungseffekt auslöst, da es infizierte Tiere vor einem Tumorwachstum nach Implantation von transformierten Zellen bzw. vor chemisch induzierten Tumoren schützen kann (Geletneky et al, 2010; Guetta et al, 1986; Toolan et al, 1968).

i) Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien ein Synergismus von H-1PV mit konventionellen Tumorthapien gezeigt werden, was das Virus sehr interessant für die Behandlung von rekurrenden Tumoren macht. Zum Beispiel konnte ein Synergismus von H-1PV mit Gemcitabin, einem Zytostatikum, bei der Behandlung von duktalem pankreatischen Adenokarzinom-Zelllinien (PDAC) (Angelova et al, 2009b) sowie ein Synergismus von H-1PV und Bestrahlung bei Gliomzellen (Hartkopf, 2007/ Geletneky et al, 2010) gezeigt werden. Neueste Versuche zeigen synergistische Effekte von Retinsäure und H-1PV in Neuroblastomezellen (A. ten Haaf, persönliche Mitteilung). Auch bei der Kombination von onkolytischen Viren miteinander konnte gezeigt werden, dass Parvovirus H-1 zusammen mit Reovirus *in vitro* zu einer vermehrten Zelllyse in humanen U87 Gliomzellen führte (Alkassar et al, 2011).

j) Ein weiterer Vorteil ist, dass die DNA von H-1 nach der Infektion nicht in das Wirtsgenom integriert wird und somit keine latente Infektion auslöst, im Gegensatz zu AAV (Rommelaere et al, 2005). Das bedeutet, dass H-1PV wahrscheinlich nach Zerstörung der permissiven

Wirtszellen, d. h. des Tumorgewebes, wieder aus dem Organismus eliminiert wird und danach auch keine Ansteckungsgefahr besteht.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Therapieerfolg abhängig vom Zeitpunkt der Infektion, der applizierten Menge an Virus, der Größe des Tumors und der Sensitivität der transformierten Zellen für die Onkolyse, sowie die virale Replikation ist. Des Weiteren spielt die Erzeugung einer starken anti-Tumor-Immunantwort gegenüber einer unterdrückten oder schwachen antiviralen Immunantwort eine wesentliche Rolle (Rommelaere et al, 2005).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit und im Hinblick auf die Anwendung von H-1PV zur onkolytischen Gliom-Virotherapie beim Menschen sollen wichtige Aspekte der Biologie von Parvovirus H-1 *in vivo* im Rattenmodell untersucht werden:

- 1) Es sollen die Ausscheidungs- und Übertragungswege der viralen Partikel nach den verschiedenen Infektionsarten wie *intracerebral* und *intravenös* untersucht werden, wobei analysiert wird, ob die Ausscheidungen der hier verwendeten Ratten infektiös sind und wenn ja, in welchem Zeitraum.
- 2) Durch eine virale Replikation im Tumorgebiet könnte ein so genannter Bystander-Effekt ausgelöst werden, wobei durch sekundäre oder tertiäre Infektionsrunden mehr Tumorzellen nach einmaliger Applikation infiziert und lysiert würden. Bei der Infektion von Ratten-Glioblastomzellen *in vitro* kommt es zu einer effizienten Vermehrung von H-1PV inklusive Synthese infektiöser Nachkommen. Hier soll die Möglichkeit von Parvovirus H-1, sich *in vivo* im Tumorgebiet zu vermehren, analysiert werden.
- 3) Es soll die *intranasale* Route für eine Applikation von H-1PV ins Gehirn untersucht werden, da diese Methode auch vom Patienten einfach durchzuführen wäre und nicht die Risiken eines chirurgischen Eingriffs birgt.
- 4) Zur Optimierung von H-1PV für die Gliomtherapie beim Menschen wurde das Virus an humane Gliomzellen angepasst und die Onkoselektivität des veränderten Virus überprüft. Dabei wurden die aufgetretenen genetischen Veränderungen analysiert und die Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV über den Adaptationsprozess verfolgt, da die Geschwindigkeit, mit der genetische Veränderungen auftreten, ein wesentlicher Sicherheitsfaktor bei der Applikation von H-1PV im Menschen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Substanz	Beschreibung	Hersteller / Lieferant
AGS für die Zellkultur	Astrocyte Growth Supplement	ScienCell™ Research Laboratories, Provitro GmbH, Berlin
Agar für Plaque Assay	Bacto Agar™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agar für LB-Platten	Agar Powder Standard Grade, 500g	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Agarose für Gelelektrophorese	Agarose NEO Ultra Qualität, ROTI®AGAROSE f d DNA/RNA Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co KG, Nürnberg
Ampicillin	AmpTabs™ Ampicillin tablets, 25mg/Tab,	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn
BSA für Restriktionsverdau	purified BSA 100X, 10 mg/ml, 0,25 ml,	New England Biolabs, Ipswich USA
Zytotoxizitätstest; LDH-Release	Zytotox96® Non-Radioactive Zytotoxicity Assay Kit	Promega Corporation, Madison, USA
DMEM für die Zellkultur	Dulbecco`s modified eagle`s medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
DMSO für Einfriermedium	Dimethylsulfoxid Rotipuran® ≥99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co KG, Nürnberg
DNA Größenmarker: a) PCR b) Southern Blot	a) GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus, 0,5µg/µl b) λ/HindIII , 0,5µg/µl	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Ladepuffer	6X Orange Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Desinfektionslösung für die Tierversuche	Eutasept G Lösung	Bode Chemie, Hamburg
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat Dinatriumsalz 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Eindeckelmedium für Mikroskopie	a) Kaisers Glyceringelatine für die Mikroskopie b) Eukitt® c) DAPI-haltiges Eindeckelmedium d) Elvanol, Polyvinylalkohol	a) Merck KGaA, Darmstadt b) O. Kindler GmbH, Freiburg c) Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, USA d) MP Biomedicals LLC, Illkirch, Frankreich
Eosin für die Gewebefärbung	Accustain® Eosin Y Lösung, wässrig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich, Karlsruhe
Essigsäure für die Fixierung von Zellen	Eisessig 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich, Karlsruhe

Substanz	Beschreibung	Hersteller / Lieferant
Ethidiumbromid für Gelelektrophorese		Boehringer, Ingelheim
FCS für Zellkultur	fötales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ficoll400 für Denhardt's Lösung	Ficoll®PM 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd für die Fixierung von Zellen	Formaldehyd 4 %, Formalin 10 %, wässrige Lösung, gepuffert	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
X-Gal für Bakterienselektion auf Agarplatten	40 mg/ml in DMF	US Biological, Swampscott, USA
Gelextraktionskit	PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin für die Zellkultur	100X L-Glutamin, 200mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycerol für Kryokonservierung der Plasmide	Glycerol 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich, Karlsruhe
Hefeextrakt	Standard grade, low salt	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Heringssperma DNA für Southern Blot	DNA from fish sperm, solution 10mg/ml, 500ml	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Hämatoxylinlösung für Gewebefärbungen	Accustain® Haematoxylin Lösung, Gill No. 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich, Karlsruhe
Iodixanol für die Virusaufreinigung	OptiPrep® Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
IPTG für Bakterienselektion auf Agarplatten		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Isofluran für die Narkose von Versuchstieren		Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kaliumchlorid	KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck KGaA; Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	Merck KGaA; Darmstadt
Kontrastmittel für MRT-Messungen	Omniscan, 0,5 mM/ml	Nycomed Germany Holding GmbH, Konstanz
Kristallviolett für die Färbung fixierter Zellen		Sigma-Aldrich Chemie GmbH-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
2 X MEM für Plaque Assay	+L-Glutamin / Gibco	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
MTT-Lösung für Vialitätsfärbung von Zellen	100 mg ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in 20 ml PBS steril filtriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe

Substanz	Beschreibung	Hersteller / Lieferant
Na-Acetat		Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxyd	NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck KGaA; Darmstadt
Neutralrot für die Färbung der Plaque-Assays	Lösung (3,3g NR/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Objektträger für Gewebeschnitte	poly-L-Lysine coated coverslips	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
PCR-Supermix	PCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe
Phenolrot für Iodixanolgradient	Phenolrot ACS	Merck KGaA, Darmstadt
Plasmid-Präparationskits	a) QIAprep® Spin Miniprep Kit b) Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polyvinylpyrrolidon für Denhardt's-Lösung		Merck KGaA, Darmstadt
Proof-reading Polymerase	Platinum®Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol für MTT-Test		VWR International, Bruchsal
Proteinase K für Southern Blot	20 mg/ml	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
P/S für die Zellkultur	10 units/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	EcoRI, PstI, NcoI, high conc., 40 U/µl,	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
SDS für Southern Blot	Dodecylsulfat-Na-Salz in Pellets	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Sepharose-Säule zur Sondenreinigung	PGS50 in TE, Sephadex™ G-50 Fine, Amersham Biosciences	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
T4 DNA Ligase für die Klonierung	400,000 U/ml, 0,05 ml,	New England Biolabs, Ipswich, USA
TA-Cloning-Kit	The Original TA Cloning® Kit, pCR® 2.1 vector	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Clontech Advantage®-HF 2PCR Kit,	Clontech Laboratories Incorporation, Mountain View, USA
TaqMan System für die qPCR	TaqMan Universal PCR Mastermix 2X	Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien
Tris-HCl		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Tri-Na-Citrat		VWR ProLabo, VWR International GmbH, Darmstadt

Substanz	Beschreibung	Hersteller / Lieferant
Triton für die Permeabilisierung von Zellmembranen	Triton®X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau für die Zellzählung	3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphthyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl]	Merck KGaA KGaA, Darmstadt
Trypsin für die Zellkultur	0,25 % Trypsin-EDTA 1 ×	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Vectastain Kit für die Färbung fixierter Zellen	Elite® PK-6200 Universal, Vectastain® ABC Kit	Biozool, Eching
Chromogen für das Vectastain Kit	Dako Cytomation, Liquid DAB + Substrat Chromogen System	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Xylol für die Gewebefärbung	Xylol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegen Serum	Normal Goat Serum (10 %)	KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA
Zitronensäure für die Kristallviolett-Lösung		Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2 Materialien

Material	Beschreibung	Hersteller/Lieferant
Deckgläser für Zellkultur	Slideslips, Cover glasses, 7 x 30 mm,	Neolab, Heidelberg
EDTA-Blutröhrchen	Microvette® CB 300	Sarstedt, Nümbrecht
Einfriergefäße für die Zellkultur	1 ml	Nunc, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Gewebekulturschale	Falcon Easy Grip™ Tissue Culture Dish, 35 X 10 mm	BD (Becton, Dickinson und Company), Heidelberg
Glasspritze zur Implantation	10 µl Glasspritze	Hamilton Company, Nevada, USA
Kanülen	a) 27 G (0,4 X 20 mm), grau, steril b) 20G, gelb, BD Microlance™ 3	a) Terumo Neolus, Terumo Corporation, Leuven, Belgien b) Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Klebefolien für die qPCR	MicroAmp™ Optical Adhesive Film, PCR compatible,	Applied Biosystems, Carlsbad, California
Well-Platten	6/12/24/48/96-Well-Platten Nunclon™ Delta Surface	Nunc, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark

Material	Beschreibung	Hersteller/Lieferant
96-Loch Platte für die qPCR	a) twin.tec real-time PCR plates 96, white skirted b) PP	a) Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf b) Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Nahtmaterial	Ethilon 4-0, FS-2S, 45 cm	Johnson & Johnson, Neuss
Nylonmembran für Southern Blot	Amersham Hybon™-XL,	GE Healthcare, München
Petri Schalen	Ø 6 cm, 10 cm, 15 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß für die qPCR	0,2 ml Thermo-Tube,	Thermo Scientific, Bonn
Röhrchen für Virusgradient in Iodixanol	SETON, Re-Seal™ Centrifuge Tubes, 25X89 mm	Beranek Laborgeräte, Weinheim
Röntgenfilm	Fuji medical x-ray film, Super RX, Fuji Safelight Glass No. 8U	Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan
Skalpell	No. 20, Feather, Sicherheits Einmal-skalpell	Osaka, Japan
Spritzenfilter	0,45 µm, Renner Einweg-Filterhalter	Renner GmbH, Dannstadt
Transfermembran	GeneScreen Hybridization Transfer Membrane	Perkin Elmer, Waltham, USA
Tupfer für Speichelproben	sterile swab applicator Tipp flocced with Nylon fiber, Größe: 501CS01	Copan Diagnostics, Corona, USA
Zellkulturflaschen		Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Cell Lifter, 70-2180, sterile	BIOLOGIX Research Company, Lenexa, USA

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Blotentwicklermaschine	Agfatek Classic Eos + Chemix	Agfa, Mortsels, Belgien
Brutschrank	Sanyo MIR-162 CO ₂ Inkubator	Sanyo Electronic Co., Ltd, London, UK
Cryoslicer	Leica CM 3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Digitalkamera am Mikroskop	Olympus E-620	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Digitalkamera zum Gele fotografieren	Olympus SP-500UZ	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
ELISA Reader	Multiskan EX	Thermo Scientific, Thermo Electron Corporation, Herts, UK

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Mikroskop: Olympus IX81 Quecksilber-Dampf-Lampe: Olympus U-RFL-T Ar-multi line laser: 458, 488, 515 nm excitation Laser: 594 nm excitation	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Gelelektrophoresekammern	Horizon® 11-14 Gibco BRL Horizontal Gelelectrophoresis Apparatus	Life Technologies, Carlsbad, USA
Oberschalenwaage	Kern572	Kern, Balingen
Hybridisierungsöfen	PersonalHyb®	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn
Mikroskop	Olympus IMT-2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Magnetresonanztomograph	Bruker B-C 24/40, 2,3 Tesla	Bruker Bio Spin, Rheinstetten
Oberschalenwaage	Sartorius 1204 MP	Sartorius, Göttingen
PCR-Maschine	PTC-100™ Programmable Thermal Controller	MJ Research Inc., GMI Inc., USA
Photometer für die Bestimmung der DNA Konzentration	NanoDrop ND-1000	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Plattenzentrifuge	Eppendorf AG Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
qRT-PCR Maschine	Eppendorf AG realplex ² Mastercycler, epgradient S	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Stereotaktischer Rahmen	Model 906 Rat Anesthesia Mask, Model 5000 Microinjection Unit, Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Stratalinker UV	UV Stratalinker1800	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn
Tischzentrifuge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 1-15 K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Karlsruhe
Zählkammer	Neubauer improved	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Zentrifuge Zellkultur	Eppendorf AG Hermle ZK 380	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

2.1.3 Software

Anwendung	Programm	Hersteller
Bearbeitung der Bilder	Photo Shop	Adobe Systems GmbH, München
	JASC® Paint Shop Pro Version 8	Jasc Software
Bearbeitung der Grafiken	Corel Draw	Corel Corporation, Ottawa, USA
Berechnung MOI, Auswertung MTT, LDH	Microsoft Excel 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Bestimmung der DNA-Konzentration	Nanodrop, ND-100 V3.7.1	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELISA Reader	Ascent Software for Multiskan, Version 2.6	Thermo Scientific, Thermo Electron Corporation, Herts, UK
Fluoreszenzmikroskop	FluoView1000	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Gelfotografien	Capture 100 (Version 1.0.1)	GE Healthcare, München
MRT	Bruker Para Vision 4.0	Bruker Bio Spin, Rheinstetten
Primer design & Analyse	Primer 3 Primer design – IDT DNA Oligo Analyzer	http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi http://bioweb.uwlax.edu/genweb/molecular/seq_anal/primer_design/primer_design.htm http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Sequenzanalysen	Clone Manager Professional Suite	Sci Ed Central, Cary NC, USA
Tumorvolumetrie am MRT	MRIcon	NITRC, http://www.nitrc.org/projects/mricron

2.1.4 Puffer und Lösungen

Bacto-Agar-Gemisch für Plaque Assay:	<u>Lösung 1:</u> 2 × MEM ohne Phenolrot mit 20 % FCS und 2 % P/S vorgewärmt auf 37 °C <u>Lösung 2:</u> 1,7 % Bacto-Agar in H ₂ O, autoklaviert, warm gehalten auf 48°C 5ml von Lösung 1 + 3 ml von Lösung 2
Denhardt`s-Lösung 100X:	10 g BSA, 10 g Ficoll400, 10 g Polyvinylpyrrolidone, mit Wasser auf 500 ml auffüllen, filtrieren, aliquotieren, bei -20 °C aufbewahren
Denaturierungspuffer:	10 g NaOH, 43,83 g NaCl, mit Wasser auf 500 ml auffüllen
Einfriermedium:	60 % DMEM + 30 % FCS + 10 % DMSO
Elektrophorese Puffer (EP):	2 M Tris, 0,25 M NaAc, 0,05 M EDTA, pH 7,8
Eosinlösung:	1 g Eosin in 100 ml Wasser lösen; Arbeitslösung: 720 ml Ethanol 70 %, 80 ml Eosinlösung 1 %, 8 ml Eisessig 100 %
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml in Wasser
Hybridisierungslösung:	15 ml SSC 20 X, 10 ml SDS 10 %, 1 ml EDTA 0,5 M, 10 ml Denhardt`d 100 X, 1 ml Heringssperma (5 min 95 °C gekocht), mit Wasser auf 100 ml auffüllen und bei 37 °C lösen
Iodixanol-Lösungen: (Stocklösung 60 % Iodixanol in Wasser)	55 % Iodixanol: 40 ml Iodixanol + 3,64 ml PBS-MK + Phenolrot (gelb) 40 % Iodixanol (Virusfraktion): 30 ml Iodixanol + 15 ml PBS-MK 25 % Iodixanol: 20 ml Iodixanol + 28 ml PBS-MK + Phenolrot (rot) 15 % Iodixanol: 12 ml Iodixanol + 27 ml PBS-MK + 9 ml 3M NaCl (in PBS-MK)
Kristallviolett-Lösung:	0,1 M Zitronensäure, 0,1 % Kristallviolett in Wasser, pH 7,0

LB-Medium:	100 g Select Pepton Tryptone, 50 g Hefeextrakt, 50 g NaCl, auf 10 L mit Wasser, pH 7, autoklavieren
LDH-Substrat-Mix:	12 ml Assay Puffer 37 °C + 1 Flasche Substrat-Mix-Puder, lichtsensitiv!
MTT-Lösung:	100 mg MTT-Pulver in 20 ml PBS gelöst, steril filtriert
Neutralrotlösung für Plaque Assay:	1,4 ml 2 × PBS + 0,19 ml Neutralrot, vorgewärmt auf 37 °C, und 1,4 ml Bacto Agar, auf 48 °C gewärmt pro Platte
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris pH 7,5; 97,66 g NaCl; mit Wasser auf 500 ml auffüllen
PBS:	Phosphat gepufferte Saline, 80 g NaCl, 2 g KCl, 2g KH ₂ PO ₄ , 14,4 g Na ₂ HPO ₄ X 2H ₂ O auf 10 L mit Wasser, pH 7,2
2 X PBS:	Lösung 1: 16 g NaCl + 0,4 g KCl in 800 ml H ₂ O Lösung 2: 1,33 g KH ₂ PO ₄ + 0,62 g K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O in 200 ml H ₂ O, pH 6,5
PBS-MK:	500 ml 1XPBS, 500 µl 1M MgCl ₂ , 500 µl 2,5 M KCl (steril filtriert)
Phenolrot:	0,5 % Stocklösung (0,25 g Phenolrot + 50 ml PBS-MK)
Proteinase K-Puffer:	50 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,2 % SDS
20 X SSC:	876 g NaCl + 441 g tri-Na-Citrat, mit H ₂ O auf 5 L
TE:	1 mM Tris-Cl, 0,01 mM EDTA pH 8
Trypanblau-Lösung:	(0,5 g/100 ml) in NaCl-Lösung (0,9 g/100 ml) steril filtriert
VTE:	33 ml 1,5 M TrisHCl pH 8,7; 1 ml 0,5M EDTA in 1 L H ₂ O
Waschlösung 1:	30 ml SSC 20 X, 20 ml SDS 10 %, mit Wasser auf 200 ml auffüllen
Waschlösung 2:	3 ml SSC 20X, 20 ml SDS 10 %, mit Wasser auf 200 ml auffüllen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle hier verwendeten Zelllinien sind adhären wachsende Zellen und wurden in sterilen 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zelllinien wuchsen in DMEM mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Antibiotika (Penicillin / Streptomycin = P/S) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Eine Ausnahme hiervon bildeten die kindlichen Astrozyten, welche in DMEM mit 10 % FCS, 1 % P/S und 1 % AGS (Astrocyte Growth Supplement) kultiviert wurden.

Sobald der Zellrasen konfluent war, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium komplett vom Zellrasen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin bei 37 °C vollständig vom Boden der Zellflaschen gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in der Flasche belassen und ein Teil verworfen oder auf neue Flaschen übertragen. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie wurden die Zellen höher oder niedriger gesplittet (1:4 bis 1:20).

Keine Zellen wurden länger als drei Monate durchgehend in Kultur gehalten. Zur Beobachtung und Fotografie der Zellen wurde ein Lichtmikroskop mit angeschlossener Digitalkamera verwendet, die Bilder wurden in 100-facher und 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff bei Raumtemperatur aufgetaut und schnell in die Zellkulturflaschen mit DMEM und den entsprechenden Zusätzen überführt.

Um Zellen einzufrieren wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in 5 ml Medium aufgenommen und die Zellsuspension für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro min (UpM) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Einfriermedium vorsichtig resuspendiert und in spezielle Kryotubes überführt. Die Tubes wurden mit Papier umwickelt und stufenweise bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort gelagert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer „improved“ verwendet. Die zu zählende Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau verdünnt, um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können. In allen vier Großquadraten (ein Großquadrat =

schwarzer Kreis in Abbildung 3) wurde die Anzahl der ungefärbten, lebenden Zellen gezählt. Mit der folgenden Formel konnte anschließend die Zellzahl pro ml ermittelt werden:

$$\text{Mittelwert} \left(\frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Großquadrat}} \right) \times 2_{(\text{Trypanblau Verdünnung})} \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

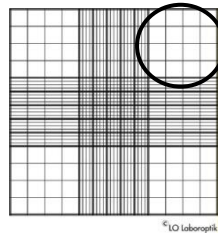


Abbildung 3: Neubauer Zählkammer "improved"
Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl der lebenden und toten Zellen einer Suspension.

Quelle: <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>

2.2.1.4 Wachstumskurven

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humane sowie Ratten-Zelllinien verwendet:

RG2:	Rattenglioblastom-Zellen
D7 und E6:	nicht transformierte, humane embryonale Fibroblasten
MRC5:	nicht transformierte, humane Fibroblasten aus der Lunge
NBK:	humane, embryonale Nierenzellen, SV40-transformiert
U87:	humane Glioblastom-Zellen
NCH 37:	humane Gliosarkom-Zellen
NCH 82 / 89 / 125 / 149:	humane Glioblastom-Zellen
NCH 307:	humane Glioblastom-Zellen nach Bestrahlung im Patienten

Die humanen NCH-Linien wurden aus Patientenmaterial der Kopfklinik Heidelberg von Dr. Herold-Mende etabliert und zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien D7 und E6 waren von Prof. Schlehofer in Berlin etabliert worden, RG2, NBK, MRC5, kindliche Astrozyten und U87 wurden von der American Type Culture Collection gekauft (LGC Standards, <http://www.lgcstandards-atcc.org/ATCCulturesandProducts/CellBiology/CellLinesandHybridomas/tabid/981/Default.aspx>).

Für einige dieser Zelllinien wurde die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt. Dafür wurden die verschiedenen Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und über einen Zeitraum von 11 Tagen, täglich die Anzahl der lebenden Zellen in zwei Wells gezählt. Tabelle 2 zeigt die Anzahl der ausgesäten Zellen pro Well für die verschiedenen Zelllinien.

Tabelle 2: Zellzahlen für die Wachstumskurven

Zelllinie	Zellzahl / Well
RG2	5×10^4
NBK	2×10^5
U87	2×10^5
NCH89	2×10^5
NCH149	5×10^4
NCH82	5×10^4
NCH307	5×10^4
NCH125	5×10^4
NCH37	5×10^4

Anzahl der Zellen pro Well ausgesät an Tag 0 für die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien

Anhand der Wachstumskurven wurde die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt.

2.2.2 Virusproduktion

2.2.2.1 Produktion der verwendeten Virusstocks

Die hier verwendeten H-1PV Wildtyp Virusstocks wurden durch B. Leuchs (Abteilung Tumorstudiologie, DKFZ) hergestellt, aufgereinigt und der jeweilige Titer in pfu / ml bestimmt. Für alle Versuche mit den adaptierten Virusvarianten wurden die Klone sowie die Wildtyp Viren selbst hergestellt:

Die auf NCH 149 produzierten Virusklone wurden auf NBK-Zellen, der H-1 Wildtyp auf RG2-Zellen vermehrt, um einen möglichst hohen Titer zu erreichen. Dafür wurden 41 15 cm-Petrischalen mit NBK-Zellen für jeden Virustyp ausgesät, vor der Infektion eine Schale ausgezählt und serumfrei ($\text{MOI } 3 \times 10^{-2}$ pfu / Zelle) infiziert. Sobald ein CPE zu sehen war (nach etwa 3 bis 5 Tagen) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellen wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 UpM vom Überstand getrennt und in 10 ml VTE aufgenommen. Durch dreimaliges Frieren und Tauen (-20°C und RT) wurden die Zellen aufgebrochen und die Viren aus den Zellen gelöst. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet erneut in 10 ml VTE zwei Mal gefroren und getaut. Die beiden Überstände wurden vereinigt und bei 4°C bis zur Aufreinigung gelagert; das Pellet wurde verworfen. Die Virusstocks für die Zellkulturversuche wurden in kleinerem Maßstab produziert und nicht aufgereinigt.

2.2.2.2 Virusreinigung durch Iodixanol Gradient

Die Aufreinigung der Virusstocks für die Tierversuche erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank. Die autoklavierten Zentrifugenröhrchen wurden wie folgt mit einer sterilen Pasteurpipette befüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösungen vorsichtig untergeschichtet wurden und die Bildung von Luftblasen vermieden wurde. Der Dichtegradient setzt sich folgendermaßen zusammen:

20 ml Virussuspension, 7 ml 15 % Iodixanol, 5 ml 25 % Iodixanol mit Phenolrot, 4 ml 40 % Iodixanol, 4 ml 55 % Iodixanol mit Phenolrot.

Anschließend wurden die Röhrchen austariert, durch Zuschmelzen verschlossen und 2,5 h bei 10 °C und 50 000 UpM zentrifugiert (Rotor 20,2 Ti). Die Röhrchen wurden danach in der sterilen Arbeitsbank mit einer Kanüle oben vorsichtig zum Luftaustausch angestochen und mit einer anderen Kanüle auf einer 5 ml Spritze wurde vorsichtig die 40 % Iodixanolfraction aus dem Röhrchen gezogen und bei 4°C bis zur Verwendung aufgehoben. Die Aufbewahrung der Iodixanollösungen erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Die Konzentration der Virusstocks wurde anschließend mit Hilfe von Plaque Assays (pfu/ml) sowie qRT-PCR (virale Genome (Vg)/ml) bestimmt (siehe 2.2.3.3 und 2.2.4.4).

2.2.3 Infektionen und Färbungen von Zellen

Für die Experimente wurden H-1PV-sensitive Zellen mit verschiedenen Viruspräparationen oder Gewebe- bzw. Ausscheidungsproben in verschiedenen Konzentrationen infiziert bzw. behandelt. Ausgehend von der angegebenen Konzentration der Virusstocks in plaque forming units pro Milliliter (pfu/ml) wurden die Verdünnungen entsprechend der gewünschten Multiplizität der Infektion (MOI) pro Zelle in serumfreiem Medium (DMEM ohne Zusätze) vorbereitet. Alle Infektionen erfolgten frühestens 24 h nach Aussaat der Zellen. Vor der Infektion wurde das Medium vollständig vom Zellrasen entfernt. Die Infektion erfolgte in serumfreiem Medium in einem dünnen Flüssigkeitsfilm für mindestens 1h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde den Zellen erneut vollständiges Medium zugegeben.

Die infizierten Zellen wurden prinzipiell in einem separaten Brutschrank, getrennt von den nicht infizierten Zellkulturen der verschiedenen Linien, aufbewahrt.

2.2.3.1 Färbung vitaler Zellen mit MTT-Lösung

Für die Bestimmung der Viabilität der Zelllinien nach Virusinfektion wurden jeweils 5×10^3 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät, nach 24 h infiziert und zum gewünschten Zeitpunkt (z.B. bei deutlichem Auftreten eines zytopathischen Effekts; CPE) mit MTT-

Lösung gefärbt. Dieser Farbstoff wird von den Mitochondrien in stoffwechselaktiven Zellen umgesetzt und färbt somit die lebenden Zellen blau (Mosmann, 1983). Hierfür wurde direkt in das Zellmedium 5 µl MTT-Lösung gegeben und die Zellen bis zu einer deutlichen Blaufärbung bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Mikroskops. Je nach metabolischer Aktivität der Zelllinien dauerte die Umwandlung des Farbstoffes 15 min bis mehrere h. Danach wurde das Medium vollständig vom Zellrasen entfernt. Dies erfolgte bei den hier verwendeten adhärennten Zelllinien durch Umstürzen der Platten auf Papiertücher. Die Platten wurden anschließend mindestens eine Nacht über Kopf getrocknet. Der Farbstoff wurde am Messtag durch Zugabe von 100 µl 2-Propanol und durch sanftes Schütteln vollständig gelöst. Dann wurde die Extinktion an einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Zur Messung der Hintergrundabsorption diente eine leere Platte mit 2-Propanol; als Kontrolle wurden auf jeder Platte unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Viabilität wurde mit Hilfe von Microsoft Excel in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

2.2.3.2 Messung der Zelllyse mittels LDH-Test

Bei diesem Versuch wurde die Ausschüttung des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) ins Zellkulturmedium als indirektes Maß für die Zelllyse gemessen. Dadurch sollte untersucht werden, ob die adaptierten Viren aufgrund ihrer Mutationen einen toxischen Effekt auf nicht transformierte Zellen haben. Die Tests wurden mit dem Zytotox96® Non-Radioactive Zytotoxicity Assay Kit wie folgt durchgeführt:

Die Zellen (E6, D7, MRC5 und kindliche Astrozyten) wurden wie beim MTT-Test in 96-Well-Platten ausgesät und 24 h danach mit Virus in den verschiedenen MOIs (10, 5, 2,5, 1, 0,5) behandelt. Nach 3 und 5 Tagen wurde die Ausschüttung der LDH gemessen. Dabei wurde eine Reihe unbehandelter Zellen mit 10 µl Lysepuffer komplett lysiert, um die maximale LDH-Freisetzung als 100 % Kontrolle bestimmen zu können. Dieser Vorgang dauerte 10 bis 45 min und wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurde die Platte für 5 min bei 1200 UpM bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden in eine neue Platte überführt und dazu 50 µl des Substratmixes zugegeben. Die Mischung wurde ca. 30 min abgedeckt bei RT inkubiert, bis die Lysekontrollen eine stark rote Färbung zeigten. Dann wurde sofort 50 µl Stopplösung zugegeben und die Extinktion bei 492 nm in einem Photometer gemessen. Zur Bestimmung des Hintergrunds wurde eine Reihe mit Medium ohne Zellen mitgeführt.

2.2.3.3 Bestimmung der Konzentration infektiöser Viren mit Plaque Assay

Mit Hilfe dieser Methode wurden die Titer von Virussuspensionen oder die Viruslast in Organhomogenisaten von infizierten Tieren bestimmt. An Tag 1 wurden 5×10^5 NBK-Zellen in 6 cm-Petrischalen ausgesät und anschließend über Nacht in DMEM mit 5 % FCS und 1 % P/S im Brutschrank kultiviert. An Tag 2 wurde das Medium vom Zellrasen entfernt, die Platten mit der zu bestimmenden Probe in einem Volumen von 400 μ l (50 μ l Probe + 350 μ l DMEM ohne Zusätze) versetzt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die Kontrollschalen wurden mit 400 μ l DMEM ohne Zusätze behandelt. Um ein Austrocknen des Zellrasens zu vermeiden, wurden die Schalen alle 10 min geschwenkt. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig vom Zellrasen entfernt und die Zellen mit 8 ml einer Bacto-Agar- und 2 X MEM-Mischung überschichtet. An Tag 6 wurde das Agargemisch auf den Schalen mit einer Neutralrotlösung, welche die lebenden Zellen rot färbt, überschichtet. An Tag 7 wurden die Plaques (= durch Viren verursachte Löcher im Zellrasen) ausgezählt. Abbildung 4 zeigt eine gefärbte Petrischale an Tag 7 des Plaque Assays.

Jede Verdünnungsstufe der zu untersuchenden Probe wurde in Dublikaten analysiert. Aus den gezählten Plaques beider Schalen wurde der Mittelwert berechnet. Die Anzahl der Plaques wurde auf 1 ml hoch- und mit der jeweiligen Verdünnung der Originallösung verrechnet.

Bsp.:

Schale 1: 5 Plaques

Schale 2: 7 Plaques

$$\begin{aligned} \text{Mittelwert} &= 6 \text{ Plaques} \times 20_{(\text{Infektion mit } 50 \mu\text{l Probe} \times 20 \approx 1 \text{ ml})} \\ &= 120 \frac{\text{Plaques}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnungsstufe (z. B. } 10^{-5}) \\ &= 1,2 \times 10^7 \text{ Pfu/ml} \end{aligned}$$

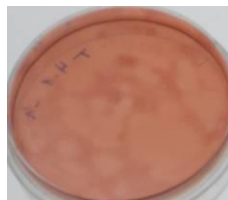


Abbildung 4: Plaque Assay Schale
Plaque Assay Schale mit NBK Zellen nach der Färbung an Tag 7:
Löcher im Zellrasen (weiß) werden ausgehend von einzelnen Viren
verursacht und können dann ausgezählt werden

2.2.3.4 Zytotoxizitäts-Assay

Um zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Proben (Gewebe und Ausscheidungen von Ratten) infektiöse Viren enthalten, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Der Ablauf entspricht dem einer Infektion (s.o.). Zur Analyse der Ausscheidungs- und Organproben von infizierten Ratten wurden RG2- bzw. NBK-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 100 µl der gelösten (Speicheltupfer) bzw. homogenisierten Probe (Kot- / Organproben) behandelt. Dies geschah entweder serumfrei (wie die Virusinfektion) oder die Probe wurde direkt in das Medium über dem Zellrasen pipettiert, um eine gegebenenfalls auftretende Änderung des pH-Wertes abzupuffern. Anschließend wurden die Zellen täglich mikroskopisch untersucht, bis ein CPE auftrat; falls dies nicht der Fall war, wurde der konfluente Zellrasen ein Mal gesplittet und schließlich verworfen.

Diese Methode eignet sich auch für eine schnelle und grobe Bestimmung der Virenlast von Proben. Hierfür wurden 48-Well-Platten verwendet, die mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe der Probenlösungen infiziert wurden (Abbildung 5).

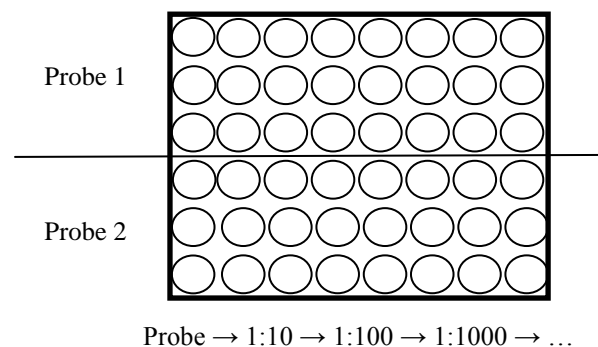


Abbildung 5: Infektionsschema der Zytotoxizitätstests
 Infektionsschema einer 48 Well-Platte für die Zellkultur bei der Untersuchung von Gewebeproben auf die Anwesenheit von infektiösem H-1PV in Triplikaten

Mit diesem experimentellen Verfahren wurde ebenfalls die virale Replikation der Virus-Subklone im Vergleich mit dem H-1PV Wildtyp über einen Zeitraum von 3 Tagen untersucht. Die verschiedenen Zelllinien wurden in 6 cm-Petrischalen ausgesät und nach 24 h mit einer MOI von 1 infiziert. Mit jedem Klon wurden 4 Schalen infiziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (4 h, 1, 2 und 3 Tage) mit einem Zellschaber geerntet. Die Zellen wurden für 10 min bei 1000 UpM zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet in 100 µl Virus-Tris-EDTA-Puffer (VTE) aufgenommen. Nach 3 Frier-Tau-Zyklen wurden 50 µl der Proben für Southern Blot-Analysen eingesetzt und 10 µl für eine Verdünnungsreihe auf den oben beschriebenen 48-

Well-Platten zur Bestimmung der Zunahme lebender Viren über 3 Tage. Anschließend wurde ein Kristall-Violett-Assay durchgeführt.

2.2.3.5 Untersuchung der Zytotoxizität und viralen Replikation in Zellen

Diese Methode ähnelt der MTT-Methode und zeigt die Zellen, welche nach einer Infektion nicht vom Virus lysiert wurden, an. Die Platten werden jedoch nicht photometrisch ausgewertet und die Infektion wird in größeren Zellkulturschalen durchgeführt. Der Vorteil hierbei ist, dass man zytotoxische bzw. zytostatische Effekte mit bloßem Auge erkennen kann.

Beim Kristall-Violett-Assay wurden die Zellen in 12-, 24- oder 48-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit verschiedenen MOIs / Verdünnungen der Virusstocks infiziert. Sobald die nicht infizierten Kontrollen konfluent waren (5 bis 7 Tage nach Infektion) wurde das Medium vom Zellrasen vorsichtig entfernt und die Zellen mit einer kalten Mischung aus Essigsäure und Ethanol im Verhältnis 1:3 für 20 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei RT mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde unter fließendem Wasser abgespült und die Zellen mit einer Kristall-Violett-Lösung für mindestens 1 h bei RT gefärbt. Die überschüssige Farblösung wurde dann wieder unter fließendem Wasser abgespült.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus verschiedenen Materialien wurden folgende Extraktionskits nach Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet.

Organe:	PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) / QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
Blut:	QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
Kotproben:	QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)
Urin:	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (Qiagen)
Speichelproben in PBS:	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (Qiagen)
Zellen:	PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen)
Virus suspensionen:	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (Qiagen)

Für die durchgeführten Southern Blots wurden die Zellpellets in 100 µl VTE eingefroren. Nach drei Frier-Tau-Zyklen wurden 50 µl der Probe 1:1 mit Proteinase K-Puffer und 2 µl Proteinase K über Nacht bei 46 °C verdaut. Am nächsten Morgen wurden die Proben durch sechsmaliges Aufziehen in eine Spritze mit einer Kanüle (27G) homogenisiert.

Für die Bestimmung der Menge an viralen Genomen der Stocklösungen mit Hilfe der qRT-PCR wurde die DNA durch alkalische Lyse aufgereinigt:

10 µl Virussuspension + 10 µl TE + 20 µl 2M NaOH, 30 Minuten bei 56 °C, + 20 µl 2M HCl. Die Bestimmung der DNA-Menge und Reinheit erfolgte mit Hilfe eines Spektrophotometers (Nanodrop). Hierbei wird die Absorption von 1 µl der Probe im Wellenlängenbereich von 220 – 350 nm bestimmt. Doppelstrang-DNA (dsDNA) hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Reinheit wird mit dem Quotient aus den Wellenlängen 260 / 280 nm ermittelt. Hierbei gilt ein Wert von 1,8 als reine DNA. Ist dieser Quotient kleiner, ist die Probe mit Proteinen oder organischen Lösemitteln verunreinigt (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual).

2.2.4.2 Nachweis viraler DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zum Nachweis viraler DNA des Parvovirus H-1 in einer Probe angewendet. Hierfür wurden 50 ng DNA mit 40 µl PCR-Supremix sowie 0,2 µl der 100 µM spezifischen Primer (forward: TCA ATG CGC TCA CCA TCT CTG, reverse: TCG TAG GCT TCG TCG TGT TCT) pro Reaktion eingesetzt. Als Kontrollen dienten Wasser (K⁰), DNA von infizierten und nicht infizierten RG2-Zellen (K⁺ / K⁻) sowie DNA aus Organen nicht infizierter Tiere (K⁻).

PCR-Programm:

3 min	95 °C	
30 sec	94 °C	} 34 Zyklen
30 sec	58 °C	
1 min	72 °C	
7 min	72 °C	
24 h	14 °C	

Mit Hilfe dieser PCR wurde ein DNA-Fragment der Größe 516 bp aus der NS-1 Region des H-1PV-Genoms amplifiziert (nt 2055-2571).

2.2.4.3 Größenbestimmung von PCR-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Größe der durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden 150 ml 1,7 % Agarose (Agarose in Elektrophoresepuffer) in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend 15 µl Ethidiumbromidlösung in das flüssige Gel gegeben. Der Farbstoff Ethidiumbromid, der sich in die DNA einlagert, fluoresziert unter UV-Licht, wodurch die DNA im Gel sichtbar gemacht werden kann. Das Gel wurde in eine Kammer gegossen und mit einem Kamm für die Ladetaschen bestückt. Für die Größenbestimmung des zu amplifizierenden Fragments wurde der Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus verwendet. Abbildung 6 zeigt die Auftrennung dieses Größenmarkers im Gel.

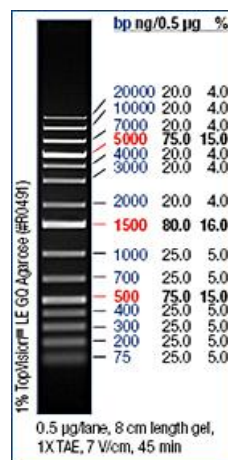


Abbildung 6: DNA-Größenmarker für die Gelelektrophorese
Banden des GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus bei der Gelelektrophorese,
Quelle: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1103

Die Proben-DNA wurde mit 6X Orange Loading Dye vermischt und in die Taschen pipettiert. Somit wird die DNA beschwert, bleibt in der Tasche und die Lauffront des Gels ist ohne UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde unter UV-Licht (365 nm) mit einer Digitalkamera fotografiert und mit dem Programm IQuant Capture 100 gespeichert, sobald die Loading-Dye-Banden $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen hatten.

2.2.4.4 Messung der viralen DNA-Konzentration durch quantitative-Realtime-PCR

A) Wildtyp H-1:

Die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wurde verwendet, um die Anzahl der viralen Genome in einer Probe zu bestimmen. Für die Bestimmung der Wildtypgenome wurde das TaqMan-System von Applied Biosystems mit folgenden Primern und Sonden verwendet, die im Bereich der kodierenden Sequenz des NS-1-Proteins liegen:

Forward: 5`-GCGCGGCAGAATTCAAAC-3`

Reverse: 5`-CCACCTGGTTGAGCCATCAT-3`

Sonde: 5`-6-FAM-ATGCAGCCAGACAGTTA-MGB-3`

Primer, Sonden und Standards wurden in einer Konzentration von 100 µM bei -20 °C gelagert; die Arbeitskonzentration betrug 10 µM. Die Produktgröße des zu amplifizierenden Stückes betrug 141 bp (nt 1078-1219).

Als Standard wurde das Plasmid pMVM+Δ800 (6419 bp) mit der H-1 PCR Zielregion in TE in einer Konzentration von $3,5 \times 10^7$ Kopien / µl eingesetzt (vgl. Wrzesinski et al, 2003).

Die Proben wurden nach folgender Prozedur aufgearbeitet:

Zunächst wurde eine Standardkurve mit 1:10-Verdünnungen in sterilem Wasser aus dem Standard ($3,5 \times 10^7$ Kopien / µl) bis zu einer Konzentration von 3,5 Kopien / µl hergestellt. Anschließend wurde der Mastermix angesetzt, welcher 13 µl Wasser, 23,4 µl TaqMan-Mastermix und jeweils 1,2 µl je Primer und Sonde beinhaltet. 40 µl des Mastermixes wurden in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und 6,7 µl DNA-Probe bzw. 6,7 µl der jeweilige Standardverdünnung zugegeben. 20 µl der Mischung wurden in je ein Well (Duplikate) einer 96-Well-Platte pipettiert, die Platte anschließend mit einer transparenten Klebefolie verschlossen und 5 min bei 3600 UpM zentrifugiert. Die Proben wurden mit einem qRT-PCR-Gerät gemessen und die Anzahl der viralen Genome mit Hilfe der Standardkurve bestimmt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt (NTC = no template control)

PCR-Programm:

2 min 50 °C

10 min 95 °C

15 sec 95 °C }
1 min 60 °C } 40 Zyklen

Die Menge der viralen Genome pro Milliliter wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Conc}[Vg / ml] = \frac{\text{Mittlere Kopienanzahl} \times 46,7 \mu\text{l} \times 1000}{(6,7 \mu\text{l} \times 20 \mu\text{l})}$$

Die mittlere Kopienanzahl entspricht der anhand der Standardkurve berechneten Template-Kopienzahl in der Reaktion, gemittelt aus den jeweiligen Duplikaten.

B) Inhibitor-Kontrolle:

Dieser Versuch wurde zur Untersuchung von möglicherweise in der Probe befindlichen PCR-Inhibitoren durchgeführt. Hierfür wurde der Probe ein DNA-Fragment des Solanum tuberosum phyB Gens (SPUD-A Fragment aus der Kartoffel) zugesetzt und amplifiziert. Gleichzeitig wurde eine bekannte Menge dieses Gens in eine Wasserprobe (ohne Inhibitoren)

gegeben und die nachgewiesene Menge mit den Werten aus den eigentlichen Proben verglichen (Nolan et al, 2006).

Hierfür wurden die unten aufgeführten Primer und die Sonde in der gleichen Konzentration wie bei der Wildtyp H-1 PCR vorbereitet und verwendet:

Forward: 5`-AACTTGGCTTTAATGGACCTCCA-3`

Reverse: 5`-ACATTCATCCTTACATGGCACCA-3`

Sonde: 5`-6-FAM-TGCACAAGCTATGGAACACCACGT-MGB-3`

Daraus ergab sich eine Produktgröße von 101 bp mit folgender Basenfolge:

5`AACTTGGCTTTAATGGACCTCCAATTTTGAGTGTGCACAAGCTATGGAACACCA
CGTAAGACATAAAACGGCCACATATGGTGCCATGTAAGGATGAATGT-3`

Bei der Inhibitor-Kontrollmessung wurden drei verschiedene Mastermixe eingesetzt:

- a) Mastermix ohne Wasser (für alle Proben)
6 µl H₂O + 23,4 µl TaqMan Mastermix + 1,3 µl je Primer und Sonde
- b) Mastermix mit Wasser (für Standardkurve und NTC)
33 µl Mastermix a) + 7µl H₂O
- c) Mastermix mit SPUD (für die Proben)
33 µl Mastermix a) + 7 µl SPUD-A Standard der Konzentration 1×10^4 Kopien /
Reaktion

Die Prozedur und das PCR-Programm waren die gleichen wie bei der Wildtyp H-1 Amplifikation.

C) Standardpräparation mit Plasmid-DNA

Das verwendete Plasmid (pMVM+Δ800 (6419 bp) mit der H-1 PCR Zielregion in TE) wurde aus 400 ml-Bakterienkultur (*E.coli* mit Plasmid) mit dem Maxipräparations Kit (Plasmid Maxi Kit, Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt. Die Berechnung des Ansatzes soll an folgendem Beispiel verdeutlicht werden (Tabelle 3):

Tabelle 3: Standardpräparation für die qRT-PCR

Standard-konz.	Größe		Molmasse	Molgewicht von Plasmid + Insert	Avogadro
ng/μl	Bp		Da	g/mol	1/mol
423,5	3929	Plasmid	660	3810180	$6,02 \times 10^{23}$
	1860	Insert			
	-16	Schnitt mit Restriktionsenzym			
	5773	Summe			

Berechnung für die Standardvorbereitung der qRT-PCR aus Plasmid-DNA

$$\begin{aligned}
 \text{Molekül Masse} &= \frac{3810180 \frac{g}{mol}}{6,02 \times 10^{23} \frac{1}{mol}} = 6,33 \times 10^{-18} g/\text{Molekül} \\
 &\cong 6,33 \times 10^{-9} ng/\text{Molekül}
 \end{aligned}$$

Über die Größe des Plasmids lassen sich das Gewicht und anschließend die Anzahl der Moleküle pro μl berechnen. Aus der Standardkonzentration und der Molekülmasse ergibt sich dann eine Anzahl von $6,69 \times 10^{10}$ Plasmidmolekülen pro Mikroliter. Daraus wurden Aliquots mit der höchsten Standardkonzentration ($3,5 \times 10^7$ Moleküle/μl) mit einem Volumen von jeweils 30 μl vorbereitet und eingefroren.

D) Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV im Verlauf der Passagierung

Mit diesem Experiment soll die Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV im Verlauf der Anpassung an die Zelllinie NCH 149 untersucht werden. Hierfür wurden zwei neue Detektionssysteme für die quantitative *RealTime*-PCR entwickelt, mit denen eine Deletion von 27 AS detektiert werden kann, die im Verlauf der Passagierung bei allen untersuchten Virusklonen aufgetreten war. Für diese PCR-Methode wurden drei Detektionssysteme und zwei Standards mit dem oben beschriebenen PCR-Programm verwendet:

i) Wildtyp H-1PV

Mit diesem System können alle viralen Genome, die in der Probe vorhanden sind detektiert werden. Es wurden die gleichen Primer und die gleiche Sonde wie bei der oben beschriebenen Wildtyp H-1PV qRT-PCR verwendet. Als Standard diente hier das Plasmid pUC19ΔHindH-1 (vgl. Wrzesinski et al, 2003).

ii) Wildtyp neu

Hier wurden nur die viralen Genome erfasst, welche die Deletion nicht besitzen, da die Sonde im Bereich der Deletion liegt. Des Weiteren liegt das 3'-Ende des forward-primers auch bereits innerhalb der Deletion. Die Reaktion wurde mit folgenden Primern und ebenfalls dem Plasmid pUC19ΔHindH-1 durchgeführt.

FW primer: GCACACCAAATACTCCTGTTG

Rev primer: CTCCTCGTTGAAGTCGCTCT

AGAGCGACTTCAACGAGGAG

Sonde: AAGCCAAAACACTGGGGAG

Produktgröße: 167 nt

iii) Deletionsmutante

Hier werden nur die Genome amplifiziert, welche die Deletion von 27 AS besitzen, da der forward-Primer die Deletion überspannt. Am 3`-Ende binden 4 nt nach der Deletion, der Rest des Primers bindet vor der Deletion. Als Standard wurde das Plasmid bestehend aus dem Vector pCR® 2.1 und einem Insert von H-1PV (1657-3517 nt) verwendet, welches die Deletion aus Klon 13 enthält.

Fw primer: GAGCACACCAAATACTCCCGAG

Rev primer: TTTTAGCTGGAGGTGCCATT

AATGGCACCTCCAGCTAAAA

Sonde: TTCAACGAGGAGCTGACCTT

Produktgröße: 125 nt

Abbildung 7 zeigt die Lage der Primer und Sonden der verschiedenen Detektionssysteme im Genom von H-1PV.

```
CCACAGTGACCCTGCACAGGAAGCTAAGCGCGGCAGAATTCAAACTAGAGAGGAGGTCTCGATTAAAACACAC
TCAAAGAGTTGGTACATAAAAGAGTAACCTCACCAGAAGACTGGATGATGATGCAGCCAGACAGTTACATTGAAA
TGATGGCTCAACCAGGTGGAGAAAACCTTGCTTAAAAATACACTAGAGATCTGTACACTGACTCTAGCAAGAACCA
AAACAGCCTTTGACTTGATTCTGGAAAAAGCTGAAACCAGCAAACACTAGCCAATTTCCATGGCTAGCACCAGAA
CCTGTAGAATCTTTGCTGAGCATGGCTGGAACATATATAAAGTCTGCCATGCCATCTGTTGTGTGCTGAATAGAC
AAGGAGGCAAAAGGAACACTGTGCTCTTTACGGACCAGCCAGCACAGGCAAATCTATTATTGCACAAGCCATAG
CACAAGCAGTTGGTAATGTTGGTTGTTACAATGCTGCCAATGTGAACTTTCCATTTAATGACTGTACCAACAAAA
ACTTGATTTGGGTGGAAGAAGCTGGTAACCTTTGGCCAGCAAGTAAACCAATTCAAAGCTATTTGTTCTGGCCAAA
CCATACGCATTGATCAAAAAGGAAAAGGCAGCAAACAGATTGAACCAACACCAGTTATTATGACCACCAACGAGA
ACATTACCGTGGTTAGAATAGGCTGTGAGGAAAGACCAGAACACACTCAACCAATCAGAGACAGAATGCTCAACA
TTCACCTGACACGTACACTACCTGGTGACTTTGGTTTGGTGGATAAGCACGAATGGCCTCTGATCTGTGCTTGGT
TGGTGAAGAATGGTTACCAATCTACCATGGCTTGTTACTGTGCTAAATGGGGCAAAGTTCCTGATTGGTCAGAGG
ACTGGGCGGAGCCGAAGCTAGACACTCCTATAAATTCGCTAGGTTCAATGCGCTCACCATCTCTGACTCCGAGAA
GTACGCCTCTCAGCCAAAACACTACGCTCTTACTCCACTTGCATCGGACCTTGCGGACCTAGCTCTAGAGCCTTGG
GCACACCAAATACTCCTGTTGCGGGCACTGCAGCAAAGCCAAAACACTGGGGAGGCTGGTTCCACAGCCTGCCAAG
GTGCTCAACGGAGCCCAACCTGGTCCGAGATCGAGGCGGATTTGAGAGCTTGCTTCAGTCAAGAACAGTTGGAGA
GCGACTTCAACGAGGAGCTGACCTTGGACTAAGGTACAATGGCACCTCCAGCTAAAAAGAGCTAAAAAGAGGTAAG
GGCTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTACTAATGTATGACTACCTGTTTTACAGGCCTGAAATCACTTGGTTCTA
```

Abbildung 7: Lage der Primer und Sonden der qRT-PCR-Systeme

Nukleotidsequenzausschnitt (1051 – 2400 nt) des Genoms von H-1PV in dem die Primer und Sonden der entwickelten qRT-PCR-Systeme liegen. Fett: Deletion der Virusklone, orange: Primer und Sonde des Wildtyp H-1PV-Systems, blau: Primer und Sonde des neu entwickelten Wildtyp-Systems zur Unterscheidung des Wildtyps von den Klonen mit der Deletion, unterstrichen: Primer und Sonde des Deletions-Systems

2.2.4.5 Untersuchung der viralen DNA-Replikation durch Southern Blot-Analyse

Mithilfe von Southern Blots kann DNA-Vermehrung in Zellen oder Geweben nachgewiesen werden. Hier wurde spezifisch nach der Vermehrung viraler H-1PV-DNA gesucht. Für die Untersuchung von Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion 6 cm-Petrischalen geerntet und das Pellet in 100 µl VTE resuspendiert. Die weitere Aufbereitung ist unter 2.2.4.1 beschrieben. Bei Gewebeproben wurde die DNA mit einem geeigneten DNA-Extraktionskit (siehe 2.2.4.1) aufgereinigt. Über Nacht wurde die DNA bei 46 °C mit Proteinase K verdaut. Am Tag 2 wurden die Proben durch eine Spritze mit grauer Kanüle fünf Mal homogenisiert und die DNA auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen und bei 120 V aufgetrennt. Als Größenmarker wurde λ /HindIII verwendet. Abbildung 8 zeigt die Banden des verwendeten Markers im Gel.

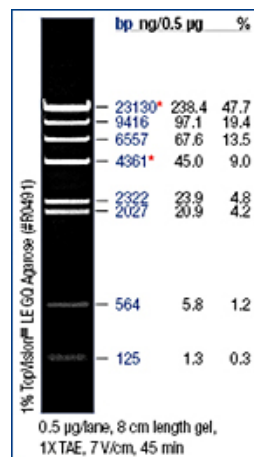


Abbildung 8: DNA-Größenmarker für Southern Blot Analysen
Banden des Lambda DNA/HindIII Markers bei der Gelelektrophorese,
Quelle: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1127

Nach der Auftrennung der Proben auf dem Gel wurde das Gel 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren. Anschließend wurde das Gel für 30 min denaturiert (Denaturierungspuffer) und für 30-40 min neutralisiert (Neutralisationspuffer). Daraufhin wurde die DNA über Nacht auf eine Nylonmembran geblottet. Abbildung 9 zeigt den Aufbau des Blots:

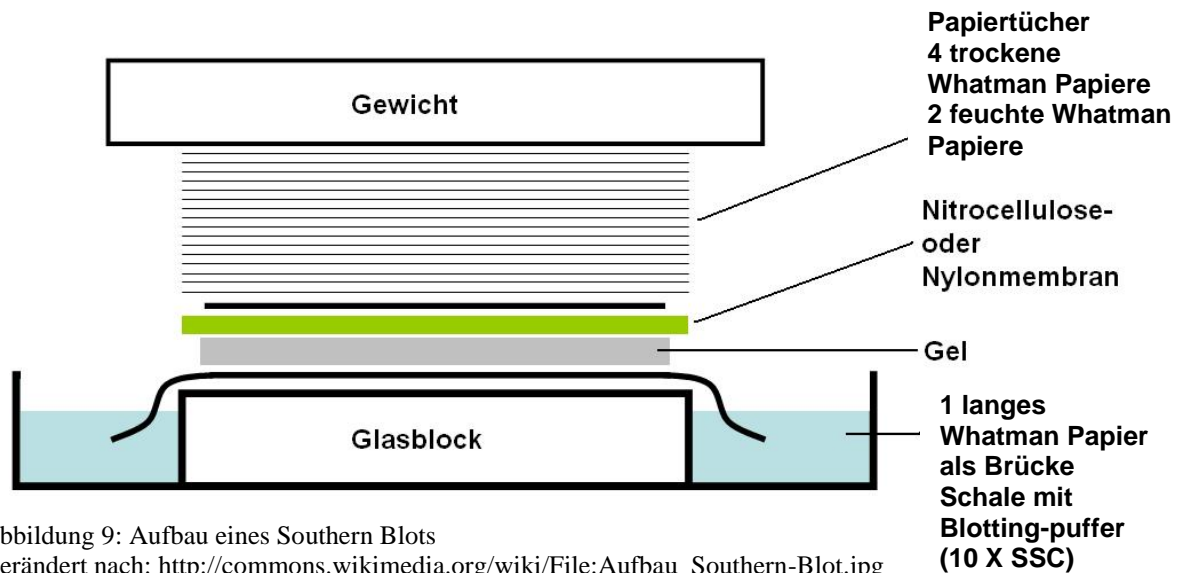


Abbildung 9: Aufbau eines Southern Blots

Verändert nach: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aufbau_Southern-Blot.jpg

An Tag 3 wurde der Blot abgebaut und die DNA mit der Membran durch UV-Licht verlinkt (Stratalinker UV-Ofen, Programm: Autocrosslink). Die Membran wurde dann 4 h bei 65 °C in der Hybridisierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. In dieser Zeit wurde die hier verwendete Sonde (^{32}P -markiertes DNA-Stück, entsprechend nt 385 bis 1885 der NS-1-kodierenden Region der MVM-DNA) radioaktiv markiert (AmershamTM Megaprime DNA Labelling System) und über eine Sepharose-Säule gereinigt. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 65 °C mit frischer Hybridisierungslösung und der Sonde inkubiert. An Tag 4 wurde die Membran jeweils zwei Mal 20 Minuten mit Waschlösung I und Waschlösung II gewaschen und anschließend in eine Filmkassette gelegt. Ein erster Chemilumineszenz-sensitiver Film wurde für ca. 1 h auf die Membran gelegt und dann entwickelt. Je nach Signalstärke wurde ein weiterer Film für längere Zeit bei -80 °C exponiert.

Bei einer Virusvermehrung in der jeweiligen Probe kann man die unterschiedlichen viralen DNA-Formen auf dem Film als geschwärmte Banden erkennen. Diese Banden entstehen innerhalb der Replikationszyklen des Virus und zeigen das Monomer mit einer Größe von 10 kb (mRF), das Dimer mit einer Größe von 20 kb (dRF) und den Einzelstrang mit einer Größe von 5 kb (ssDNA) des Virusgenoms. Hierbei bestehen das Monomer und das Dimer aus Doppelstrang-DNA, im Gegensatz zum Einzelstrang.

2.2.4.6 Sequenzanalyse von Virusklonen

a) DNA-Extraktion, PCR, Gelelektrophorese, DNA-Extraktion aus dem Gel

Von den zu untersuchenden Virusklonen wurde die DNA aus 1 ml des Überstandes der Infektion von NCH149 Zellen mit dem Ultra Sens Virus Kit (siehe 2.2.4.1) extrahiert. Mit

dieser wurden PCR-Reaktionen mit drei unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt, um das gesamte Genom der Klone zu amplifizieren. Hierfür wurde eine taq-Polymerase (Advantage®-HF 2 PCR Kit) nach folgendem Protokoll verwendet:

2 µl DMSO

2 µl 10X cDNA PCR Reaction Buffer

3 µl 10X HF 2 PCR Buffer

5 µl 10X HF dNTP Mix

0,3 µl je Primer

1 µl 50X Advantage-HF 2 Polymerase Mix

31,4 µl H₂O

In der PCR wurden die folgenden Primer mit dem aufgeführten PCR Programm eingesetzt:

Segment 1: 122-for AGC GGT TCA GAG AGT TTG AAA C

2023-rev CTC GGA GTC AGA GAT GGT GAG

Produktgröße 1901 nt

Segment 2: 1657-for GCA TTG ATC AAA AAG GAA AAG G

3517-rev TGG TGT CTG TGA TTT GAG TTC C

Produktgröße 1860 nt

Segment 3: 3270-for TGA ACA ACA AGG AGC TGG C

5000-rev GTA TGT ATC TCC CAC CCC CC

Produktgröße 1730 nt

PCR-Programm:

3 min 95 °C

15 sec 95 °C

30 sec 60 °C

2 min 68 °C

10 min 68 °C

24 h 4 °C

} 35 Zyklen

Die Primer wurden mit Hilfe des Onlineprogramms *Primer3* erstellt und mit *primer design*, einem weiteren Onlineprogramm, analysiert.

Die Größe und Reinheit der Produkte wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.3) kontrolliert und die entsprechenden Banden unter UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten. Die gewünschten PCR-Fragmente mit einer Größe von ca. 2000 nt wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des PureLink™ Quick Gel Extraction Kits die DNA isoliert.

b) Ligation der DNA-Fragmente in einen Vektor

Die aufgereinigte DNA aus dem Gel wurde in den Vektor PCR 2.1 (The Original TA Cloning® Kit, pCR® 2.1 vector) über Nacht bei 12 °C ligiert. Dafür wurden pro Ligationsansatz 17 µl DNA, 1 µl Vektor, 2 µl Ligase Puffer und 1 µl T4-Ligase verwendet.

c) Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation in *E. coli* Bakterien wurde mit Hilfe des TA Cloning Kits von Invitrogen durchgeführt (s.o.). Zunächst wurden Agarplatten für die Selektion der Kolonien hergestellt. Dafür wurde 1 L LB-Medium mit 13 g Agar versetzt, autoklaviert und anschließend warm gehalten. Dem Agar wurden 3 Tabletten Ampicillin (75 mg/L) zugesetzt und sobald sich das Antibiotikum gelöst hatte, wurden daraus an einer sterilen Werkbank Agarplatten gegossen und getrocknet. Die Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert. Auf die sofort benötigten Platten wurde bei RT 40 µl IPTG (100 mM) und 40 µl X-Gal (40 mg/ml) ausplattiert.

Die Ligationsreaktion sowie die Hitzeschock kompetenten *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig gemischt. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sec bei 42 °C, dann wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt. Den Bakterien wurde 250 µl SOC-Medium (TA Cloning Kit) bei RT zugegeben und die Kulturen anschließend für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Kulturen wurden danach auf den vorbereiteten Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten für 2 h auf 4 °C abgekühlt, um so die Farbintensität der Kolonien zu verbessern. Die Unterscheidung der Kolonien erfolgte über eine Blau-Weiß-Selektion mit Hilfe der Expression des lacZ-Gens für β-Galaktosidase (Madigan et al, 2003).

d) *E.coli*-Bakterien Mini-Kultur, Minipräparation und Lagerung der Bakterienkulturen

Von jeder Platte wurden maximal 10 weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in jeweils ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt, welches über Nacht (max. 16 h) bei 37 °C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurde die DNA aus einem Teil der Mini-Kultur isoliert und gereinigt. Hierfür wurden 2 ml der Kultur für 10 min bei RT und 1000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA aus dem Pellet gemäß der Herstellerangaben mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen aufgereinigt. Zur Langzeitlagerung der Bakterien wurden 2 ml der Mini-Kultur für 10 min bei RT und 1000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl LB-Medium mit 15 % Glycerol bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

e) Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Kontrolle der ligierten DNA-Fragmente wurde ein Restriktionsverdau mit jeweils 3 Enzymen pro DNA-Fragment für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Die hier verwendeten Enzyme EcoRI, PstI, NcoI wurden folgendermaßen eingesetzt:

5 µl DNA, 2 µl Puffer, 1 µl Enzym (40 U/µl), 1µl BSA (1:100 Verdünnung), 11 µl Wasser. Tabelle 4 zeigt die Schnittstellen sowie die Größe der zu erwartenden Fragmente der einzelnen Klonsegmente.

Tabelle 4: Restriktionsverdau von H-1PV -Segmenten

Enzym	Schnittstellen		Produkte					
	Insert	Vector	Richtige Orientierung			Falsche Orientierung		
			Segment 1 5830	Segment 2 5789	Segment 3 5659	Segment 1	Segment 2	Segment 3
EcoRI	1081	284 300	948 968 3923	1875 3913	1745 3913	952 965 3913	948 968 3923	1875 3913
PstI	2126 3372	309 1499	1190 4640	160 1190 1246 3193	1190 1643 2826	1190 4640	488 1190 1246 2865	121 1190 4348
NcoI	256 1327 1894 3124 3403	1878	567 1071 1713 2479	279 1230 1698 2582	2478 3181	567 1071 1722 2470	279 1230 1825 2455	1721 3938

Fragmentgrößen der Virussegmente nach dem Restriktionsverdau mit EcoRI, PstI und NcoI

Die Größe der Banden nach dem Restriktionsverdau wurde durch eine Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.5) kontrolliert.

f) Sequenzierung der DNA-Fragmente, Analyse der Sequenzdaten

Für die Sequenzanalyse wurden die Segmente mit den richtigen Schnittmustern zu GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Dazu wurden 15 µl der Plasmid-DNA aus der Mini-Kultur mit 15 µl Wasser verdünnt. Von den Primern wurde je nach Probenanzahl die benötigte Menge einer 1:10 Verdünnung versendet (20 µl für 8 Sequenzierungen). Im Zuge dieser Arbeit wurden 4 Primer von GATC hergestellt, um die vollständigen Sequenzen zu erhalten:

500for: TTGAGAGCTTGCTTCAG in Segment 1
 700for: ACACCAAGAAGGACTATAC in Segment 2
 381for: ACATGGCAAACCAACAGACA in Segment 3
 4800rev: GTACCAACCAACCACCCAAC in Segment 3

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm CloneManager Professional Suite durch multiple Alignments gegen die Wildtypsequenz (NCBI, Parvovirus H-1 complete Genome. 5176 nt, Genbank-Nummer: X01457, Vergleich mit der Referenzsequenz pSR19).

2.2.4.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV zu bestimmen, wurde eine Plaque-Selektion der in den verschiedenen Passagen des Adaptionsprozesses enthaltenen Viren durchgeführt. Von den Passagen 4, 7, 10, 15 und 20 wurden jeweils 11 bis 15 Einzelplaques gepickt und damit eine 6 cm-Petrischale mit NBK-Zellen infiziert. Diese wurden bei Auftreten eines CPEs geerntet und die DNA isoliert. Das gesamte Genom der enthaltenen Viren wurde anschließend mittels PCR in drei Segmenten amplifiziert. Die drei Segmente entsprechen den unter 2.2.4.6 genannten, welche zur Klonierung der erhaltenen Virenmutanten nach 22 Passagen auf der Zelllinie NCH149 verwendet wurden.

Die PCR wurde mit dem Advantage®-HF 2 PCR Kit und dem 10 × cDNA PCR Reaction Buffer wie oben bereits beschrieben durchgeführt. Auch für die Amplifizierung wurde das gleiche PCR-Programm verwendet, wie unter 2.2.4.6 a beschrieben. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und die jeweiligen Banden ausgeschnitten und mit dem PureLink™ Quick Gel Extraction Kit von Invitrogen isoliert. Die so aufgereinigten PCR-Fragmente wurden anschließend erneut von GATC sequenziert. Durch Sequenzvergleiche (CloneManager Professional Suite) wurde ermittelt, welche in den adaptierten Klonen gefundene Mutationen in welchem Schritt der Anpassung an die humane Glioblastom-Zelllinie NCH149 auftraten.

2.2.4.8 Nachweis viraler DNA durch Hybridisierung

Für den Nachweis viraler DNA im Gehirn und im Blut bei den *intranasal* infizierten Tieren wurde ein „dispersed cell assay“ mit NBK Zellen in 48-Well-Platten durchgeführt (Schlehofer et al, 1983). Hierfür wurden RG2-Zellen 24 h nach Aussaat mit den steril filtrierten Proben der infizierten Tiere in Triplikaten behandelt. Sobald ein CPE aufgetreten war, wurden die Zellen geerntet und mit dem Überstand vermischt. Das Gemisch wurde auf eine Nylonmembran gesaugt, welche vorher mit H₂O aktiviert und anschließend mit PBS gewaschen worden war. Die Membran wurde daraufhin für 5 min mit 0,25 M HCl getränkt, für 5 min denaturiert und anschließend nochmals für 5 min neutralisiert (Puffer und Lösungen wie bei 2.1.4). Die DNA wurde durch UV-Crosslinken auf der Membran fixiert und anschließend wie unter 2.2.4.5 mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

2.2.5 Immunhistochemie von Zellen

2.2.5.1 Epithelzellfärbung der Primärkultur aus Nasengewebe der Ratte

Die Primärkulturzellen wurden direkt auf Deckgläser in 6-Well-Platten ausgesät, über Nacht adhären gelassen und wie unter 2.2.6.1.8 beschrieben fixiert. Die Deckgläser wurden bis zur Färbung bei -20 °C aufbewahrt. Die Färbung wurde - mit Ausnahme der Markierung mit dem Erstantikörper - bei RT durchgeführt. Die auf den Deckgläsern fixierten Zellen wurden aufgetaut, bei RT trocknen gelassen und anschließend für 15 min in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 30 min in einer feuchten Kammer mit Ziegen Serum inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die überschüssige Lösung wurde entfernt und die Zellen mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer markiert. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung wurden die Deckgläser dreimal 15 min in PBS gewaschen und mit einer Mischung aus dem biotinylierten Zweitantikörper und Ziegen Serum in PBS in der feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Danach wurden die Deckgläser erneut dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min mit dem AB-Komplex des Vectastain Kits behandelt und daraufhin wieder dreimal 15 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte eine ca. 5-minütige Färbung mit dem Chromogen-System, wodurch eine deutliche Braunfärbung der positiven Zellen erreicht wird. Das überschüssige Chromogen wurde in destilliertem Wasser für 5 min abgewaschen und dann eine 5-minütige Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin-Lösung durchgeführt. Die Deckgläser wurden anschließend vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült und 2 bis 5 min gewaschen. Danach wurden die Deckgläser mit bei 45 °C verflüssigter Glyceringelatine auf Objektträgern fixiert und die gefärbten Zellen mit Hilfe eines Mikroskops mit Digitalkammer (siehe 2.1.2) fotografiert. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 5: Antikörper zur Markierung epithelialer Zellen

1. Antikörper	Anti-human Cytokeratin-Antikörper Klon AE1/AE3
Herkunft	Monoklonal Maus
Verdünnung	1:50
2. Antikörper	Vectastain Universal Elite ABC Kit mit Liquid DAB Chromogen System

2.2.5.2 Nachweis viraler und zellulärer Proteine in Zellen

Die Infektionseffizienz der verschiedenen Virusklone im Vergleich mit dem Wildtyp H-1PV wurde in der humanen Zelllinie U87 durchgeführt, da diese hier in *in vivo* (Maus) Experimenten mit den adaptierten Virusklonen verwendet wurden. Um zu prüfen, ob die Virusklone sich in ihrer Infektiosität unterscheiden, wurden U87 Zellen auf Objektträger mit Vertiefungen in einer Dichte von 4000 Zellen pro Well in 70 µl DMEM mit Antibiotika und FCS ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig von den Zellen abgesaugt und mit den verschiedenen Virusstocks (Wildtyp, Klon 3, Klon 8, Klon 5, Klon 13, rekombinanter Klon 3) und vier unterschiedlichen MOIs (30; 10; 3; 1 pfu / Zelle) in 20 µl serumfreiem Medium infiziert. Nach 1 h wurden 50 µl Kompletmedium zugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 20 min bei RT fixiert und die Membran für 5 min mit 0,2 % Triton in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Wells sechs Mal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer in PBS aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die unspezifischen Bindungen für 45 min bei RT mit 20 % FCS in PBS geblockt. Die Markierung erfolgte mit den Antikörpern (Tabelle 6) für jeweils 1 h bei RT in PBS mit 2 % FCS. Zwischen den Antikörperbehandlungen und danach wurden die Zellen jeweils sechs Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Elvanol eingedeckt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit der Software Olympus FluoView FW1000 in einer 400-fachen Vergrößerung und 1,5-fachem Zoom aufgenommen.

Dafür wurden die folgenden Lichtquellen verwendet:

Argon-Laser 488 nm, HeNe-Laser 594 nm, Durchlicht des Mikroskops und eine Quecksilber-Dampf-Lampe.

Tabelle 6: Antikörper zur Markierung viraler und zellulärer Proteine in Zellen

1. Antikörper	(SP8) NS-1-Protein	(M-20) Lamin β
Verdünnung	1:700	1:200
Typ	monoclonal	polyclonal IgG, goat anti Lamin β
Herkunft	Dr. N. Salomé	Santa Cruz Biotechnology
2. Antikörper	Alexa Fluor 568 donkey anti rabbit IgG (H+L)	Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L)
Verdünnung	1:700	1:700
Konzentration	2 mg/ml,	2 mg/ml,
Fluoreszenz [nm]	grün	rot
Markierung	infizierte Zellen	Zellkernmembran
Herkunft	0,5 ml Invitrogen	0,5 ml Invitrogen

2.2.6 Tierversuche

Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter folgendem Aktenzeichen genehmigt: 35-9185.81/G-184/09.

2.2.6.1 Ratte

2.2.6.1.1 Stereotaktische Implantation von Tumorzellen

Im Zuge dieser Arbeit wurden weibliche Wistar Ratten (immunkompetent) und weibliche RNU-Ratten (immundefizient) (Charles River Laboratories International Inc., Sulzfeld) im Alter von 10 Wochen verwendet (Abbildung 10). Die Tiere wurden in einer Isolatorstation unter S2-Bedingungen gehalten. Alle Operationen wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.



Abbildung 10: Verwendete Rattenstämme
Wistar Ratte RNU-Ratte

Den Wistar Ratten wurden RG2 Zellen intrazerebral implantiert, den RNU-Ratten wurden humane U87 Zellen intrazerebral wie folgt implantiert (siehe auch: Cetin et al, 2006):

Die Tiere wurden mit einer Mischung aus Druckluft und Isofluran (5 %) betäubt. Die Narkose wurde über den gesamten Operationsverlauf bei 2,5 % Isofluran aufrechterhalten. Der Kopf der schlafenden Ratte wurde in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Augen wurden während der Narkose mit einem Bepanthenfilm vor dem Austrocknen geschützt. Der Kopf der Ratten wurde mit Eutasept G Lösung desinfiziert und die Haut über dem Schädel mit einem sterilen Skalpell geöffnet. In den Schädel wurde mit einer sterilen Kanüle 2 mm vor der Kranznaht und seitlich versetzt zur Mittellinie ein Loch gebohrt, durch das dann mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens die jeweiligen Zellen ins Gehirn implantiert wurden.

Abbildung 11 zeigt die Knochenstruktur eines Rattenschädels. Das rote Kreuz zeigt die Stelle der Zellimplantation (siehe dazu: DeNoble et al, 1973).

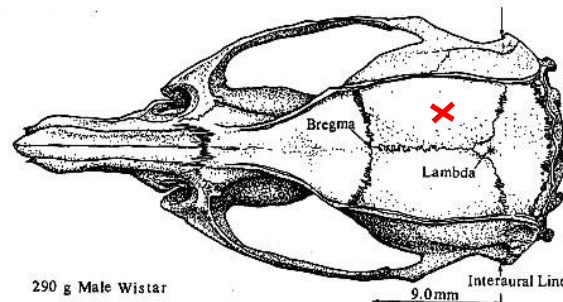


Abbildung 11: Knochenstruktur des Rattenschädels coronal
 Das rote Kreuz zeigt die Stelle, an der die Tumorzellen implantiert wurden.
 Quelle: <http://play.psych.mun.ca/~smilway/landmarks.html>

Zuerst wurde eine Hamilton Mikroliterspritze mit der Zellsuspension über den stereotaktischen Rahmen 5 mm ins Gehirn eingeführt und anschließend wieder ein 1 mm herausgenommen, um ein Reservoir für die Zellen zu schaffen. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 7 μ l serumfreiem DMEM injiziert, in einer Geschwindigkeit von 1 μ l/min. Sobald die Zellsuspension vollständig injiziert war, wurde die Spritze noch weitere 2 min im Gehirn belassen und anschließend wieder mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min aus dem Gewebe entfernt. Dies sollte eine Ausbreitung der Zellen durch die Kapillarwirkung entlang des Stichkanals vermeiden. Anschließend wurde die Haut mit 2 bis 3 Stichen zugenäht. Die Operationswunde wurde desinfiziert und die Ratte zurück in den Käfig gelegt. Dort wurde sie so lange beobachtet, bis die Narkose abgeklungen war.

2.2.6.1.2 Tumorkontrolle mittels Magnetresonanztherapie (MRT)

Eine Woche nach Implantation wurde das Wachstum der implantierten Zellen mit Hilfe der Magnetresonanztomografie (2,3 Tesla MRT, Bruker) überprüft. Hierfür wurde die Ratte mit einem Isofluran (2 %)/Sauerstoff-Gemisch narkotisiert. Zuerst wurden Aufnahmen ohne Kontrastmittel vorgenommen, anschließend wurde der Ratte 0,5 ml i.p. oder 0,2 ml i.v. Omniscan als Kontrastmittel gespritzt. Die anschließende Messung zeigte bei der T1-Gewichtung eine Anreicherung dieses Kontrastmittels im Tumorgebiet. Es wurden jeweils sechs Aufnahmen - beginnend in einer Ebene hinter den Augen Richtung okzipital - in 2 mm Abständen gemacht, um den ganzen Tumor zu erfassen. Dadurch konnte die Größe des jeweiligen Tumors mit der Software MRIcron (NITRC, <http://www.nitrc.org/projects/mricron>) bestimmt werden. Bei einer Größe von mehr als 170 mm^3 wurden die Tiere mit Virus infiziert. Abbildung 12 zeigt eine exemplarische MRT-Serie einer Wistar Ratte 7 Tage nach Zellimplantation. Der Tumor ist mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

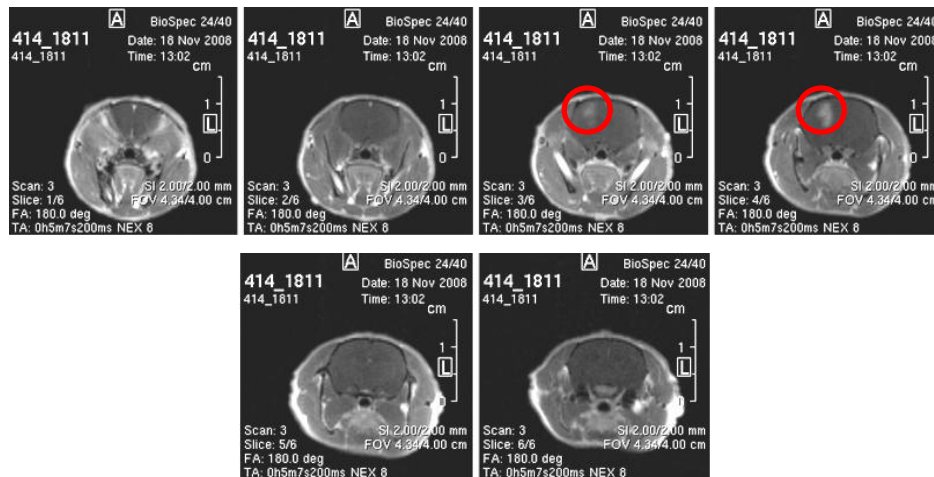


Abbildung 12: MRT-Aufnahmen eines Rattengehirns
 Exemplarische Abbildung der MRT-Aufnahmen eines RG2 Tumors in einer Wistar-Ratte 7 Tage nach Implantation der Zellen. T-1 Gewichtung nach Kontrastmittelanreicherung im Tumorgewebe (roter Kreis)

2.2.6.1.3 Infektionen von Ratten mit H-1PV

Die hier verwendeten Tiere wurden auf verschiedenen Wegen mit infektiösen Viren, PBS oder nicht infektiösen Viren (leere, UV-behandelte Kapside) infiziert:

a) *intrazerebral / intratumoral:*

Die Infektion der Tiere erfolgte auf die gleiche Weise wie die Implantation der Zellen. Bei tumortragenden Tieren konnte das Loch im Schädel, welches zum Implantieren der Zellen gebohrt worden war, erneut verwendet werden. So wurde die Infektion an der gleichen Stelle durchgeführt, an der zuvor die Zellen implantiert worden waren. Bei der Infektion ohne Tumor wurde das Virus mit der gleichen Methode in die korrespondierende Hemisphäre gespritzt. Für die Infektion wurde eine eigene Hamilton Mikroliterspritze verwendet. Die Virussuspension wurde in einem Volumen von 10 µl in das Gewebe appliziert, wodurch sich je nach Virusstocklösung eine Virusmenge von 10^7 - 10^8 pfu ergab.

b) *intravenös:*

Die intravenöse Applikation des Virus erfolgte in eine Schwanzvene der Ratte. Hierfür wurde ein Volumen von 100 µl Virussuspension mit 100 µl sterilem PBS vermischt und diese Mischung injiziert. Somit wurde dem Tier bei der i.v.-Infektion eine 10-fach höhere Virusmenge appliziert als bei der intrazerebralen Infektion.

c) *intranasal:*

Die Ratten wurden mit einem Isofluran-Luftgemisch narkotisiert und die Virussuspension mit Hilfe einer intravenösen Verweilkanüle in beide Nasenlöcher des

Tieres gespritzt. Hierbei wurde ein Volumen von 50 µl/Nasenloch verwendet, was der gleichen Virusmenge wie bei der i.v.-Infektion entspricht.

d) *mock*:

Die mock-Infektionen wurden auf die gleiche Art durchgeführt wie alle anderen beschriebenen Infektionen, jedoch wurde hierbei kein infektiöses Virus verwendet. Durch die Applikation von leeren Kapsiden bzw. Virusgradientenlösung soll ein Einfluss der Behandlungsmethode auf das Tumorwachstum der Tiere ausgeschlossen und bewiesen werden, dass die Tumorzelllyse nur bei der Applikation infektiöser Viruspartikel stattfindet.

2.2.6.1.4 Probennahme der Ausscheidungsproben

Um die Ausscheidungsproben der Tiere getrennt aufzufangen, wurden die Tiere nach der Infektion mit Virus für einen Zeitraum von 14 Tagen stundenweise in einen Stoffwechselkäfig gesetzt (Abbildung 13).



Abbildung 13: Stoffwechselkäfig
Stoffwechselkäfig zur getrennten Sammlung der Ausscheidungsproben der einzelnen Ratten, Quelle: http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=371_cat_id=15_Nalgene%20Metabolic%20Cage%20Systems.php, 08.10.2010

Jeden Tag wurden Urin und Kotproben der Tiere gesammelt. Die Speichelproben wurden täglich, und jeweils nachdem ein Tier getötet wurde, mit speziellen, sterilen, beflockten Tupfern gewonnen. Mit den Tupfern wurde direkt aus der Mundhöhle der wachen Tiere Speichel entnommen (Abu-Diab et al, 2008; Walsh et al, 2008). Als Negativkontrollen für die Experimente dienten Ausscheidungsproben von nicht infizierten Tieren. Für eine quantitative Bestimmung der Virenlast wurden zusätzlich Urinproben steril entnommen, d. h. der Ratte wurde ein Mal täglich direkt die Blase manuell ausgestrichen und der Urin in einem sterilen Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.6.1.5 Aufbereitung der Ausscheidungsproben

Die Speichelprobenentpuffer wurden bei 4 °C über Nacht in 2 ml PBS geschüttelt, die Kotproben (1 Kotstückchen) wurden in 1 ml PBS homogenisiert, abzentrifugiert und dann steril filtriert, die Urinproben wurden abzentrifugiert und anschließend steril filtriert. Aus allen Ausscheidungsproben wurde die DNA zur Untersuchung mittels PCR extrahiert (siehe 2.2.4.1), mit den steril filtrierten Proben wurden Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt (siehe 2.2.3.4).

2.2.6.1.6 Organentnahme bei Ratten

Am Ende eines Versuchs wurden die Tiere mit CO₂ getötet und bei Bedarf sofort das Blut durch eine Herzpunktion entnommen. Ein Teil des Blutes wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, vom Rest wurde das Serum durch 20-minütiges Zentrifugieren abgetrennt und der Blutkuchen verworfen. Nach der Herzpunktion wurden die benötigten Organe entnommen und in 15 ml (Organe + Blut) bzw. 50 ml (Gehirn) –Reaktionsgefäßen direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Organproben wurden bei -80 °C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt, die Blutproben bei 4 °C und die Ausscheidungsproben bei -20 °C.

2.2.6.1.7 Anfertigung und Fixierung von Gefrierschnitten aus Geweben

Die tiefgefrorenen Organe wurden mit einem Gefriermikrotom in 12 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Gewebe wurden mit einem Gewebekleber auf dem Schneideblock fixiert. Die Gehirne wurden dabei in frontaler Richtung beginnend vom Cerebellum nach vorne im Tumorgebiet geschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Gewebe nicht auftauten. Die Schnitte wurden direkt im Mikrotom auf die Objektträger aufgebracht und bis zur Färbung wieder eingefroren. Vor der Färbung wurden die Zell-/ Gewebegefrierschnitte fixiert, indem sie auf Objektträger aufgebracht und kurz bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in eiskaltes Methanol und dann 5 min in eiskaltes Aceton gestellt. Danach wurden die Objektträger wieder kurz getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.6.1.8 Anfertigung einer Primärkultur aus dem Nasengewebe einer Ratte

Um aus dem Nasengewebe einer Ratte eine Primärkultur zu erstellen, wurde einer toten, nicht infizierten Ratte unter einer sterilen Arbeitsbank das Nasengewebe mit Knorpel vor dem Schädelknochen entfernt und für 20 min in eine sterile Gewebekulturschale mit Antibiotika (siehe unter 2.2.1.1) gelegt. Anschließend wurde die Antibiotikallösung entfernt, die Schale

mit 2 ml DMEM mit Zusätzen befüllt und in den Brutschrank gestellt. 10 Tage später wurde das Medium in der Kultur gewechselt und der Überstand mit einigen schwimmenden Zellen in eine neue Schale überführt. 3 Tage später waren in beiden Schalen Zellen am Boden adhärnt. Diese wurden in kleine Zellkulturflaschen überführt, während der Gewebekblock mit dem Knorpel verworfen wurde. Die Kulturen wurden weiter passagiert, bis ein Teil eingefroren werden konnte und genügend Zellen für die Experimente ausgewachsen waren.

2.2.6.2 Maus

Die adaptierten Virusklone wurden in Balb/c Nackt-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp auf ihr onkolytisches Potenzial getestet (Abbildung 14). Der Wildtyp von H-1PV wurde ursprünglich in der Ratte gefunden und muss dort ein Reservoir für die Vermehrung und Weitergabe an Artgenossen haben. Durch die Anpassung des Virus an die humane Zelllinie NCH149 könnte sich das Verhalten des Virus *in vivo* auch verändert haben. Um keinem der verwendeten Viren einen Vorteil auf Grund des tierischen Hintergrunds bei der Behandlung der U87 Zellen zu verschaffen, wurden diese Versuche in der Maus durchgeführt.



Abbildung 14: Balb/c Nacktmaus

Hierfür wurden U87 Zellen mit dem Wildtyp, Klon 8 und Klon 3 mit einer MOI von 1,5 infiziert und 4 h später 2×10^6 Zellen in 100 μ l PBS subkutan in die Maus implantiert. Der Kontrollgruppe wurden unbehandelte Zellen implantiert (Haag et al, 2000M; Wetzel et al, 2001; Enderlin et al, 2009). Pro Gruppe wurden jeweils acht Mäusen Zellen implantiert. Das Tumolvolumen wurde zwei Mal wöchentlich, beginnend 12 Tage nach der Implantation, mit einer elektronischen Schieblehre, bestimmt und mit folgender Formel (Volumen von Ellipsoiden) berechnet:

$$V_{Tumor} = \frac{3}{4} \times \pi \times \left(\frac{L\ddot{a}nge}{2} \times \frac{Breite}{2} \times \frac{H\ddot{o}he}{2} \right)$$

Zur Auswertung der Überlebensdaten der Mäuse wurde eine Kaplan-Meier-Analyse in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biostatistik des DKFZ durchgeführt. Mit Hilfe des log-rank Tests wurde untersucht, ob sich das Überleben der Tiergruppen signifikant voneinander unterscheidet.

Am Ende des Experiments wurde zur weiteren Analyse von jeder Gruppe ein Tumor entnommen (U87 unbehandelt, H-1PV, Klon 3, Klon 8).

2.2.7 Gewebefärbungen

2.2.7.1 Pathologische Beurteilung von Geweben nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbung von Geweben sowie Zellen auf Objektträgern wurde zur Übersicht von Gewebestrukturen durchgeführt. Hierfür wurden Gewebeschnitte (z.B. Gehirn) oder Zellen auf Objektträger aufgebracht und fixiert. Für die Färbung wurden die Schnitte bei RT getrocknet, 30 sec bis 1 min in Hämatoxylin gefärbt, 5 bis 15 min unter fließendem Wasser gewaschen, 20 sec bis 1 min mit Eosinlösung gefärbt und anschließend dreimal 1 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Eindecken wurde dem Präparat über eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 1 min in 70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol, Xylol) Wasser entzogen und das Deckgläschen mit einem Tropfen Eukitt aufgelegt. Diese Färbemethode dient in der Pathologie als Standardverfahren zur Beurteilung krankhafter Veränderungen im Gewebe (Bonin, 1973). Mit dem Hämatoxylin werden die Zellkerne und anschließend das Zytoplasma mit Eosin gegen gefärbt.

2.2.7.2 Nachweis viraler Proteine in Geweben

Die hier durchgeführten Antikörperfärbungen in den gezeigten Gehirnschnitten nach Infektion mit H-1PV wurden zusammen mit I. Kiprianova nach folgendem Protokoll durchgeführt: Das gefrorene Gewebe wurde mit einem Cryoslicer (s.o.) in 15 bis 20 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden für eine Stunde mit 0,1 % Triton X-100 und 5 % Ziegen Serum in PBS bei RT permeabilisiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (siehe Tabelle 7) erfolgte für 18 h bei 4 °C. Die Markierung mit dem Sekundärantikörper erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Gewebe mit PBS für 2,5 h bei RT. Dann wurden die Objektträger erneut mehrmals mit PBS gewaschen und zur Visualisierung der Zellkerne mit DAPI-haltigem Eindeckelmedium fixiert. Die Objektträger wurden bei 4 °C gelagert. Die Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMRBE fluorescence microscope) mit angeschlossener Digitalkamera in einer 400-fachen Vergrößerung fotografiert.

Tabelle 7: Antikörper zur Markierung viraler Proteine in Tumorgewebe

1. Antikörper	SP8 / 3D9 (anti NS-1)
Verdünnung	1:50, 1:100
Klon	Monoklonal 3D9, polyclonal SP8
Herkunft	Natalie Salomé (DKFZ)
Markierung	infizierte Zellen
2. Antikörper	Anti Maus IgG-cyanin gekoppelt, anti Ratte IgG-cyanin gekoppelt
Verdünnung	1:500
Fluoreszenz	grün
Herkunft	Jackson ImmunoResearch

3 Ergebnisse

In unserer Arbeitsgruppe konnte in mehreren prä-klinischen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* in der Ratte die Effizienz von H-1PV als onkolytische Virotherapie gezeigt werden (Geletneky et al, 2005 & 2010, Kiprinaova et al, 2011). Im Folgenden sollen die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen in Vorbereitung auf eine klinische Studie Phase I/IIa gezeigt werden.

3.1 Onkolytische Virotherapie von Glioblastomen mit H-1PV *in vivo*

Hier wurden zwei unterschiedliche Rattengliommodelle verwendet:

- ein allogenes Tumormodell, bei dem der immunkompetenten Wistar-Ratte Rattengliomzellen (RG2) implantiert wurden
- ein Xenograft-Tumormodell, bei dem der immundefizienten RNU-Ratte humane Gliomzellen (U87) implantiert wurden

Die Experimente zur Untersuchung der Ausscheidung und Replikation von H-1PV wurden im immunkompetenten Tier durchgeführt.

3.1.1 Ausscheidung und Übertragung von H-1PV

3.1.1.1 Übertragung von H-1PV zwischen Ratten

Zur Vorbereitung der geplanten klinischen Studie Phase I/IIa zur Gliomtherapie mit H-1PV, sollte im Tierversuch an der Ratte untersucht werden, ob und wenn ja, wie lebende Viren nach *intrazerebraler* bzw. *intravenöser* Infektion ausgeschieden werden und auf welchem Wege das Virus zwischen den Tieren übertragen wird. Einen ersten Hinweis für die Übertragung des Virus zwischen den Tieren lieferte das Auftreten von „Wunderheilungen“ bei der Haltung von infizierten und nicht infizierten tumortragenden Tieren im gleichen Isolator. Wie sich herausstellte, wurden offenbar nicht infizierte Ratten von infizierten Ratten über die Käfiggrenze hinweg angesteckt, was zu einer Regression des Tumors auch in dem ursprünglich nicht infizierten Tier führte. Dies konnte durch den Nachweis viraler DNA in Geweben des nicht direkt infizierten Tieres bestätigt werden (I. Kiprianova, Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch führte die Haltung eines infizierten und eines nicht infizierten Tieres im gleichen Käfig dazu, dass in der Leber, der Niere und im Gehirn des nicht infizierten Tieres virale DNA detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um die Frage nach dem Übertragungsweg des Virus von einem zum anderen Tier zu analysieren, wurden im Folgenden Ausscheidungen (Urin, Kot und Speichel) von infizierten Tieren untersucht.

3.1.1.2 Untersuchung der Ausscheidungsproben

Für diesen Versuch wurden vier Tiergruppen gebildet, von deren Ausscheidungen (Kot, Urin und Speichel) Proben über einen Zeitraum von 14 Tagen durch die Haltung in Stoffwechsellkäfigen getrennt gesammelt wurden.

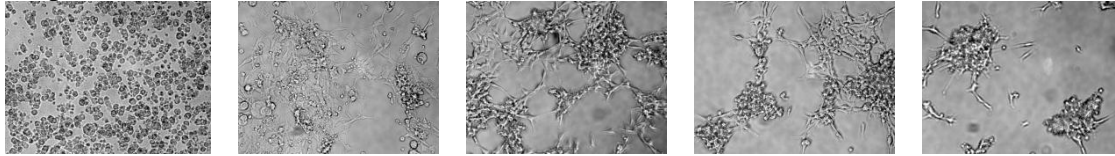
- I) Ratten mit Tumor und *intrazerebraler* Virusinfektion, direkt in den Tumor (Tumor i.c.)
- II) Ratten ohne Tumor nach *intrazerebraler* Virusinfektion (i.c.)
- III) Ratte mit Tumor nach *intravenöser* Virusinfektion (Tumor i.v.)
- IV) Ratte ohne Tumor nach *intravenöser* Virusinfektion (i.v.)

Wistar-Ratten aus Gruppe I und Gruppe III wurden RG2-Zellen ins Gehirn implantiert, aus denen innerhalb einer Woche Tumore entstanden. Daraufhin wurden alle Tiere jeweils ein einziges Mal mit H-1PV infiziert, wobei die i.v.-infizierten Tiere die 10-fache Virusmenge im Vergleich mit den i.c.-behandelten Tieren verabreicht bekamen (siehe 2.2.6.1.3). Die Kontrollproben (Urin, Kot, Speichel nicht infizierter Tiere) wurden von allen Tieren vor der Infektion auf die gleiche Weise gewonnen.

Die Ratten der Tiergruppe III (Tumor + i.v.-Infektion) schieden jedoch spätestens eine Woche nach Infektion auf Grund der Folgen des Tumorwachstums aus dem Experiment aus.

Die gesammelten Ausscheidungsproben wurden mittels PCR auf die Anwesenheit viraler DNA (Amplifikation eines Abschnitts des viralen NS-1 Gens) untersucht. Bei den PCR-positiven Proben wurde die Menge der ausgeschiedenen DNA mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Weiterhin wurde untersucht, ob die infizierten Tiere infektiöse virale Partikel ausscheiden und somit infektiös sind. Hierfür wurden H-1PV-sensitive RG2 Zellen mit den steril filtrierten Ausscheidungsproben inkubiert. Zu Beginn der Experimente wurde der pH-Wert der Urinproben und der gelösten Kotproben gemessen, um einen pH-bedingten Einfluss auf die Zellkulturen ausschließen zu können. Der pH-Wert der Urinproben lag bei 7, der der Kotproben bei 6. Dies bedeutet, dass bei einer Zugabe der Proben in den Medienüberstand der Zellkultur keine toxische Veränderung zu erwarten sind (Pufferbereich DMEM pH 7 - 7,6). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit verschiedenen Mengen (10, 50, 100, 200, 300 µl) von Ausscheidungsproben nicht infizierter Tiere inkubiert, um eine Toxizität von Probenbestandteilen ausschließen zu können. Abbildung 15 zeigt, dass die Behandlung der Virus-sensitiven Zellen mit Kontrollproben nicht zu einem zytopathischen Effekt (CPE) führte.

Kotproben von nicht infizierten Tieren



10 µl

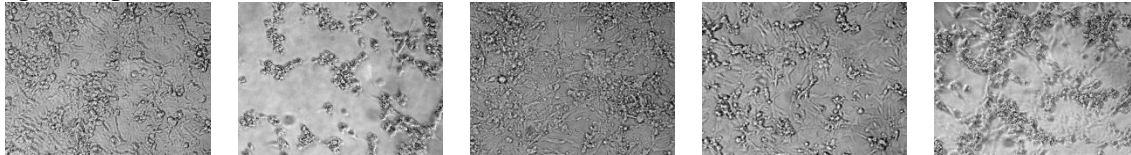
50 µl

100 µl

200 µl

300 µl

Speichelproben von nicht infizierten Tieren



10 µl

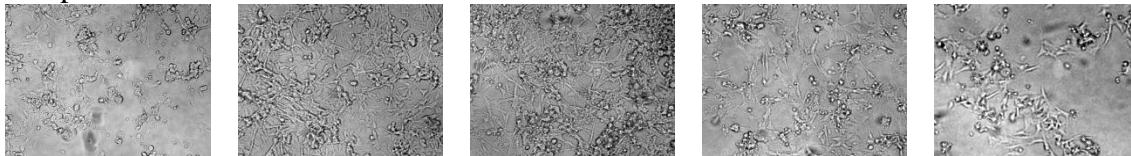
50 µl

100 µl

200 µl

300 µl

Urinproben von nicht infizierten Tieren



10 µl

50 µl

100 µl

200 µl

300 µl

Abbildung 15: Ausscheidungsproben nicht infizierter Tiere auf RG2 Zellen

Mikroskopische Aufnahmen der sensitiven RG2 Zellen 4 Tage nach Behandlung mit Ausscheidungsproben von nicht infizierten Tieren in 100-facher Vergrößerung. Die entsprechende Probenmenge wurde direkt in das Zellkulturmedium (x µl Probe auf 1 ml Medium) gegeben.

Bei der Behandlung der Zellen mit 200 - 300 µl der Ausscheidungsproben konnte im Falle der Urin- und Kotproben ein verändertes Wachstumsverhalten gegenüber den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden (Wachstum der Kontrollen entsprach den in Abbildungen 15 gezeigten Zellbildern nach Behandlung mit 10-100 µl Probe). Daher wurde für die Untersuchung der Ausscheidungsproben infizierter Tiere stets ein Volumen von 100 µl (entspricht 10% bei einem Gesamtvolumen von 1 ml pro Schale) verwendet.

A) Kotproben

Die Untersuchung der Kotproben durch eine H-1PV-DNA-spezifische PCR-Analyse ergab kein positives Ergebnis. Dies bedeutet, dass nach einmaliger Infektion der Tiere in einem Zeitraum von 14 Tagen keine virale DNA in den Kotproben der Ratten nachgewiesen werden konnte.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis verursachte die Inokulation von RG2 Zellen mit in PBS suspendierten, steril filtrierten Kotproben von infizierten Tieren keinen zytopathischen Effekt. Auch nach einmaliger Passage der Zellen, zur Auslösung eines Wachstumsschubes, der die virale Replikation anregen soll, konnte im Mikroskop kein Virus-induzierter Zelltod beobachtet werden. Die Zellen wuchsen direkt nach Zugabe der Kotproben zunächst in Clustern, streckten sich aber im Laufe von 2 Tagen aus und zeigten dann keinen Unterschied

im Wachstum verglichen mit den Kontrollen. Abbildung 16 zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen von mit Kotproben einer i.c.- und einer i.v.-infizierten Ratte inokulierten RG2 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen. Es ist zu sehen, dass das Wachstum der Zellen im Vergleich mit den Kontrollen zunächst verlangsamt war, sich aber dann anglich.

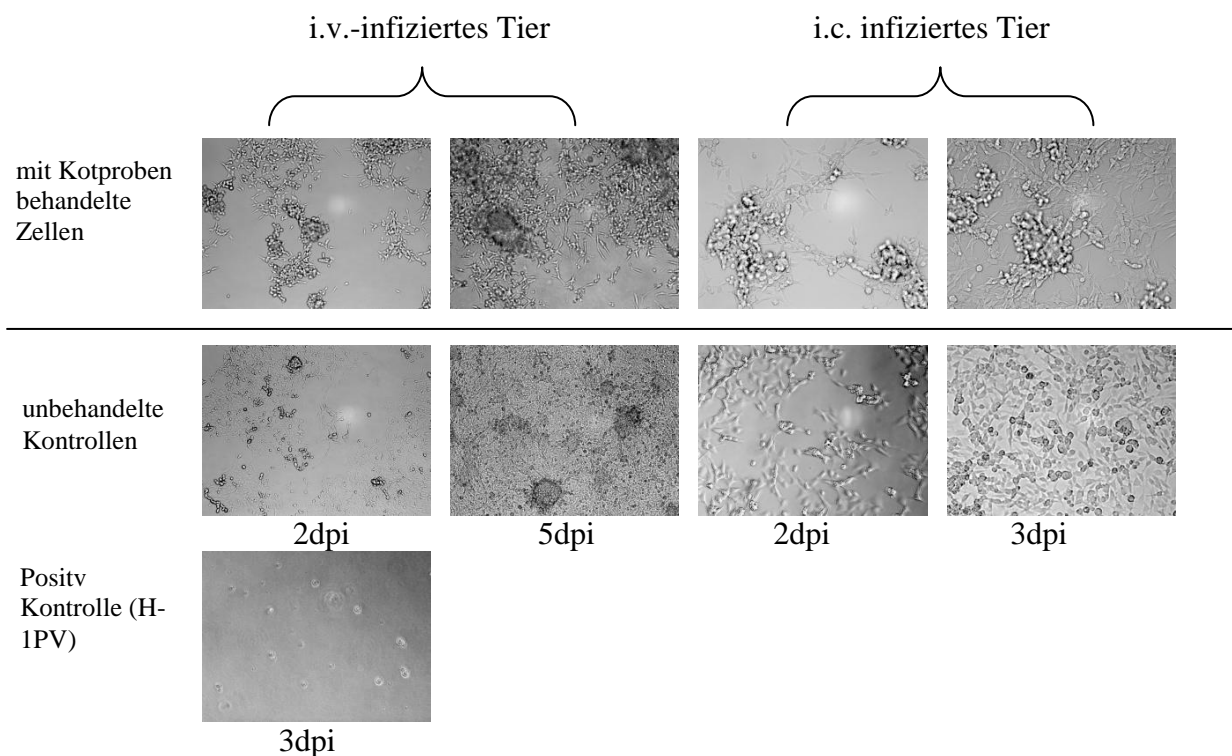


Abbildung 16: Effekt von Kotproben infizierter Tiere auf RG2 Zellen

Lichtmikroskopische Bilder der mit Kotproben behandelten RG2 Zellen im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen bei 100-facher Vergrößerung. Bei den exemplarisch gezeigten Aufnahmen wurden RG2 Zellen mit einer Kotprobe eines i.v.-infizierten Tieres, die 14 Tage nach Infektion entnommen und 2 und 5 Tage nach Inokulation in RG2 Zellen fotografiert wurde, inokuliert. Die Kotprobe des i.c.-infizierten Tieres wurde 3 Tage nach Infektion gewonnen und die Zellen 2 und 3 Tage nach Inokulation fotografiert. Positivkontrolle = mit H-1PV infizierte RG2 Zellen

B) Urinproben / Nierengewebe

Die Urinproben, welche während der Haltung in Stoffwechsellkäfigen entnommen wurden, zeigten in der PCR keine verwertbaren Ergebnisse. Daher wurde zunächst die Niere als Anhaltspunkt für die renale Ausscheidung untersucht. Bei der Untersuchung der Nierengewebe auf virale DNA mittels PCR zeigte sich, dass bei allen i.v.-infizierten Tieren in der Niere virale DNA gefunden wurde, unabhängig von der Gegenwart eines Tumors. Bei den i.c.-infizierten Tieren konnte jedoch ein Unterschied detektiert werden: Das untersuchte Nierengewebe bei tumortragenden Tieren war im untersuchten Zeitraum nach Infektion nicht Virus-DNA-positiv, während die Tiere ohne Tumor ab 3 Tagen nach Infektion virale DNA in

der Niere aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen eine mögliche Ausscheidung des Virus über den renalen Apparat vermuten (Tabelle 8).

Tabelle 8: Nachweis viraler DNA in Nierengewebe

Tier	Behandlung	Zeitpunkt der Gewebeentnahme	PCR-Ergebnis
Wistar	Tumor i.c.	1 hpi	-
		1 dpi	-
		3 dpi	-
		5 dpi	-
Wistar	Tumor i.v.	1 hpi	+
		1 dpi	+
		3 dpi	+
		4 dpi	+
		5 dpi	+
Wistar	i.c.	1 hpi	-
		1 dpi	-
		3 dpi	+
		5 dpi	+
Wistar	i.v.	1 hpi	+
		1 dpi	+
		3 dpi	+
		5 dpi	+

Untersuchung der DNA aus Nierengewebe mittels H-1PV-spezifischer PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion der Tiere (hpi = Stunden nach Infektion, dpi = Tage nach Infektion). Die RG2 Tumore wurden eine Woche vor der Infektion implantiert. Tumor i.c. = tumortragendes Tier mit *intrazerebraler* Infektion in den Tumor, Tumor i.v. = tumortragendes Tier mit *intravenöser* Infektion in die Schwanzvene, i.c. und i.v. = korrespondierende Infektion bei Tieren ohne Tumor, + = Nachweis viraler DNA, - = kein Nachweis viraler DNA

Da die detektierte virale DNA auch über das Blutssystem in die Nieren gelangt, könnten die Ergebnisse falsch-positiv sein. Daher wurde erneut versucht, Urinproben zu erhalten; diesmal konnten durch Auspressen der Blase infizierter Ratten direkt sterile und hoch-konzentrierte Urinproben gewonnen werden. Bei diesen Tieren wurde nach täglicher Urinentnahme über 2 Wochen außerdem an Tag 27 sowie 41 nach Infektion Urin entnommen, um die Ausscheidung über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. Es konnte allerdings nicht bei allen Tieren an jedem Tag eine Probe gewonnen werden. In diesen Proben konnte mittels PCR regelmäßig virale DNA nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse zwischen den einzelnen Tieren mancher Gruppen. Einzig bei der Gruppe der tumortragenden Tiere nach i.v.-Infektion konnte durchgehend in allen Proben H-1PV DNA nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Nachweis viraler DNA in Urinproben

Behandlung	Zeitpunkt der Probenentnahme [dpi]	PCR-Ergebnis
Tumor i.c.	3	+
	6	+
	7	+
	8	+
	9	+
	10	+
	27	-
Tumor i.v.	1	+
	2 / 2	+ / +
	3 / 3	+ / +
i.c.	1 / 1	+ / +
	2 / 2	+ / -
	3 / 3	+ / -
	6	+
	7 / 7	+ / -
	8 / 8	+ / -
	9 / 9	+ / -
	10 / 10	+ / -
	27 / 27	+ / +
	41	+
i.v.	1 / 1	+ / -
	2 / 2	+ / -
	3 / 3	- / -
	6 / 6	+ / -
	7 / 7	+ / -
	8 / 8	+ / +
	9	+
	10 / 10	+ / -
	27 / 27	+ / -
	41	+

Übersicht über die PCR-Ergebnisse der untersuchten Urinproben von Wistar Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Bei Angabe von zwei Zeitpunkten, z.B. 2/2 wurden Urinproben von zwei Tieren untersucht, die PCR-Ergebnisse für jedes Tier sind in Spalte 3 in gleicher Art dargestellt. Die Behandlung entspricht den anfangs vorgestellten vier Tiergruppen

Bei der quantitativen Analyse der Virusmenge in den Urinproben zeigte sich bei Einsatz von 50 ng Gesamt-DNA (aus 200 µl Urin konnten 8,4 - 125,4 ng DNA mit unterschiedlicher Reinheit isoliert werden), dass die Anzahl der viralen Genome sehr gering war (1×10^4 - 1×10^6 virale Genome (Vg)/ml). Die Nachweisgrenze bei diesem Versuch lag bei 3×10^3 Vg/ml. Da die Menge an Urin, die von den Ratten täglich gewonnen werden konnte, variierte (5 – 10 ml/Tag und Tier), kann hier keine Aussage über die Gesamtmenge der Ausscheidung der viralen Genome pro Tag gemacht werden. Abbildung 17 zeigt, dass in allen untersuchten Urinproben virale DNA detektiert werden konnte. Sogar 41 Tage nach Infektion war immer

noch virale DNA im Urin nachweisbar. Bei Einsatz gleicher DNA-Mengen konnte jedoch gezeigt werden, dass die tumortragenden Tiere vergleichsweise weniger virale DNA ausschieden. Des Weiteren schieden die i.v.-infizierten Tiere mehr virale DNA aus als die i.c.-infizierten Tiere. Bei den Tieren ohne Tumor war eine Zunahme der Ausscheidung viraler DNA an Tag 8 nach Infektion zu beobachten. Da bei der Gruppe der tumortragenden Tiere mit i.v.-Infektion auf Grund des schnell eintretenden Todes nur 3 Tage lang Urinproben erhalten werden konnten, kann hier keine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Ausscheidungsmenge getroffen werden. Auffällig war weiterhin, dass das tumortragende Tier nach i.c.-Infektion die geringste Menge an viraler DNA ausschied, die Anzahl der viralen Genome aber im zeitlichen Verlauf zunahm. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei tumortragenden Tieren nach i.c.-Infektion eine Ausscheidung viraler DNA über Urin verzögert stattfindet (vgl. Abbildung 17).

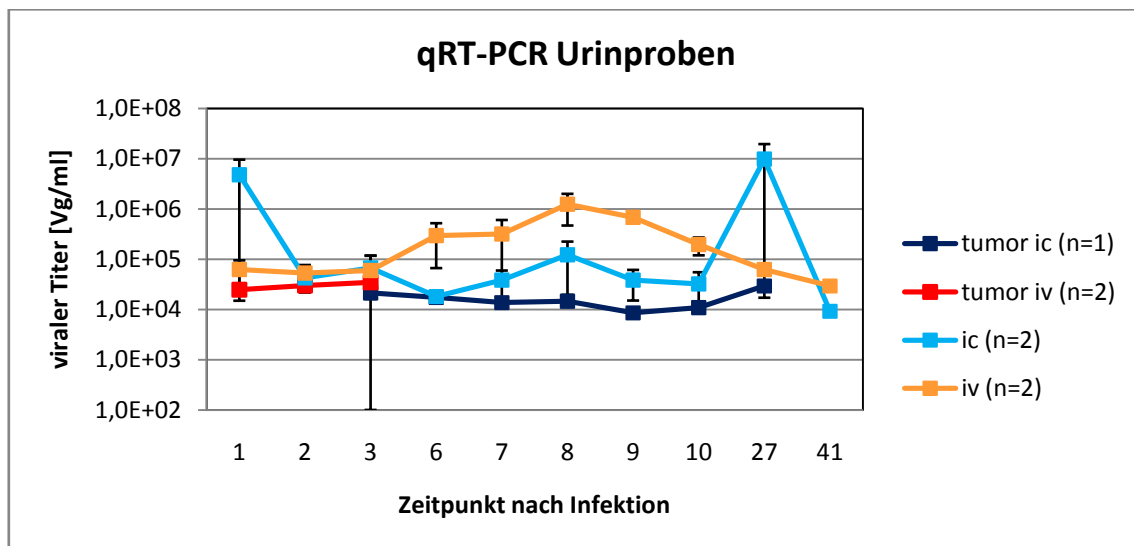


Abbildung 17: Quantifizierung der DNA-Menge in Urinproben

Ausscheidung viraler DNA von H-1PV über Urin nach unterschiedlicher Behandlung über einen Zeitraum von 41 Tagen nach Infektion. Die Proben der 4 Behandlungsgruppen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Titer der Urinproben sind in Anzahl der viralen Genome pro Milliliter (Vg/ml) angegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der gemessenen Werte an den Tagen an, an denen Proben mehrerer Tiere vorhanden waren. Nachweisgrenze: 3×10^3 Vg/ml

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob nach einmaliger Infektion der Tiere auch infektiöse Viren über Urin ausgeschieden werden, wurden H-1PV-sensitive RG2 Zellen mit steril filtrierte Urinproben, gewonnen durch Haltung der Ratten in Stoffwechselkäfigen, inokuliert. Nach Inokulation der Proben infizierter Tiere auf RG2 Zellen war ein deutlicher zytotoxischer Effekt zu erkennen. Die Zellen starben innerhalb von 2 Tagen vollständig ab und schwammen im Überstand der Zellkulturschalen.

Abbildung 18 zeigt die Zellen 6 Tage nach Behandlung mit den Urinproben von Ratten, gesammelt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion, sowie nach unterschiedlichen Applikationsarten (i.v., i.c., Tumor i.c.). Hierbei wurden die Zellen einmal (an Tag 4 nach Behandlung) 1:2 passagiert, da die Kontrollen bereits vollständig konfluent waren (und H-1PV für seine Replikation und Zellyse von sich teilenden Zellen abhängig ist).

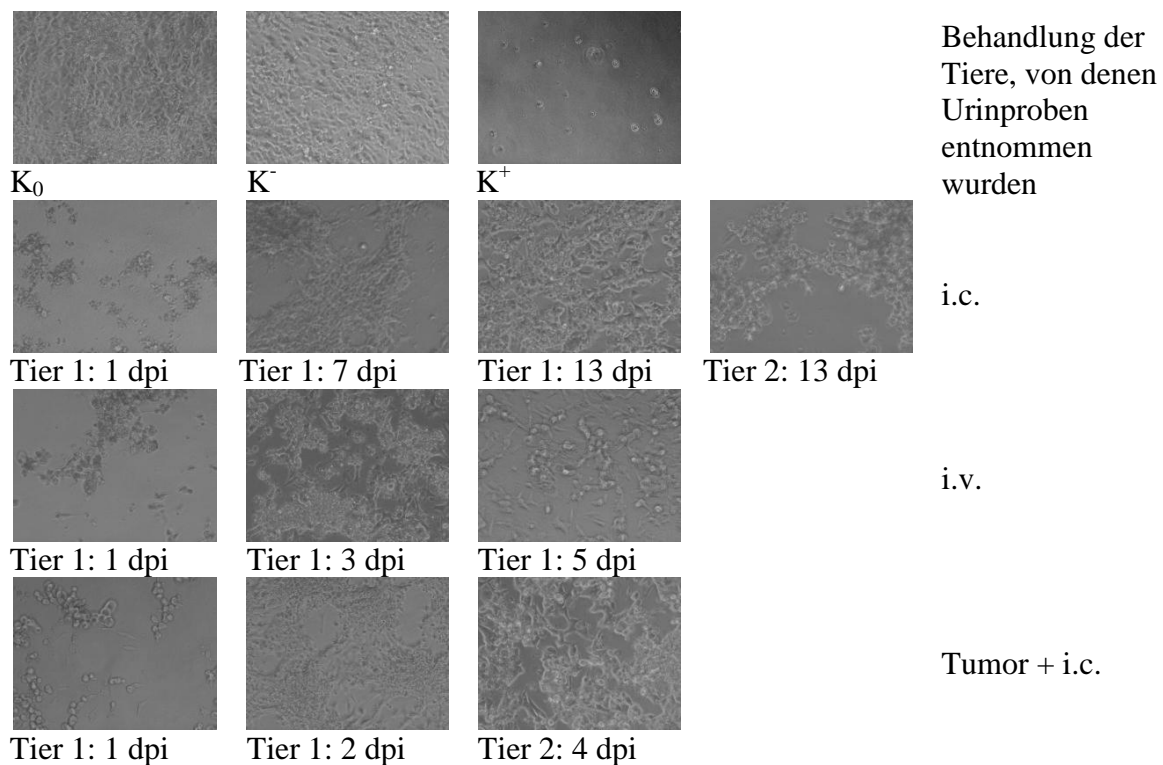


Abbildung 18: Effekt von Urinproben auf RG2 Zellen

Lichtmikroskopische Aufnahmen von RG2 Zellen 6 Tage nach Behandlung mit Urinproben infizierter Tiere, K₀ = unbehandelte Zellen, K⁻ = Zellen nach Behandlung mit Urin von nicht infizierten Tieren, K⁺ = mit H-1PV infizierte Zellen. 100 µl Urinprobe wurde zu 1 ml Zellkulturüberstand (DMEM + Antibiotika + FCS) gegeben. Unter den Bildern sind das Tier und der Zeitpunkt der Probennahme nach Infektion angegeben.

Um sicher zu stellen, dass der beobachtete zytotoxische Effekt tatsächlich durch Parvovirus H-1 verursacht wurde, wurden die Überstände der behandelten Zellen mehrfach auf „neue“ Zellkulturschalen übertragen. Dadurch sollten mögliche toxische Effekte von Urinbestandteilen ausverdünnt werden. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Urinproben zum CPE in RG2-Zellen geführt haben, außerdem war kein toxischer Effekt durch Urinbestandteile zu beobachten. Tabelle 10 zeigt, welche Urinproben zu einem CPE auch nach Passage der Überstände geführt haben. Auffällig ist hierbei, dass die Urinproben von den tumortragenden Tieren nach i.c.-Infektion fast nie bzw. erst zu einem späten Zeitpunkt einen CPE verursachten.

Tabelle 10: Nachweis infektiöser Viren in Urinproben infizierter Ratten

Passage	Behandlung	Tier	Zeitpunkt der Probengewinnung vom Tier [dpi]	CPE	
1	Tumor i.c.	1	alle (1-14)	-	
		2	alle (1-5)	-	
	i.c.	1	1,2,3,4,7,10	+	
			5,6,8,9,11,12,13,14	-	
		2	5,6,7,8	+	
			4,9,10,11,12,13,14	-	
	i.v.	1	1,2,3	+	
			5,6,7,8,9,11,12	-	
		2	1,3,6,7,8,12	+	
			9,14	-	
	2	Tumor i.c.	1	12	+
				1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	-
			2	alle	-
		i.c.	1	1,2,3,4,7,8,10	+
			5,6,9,11,12,13,14	-	
		2	5,6,7,8	+	
			4,9,10,11,12,13,14	-	
i.v.		1	1,2,3	+	
			5,6,7,8,9,11,12	-	
		2	1,2,3,6,7,8,12	+	
			9,14	-	

Die Überstände der mit Urinproben behandelten RG2 Zellen wurden zwei Mal auf neue Zellen übertragen. + = CPE wurde durch die Proben verursacht, - = die Zellen wuchsen wie die Kontrollen ohne Virus, kein CPE konnte beobachtet werden. In der Tabelle sind nicht alle Zeitpunkte aufgeführt, da nicht immer eine Urinprobe vorhanden war.

Um sicher zu gehen, dass der beobachtete zytotoxische Effekt nicht spezifisch nur in RG2-Zellen auftrat, wurde eine weitere sensitive Zelllinie (NBK) mit den Urinproben inokuliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Urinproben auch in dieser Zelllinie einen CPE verursachten (Daten nicht gezeigt).

Da die Inokulation der sensitiven Zellen mit den Urinproben aus den Stoffwechselläufigen erneut zu keinem einheitlichen Ergebnis führte, wurde zusätzlich Nierengewebe der infizierten Ratten auf infektiöses Virus untersucht. Hierfür wurden Nierenstücke homogenisiert, steril filtriert und die Zellen mit dem Homogenisat inokuliert. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Nierenhomogenisates inokuliert, um eine semiquantitative Aussage über die Virusmenge treffen zu können. Die untersuchten Nierengewebe induzierten - in Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen - nach verschiedenen Zeitpunkten bei RG2 Zellen einen CPE. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopischen Aufnahmen von behandelten

Zellen 4 dpi. Es konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Nierenproben infektiöse Viren nachweisbar waren.

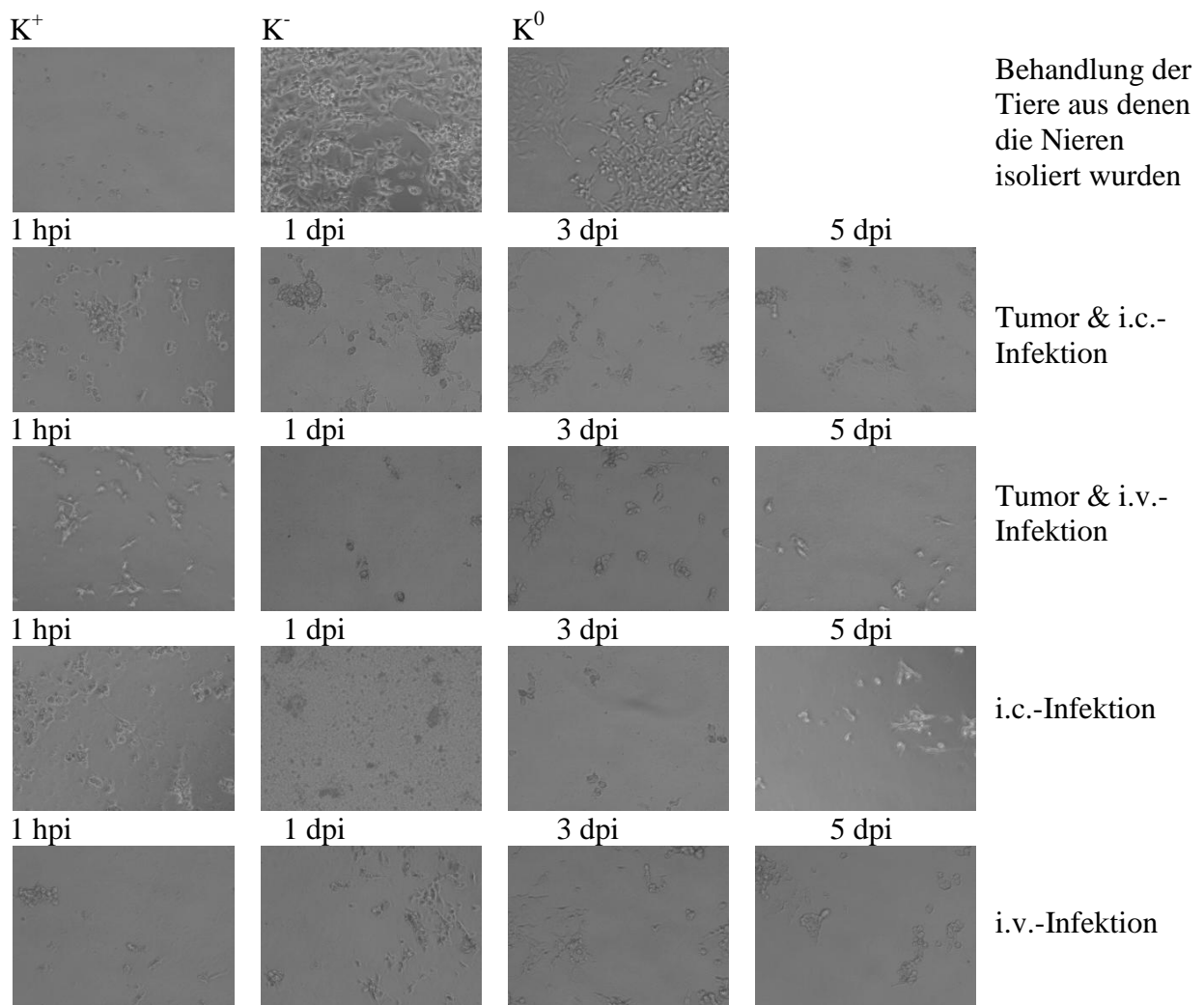


Abbildung 19: Nachweis infektiöser Viren im Nierengewebe

Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit sterilem Nierenhomogenisat inokulierten RG2-Zellen 4 Tage nach Inokulation. Aufnahmen mit einer 100-fachen Vergrößerung. K^+ = mit H-1PV infizierte Zellen, K^- = mit Nierenhomogenisat einer nicht infizierten Ratte behandelte Zellen, K^0 = unbehandelte Wachstumskontrolle

Auch der von Nierenhomogenisat verursachte CPE war auf neue Zellen übertragbar. Tabelle 11 zeigt einen Überblick, bis zu welcher Verdünnung und zu welchem Zeitpunkt nach Inokulation die Proben einen CPE verursachten.

Tabelle 11: Verursachung eines CPE durch Nierengewebe

Behandlung	Zeitpunkt der Gewebeentnahme	CPE		
		Verdünnung, 4 dpi	Verdünnung, 7 dpi	Passage 1, 5 dpi
Tumor i.c.	1 hpi	1:10 / +	-	-
	1 dpi	1:10 / +	-	-
	3 dpi	1:10 / +	1:10 / +	-
	5 dpi	1:10 / +	-	-
Tumor i.v.	1 hpi	1:10 / +	1:100 / +	+
	1 dpi	1:10 / +	1:10 / +	+
	3 dpi	1:10 / +	-	+
	5 dpi	1:10 / +	1:100 / +	+
i.c.	1 hpi	1:10 / +	-	+
	1 dpi	1:10 / +	1:10 / +	-
	3 dpi	1:10 / +	-	+
	5 dpi	1:10 / +	1:10 / +	+
i.v.	1 hpi	1:10 / +	1:100 / +	+
	1 dpi	1:10 / +	1:10000 / +	+
	3 dpi	1:10 / +	-	+
	5 dpi	1:10 / +	1:100 / +	+

RG2 Zellen behandelt mit Nierengewebe infizierter Tiere und dessen Verdünnungen.

1:10 Verdünnung = 100 µl Nierenhomogenisat auf 1 ml Zellkulturmedium, + = CPE, - = kein CPE

Die Ergebnisse der CPE-Induktion von Nierenproben stimmten weitgehend mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der Urinproben überein. Es konnte bei allen i.v.-infizierten Tieren infektiöses Virus in der Niere nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob ein Hirntumor vorhanden war oder nicht. Bei den i.c.-infizierten Tieren konnten 1 h nach Infektion der Ratten infektiöse Viruspartikel detektiert werden, anschließend waren die Proben negativ für H-1PV und nach 3 und 5 Tagen erneut positiv. Bei der Gruppe der tumortragenden Tiere mit einmaliger i.c.-Infektion konnte der CPE zu keinem der untersuchten Zeitpunkte auf neue Zellen übertragen werden.

C) Speichelproben

Mittels PCR konnte in den Speichelproben für einen Zeitraum von maximal 2 bis 41 Tagen nach Infektion virale DNA nachgewiesen werden (Tabelle 12). Vorher (1 dpi) konnte keine virale DNA in Speichelproben infizierter Ratten detektiert werden.

Tabelle 12: Nachweis viraler DNA in Speichelproben

Behandlung	Zeitpunkt der Speichelentnahme
Tumor i.c.	6,7,8,9,10, 27, 41
Tumor i.v.	5, 6
i.c.	3,6,7,8,9,10, 27, 41
i.v.	2,3,6,7,8,9,10, 27, 41

Übersicht über die Speichelproben, die in der PCR ein positives Ergebnis zeigten. Die Tumorzellimplantation erfolgte 7 Tage vor der einmaligen Infektion.

Während bei allen infizierten Tieren nach ca. einer Woche regelmäßig virale DNA in den Speichelproben nachgewiesen werden konnte, unabhängig von der Applikationsart des Virus und der Anwesenheit eines Tumors, war bei den i.v.-behandelten Tieren auch zu früheren Zeitpunkten (2 und 3 dpi) virale DNA im Speichel nachweisbar. Bei allen Speichelproben von infizierten Tieren ließ sich zu den späten Zeitpunkten (27 und 41 dpi) H-1PV DNA nachweisen. Abbildung 20 zeigt eine grafische Darstellung der PCR-Ergebnisse der untersuchten Speichelproben in den verschiedenen Tiergruppen von 1-10 dpi.

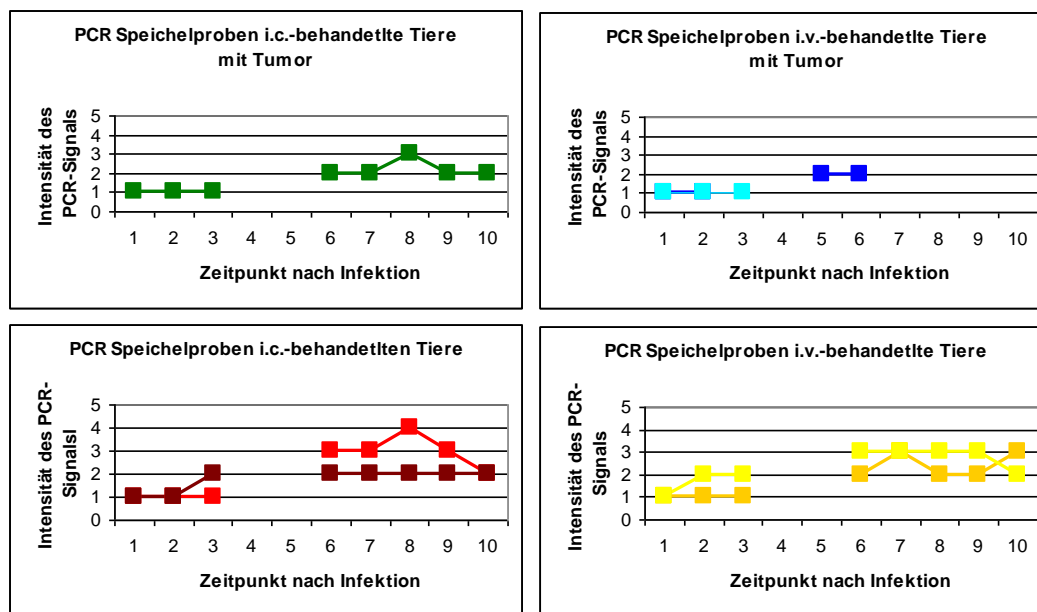


Abbildung 20: Nachweis viraler DNA in Speichelproben im zeitlichen Verlauf

Grafische Darstellung der PCR-Resultate zum Nachweis von H-1PV-DNA in Speichelproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in den verschiedenen Tiergruppen. Untersuchung der Speichelproben von jeweils 2 Tieren pro Behandlungsgruppe (außer Tumor + i.c.-Infektion). Die tumortragenden Tiere nach einer einzigen i.v. Infektion starben innerhalb einer Woche an den Symptomen des wachsenden Tumors. Y-Achse: 1 = Probe vorhanden und Signal negativ, 2 = Signal positiv, 3 = Signal stark positiv, 4 = Signal sehr stark positiv

Die Analyse der Speichelproben auf virale DNA ergab einen deutlichen Unterschied zwischen tumortragenden und nicht tumortragenden Tieren. Nach i.c.- und i.v.-Infektion von nicht tumortragenden Ratten schieden die Tiere zu frühen Zeitpunkten DNA aus (ab Tag 2), während bei tumortragenden Tieren erst ca. eine Woche nach Infektion virale DNA im Speichel nachweisbar war. Da die tumortragenden Tiere, welche i.v.-infiziert worden waren, maximal 6 Tage nach Virusapplikation überlebten, kann hier keine Aussage über einen späteren Zeitpunkt nach Infektion getroffen werden.

Die quantitative Untersuchung der viralen DNA-Konzentration im Speichel ergab bei einem Einsatz von 30 ng Gesamt-DNA eine Menge an viralen Genomen im Bereich von 1×10^4 – 1×10^6 Vg/ml Speichel (Abbildung 21). Dies entspricht ungefähr der Konzentration, die im

Urin der Tiere gefunden wurde. Des Weiteren zeigte sich, dass die Ausscheidung viraler DNA über Speichel hauptsächlich in der zweiten Woche nach Infektion stattfand. Aber auch 27 und sogar 41 Tage nach Infektion konnten immer noch geringe Mengen viraler DNA in den Speichelproben detektiert werden. Die Nachweisgrenze lag hier bei $1,5 \times 10^4$ Vg/ml. Somit lagen die an Tag 1 - 3 gemessenen Speichelproben unter dieser Grenze, was bedeutet, dass einzig die i.v.-infizierten Tiere ohne Tumor 2 Tage nach Infektion ein positives Ergebnis in der PCR erzielten. Bei allen anderen Proben konnte erst nach 5 Tagen oder später virale DNA nachgewiesen werden. Die Gruppe der tumortragenden Tiere nach i.c.-Behandlung schied dabei die geringste Menge an viraler DNA über den Speichel aus. Ab 27 Tagen nach Infektion war die ausgeschiedene Konzentration viraler DNA in allen Behandlungsgruppen ähnlich.

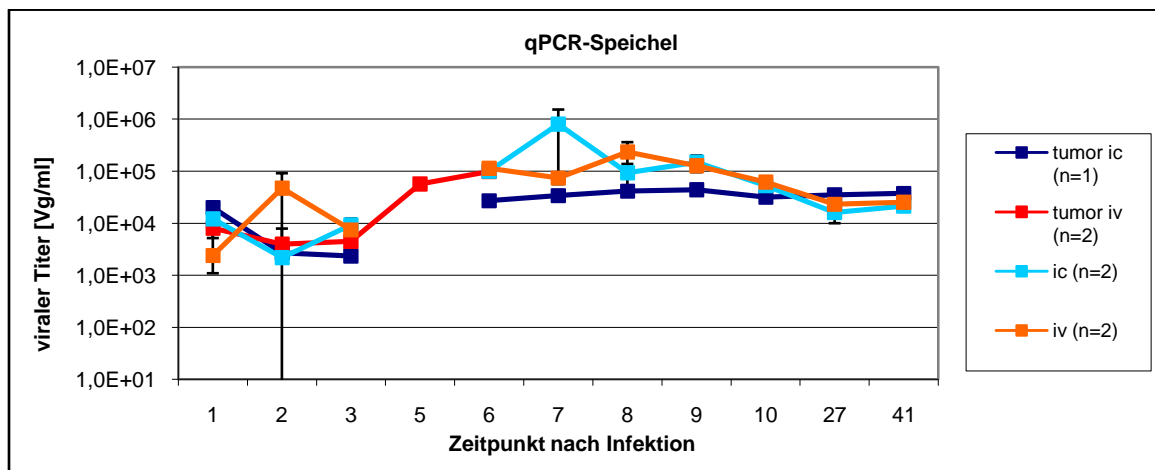


Abbildung 21: Quantifizierung viraler DNA in Speichelproben

Bestimmung der Menge viraler Genome in Speichelproben mit qRT-PCR. Untersuchung der in der Standard-PCR für H-1PV positiven Speichelproben der 4 verschiedenen Behandlungsgruppen nach einmaliger Infektion. Nachweisgrenze: $1,5 \times 10^4$ Vg/ml. Fehlerbalken = Standardfehler

Die Anwesenheit infektiöser Viren im Speichel infizierter Tiere konnte durch die Induktion eines zytopathischen Effekts zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion gezeigt werden. Exemplarisch werden in

Abbildung 22 einige lichtmikroskopische Aufnahmen der behandelten RG2-Zellen mit den entsprechenden Kontrollen gezeigt.

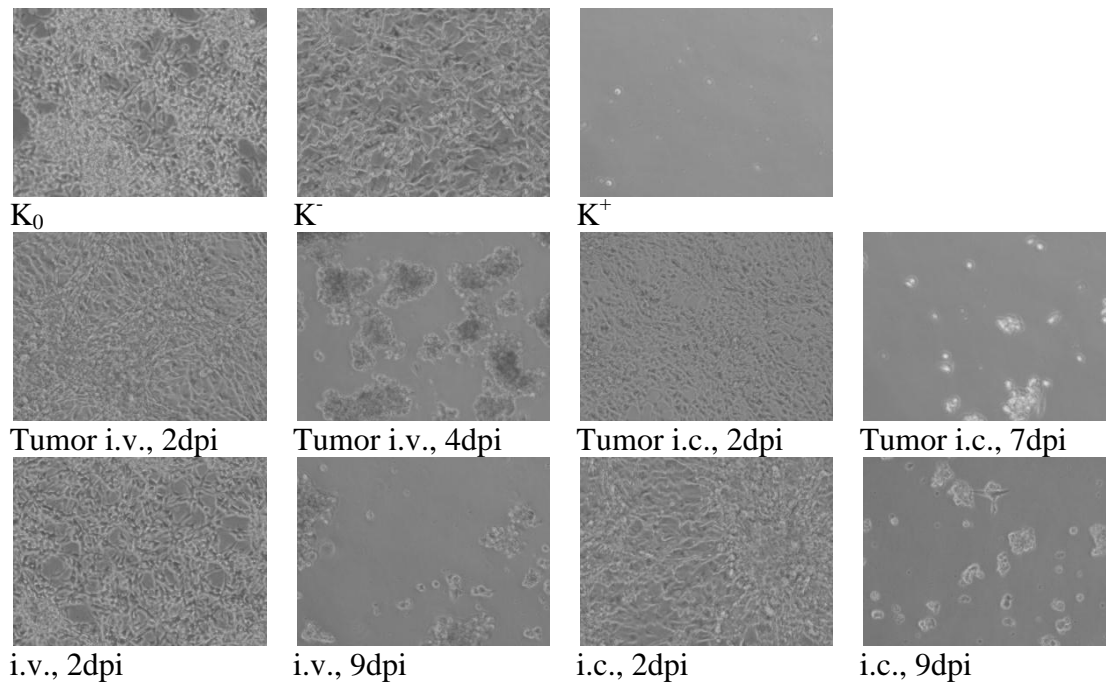


Abbildung 22: Effekt von Speichelproben auf RG2 Zellen
 lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Speichelproben inokulierten RG2 Zellen mit den entsprechenden Kontrollen in 100-facher Vergrößerung 6 Tage nach Inokulation der Zellen. Die Infektion erfolgte ohne Medium mit 100 µl Speichelprobe in PBS, bzw. 100µl serumfreiem Medium. K₀ = unbehandelte Zellen, K⁻ = RG2 Zellen behandelt mit Speichelproben von nicht infizierten Tieren (gepoolte Probe aus verschiedenen Tieren), K⁺ = mit H-1PV infizierte RG2 Zellen

Bei der Analyse der infektiösen Viren in Speichelproben infizierter Tiere waren bereits 1 h nach Infektion und dann wieder nach ca. 1 Woche infektiöse Viren im Speichel nachweisbar. Dies war unabhängig von der Anwesenheit eines Tumors in drei der untersuchten Tiergruppen der Fall. Einzig das tumortragende Tier nach i.c.-Infektion bildete davon eine Ausnahme; hier konnte erst 6 Tage nach Infektion ein CPE bei RG2-Zellen beobachtet werden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die untersuchten Proben und deren Effekt auf RG2 Zellen.

Tabelle 13: Effekt von Speichelproben auf RG2 Zellen

Behandlung	Zeitpunkt der Speichelentnahme [hpi bzw. dpi]	CPE
Tumor i.c.	6-27	+
	1h, 1,2,3,4	-
Tumor i.v.	1h, 4-6	+
	1,2,3	-
i.c.	1h, 6-27	+
	1,2,3	-
i.v.	1h, 6-27	+
	1,2,3	-

Auch im Falle der Speichelproben sollte durch weitere Passage auf neue Zellen ausgeschlossen werden, dass der CPE durch Speichelbestandteile verursacht wird. Dieses Experiment zeigte, dass - wie auch bereits bei den Urinproben festgestellt - die Infektiösität im Überstand passagiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Analog zu der Analyse des Nierengewebes bei der Ausscheidung von Viren über Urin wurden bei einigen infizierten Tieren post mortem aus Nasengewebe Proben entnommen und auf die Anwesenheit von H-1PV hin untersucht.

D) Nasengewebe

Aus dem Nasengewebe der Ratten konnte nur sehr wenig Probenmaterial gewonnen werden, was ein Grund für die seltene Detektion viraler DNA sein könnte. In den untersuchten Nasengeweben konnte nur bei den i.v. infizierten Tieren virale DNA detektiert werden. Hierbei zeigte das tumortragende Tier bereits 1 h nach i.v.-Infektion ein positives PCR-Ergebnis, jedoch zu den untersuchten späteren Zeitpunkten nicht mehr. Bei den i.c.-infizierten Tieren konnte in der Nase keine virale DNA gefunden werden, unabhängig davon, ob das Tier einen Tumor implantiert bekommen hatte oder nicht. Die Analyse der extrahierten DNA aller Nasenproben ergab die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 14: Nachweis viraler DNA in Nasengewebe infizierter Ratten

Behandlung	Zeitpunkt der Gewebeentnahme	PCR
Tumor i.c.	1 hpi	-
	3 dpi	-
	5 dpi	-
Tumor i.v.	1 hpi	+
	3 dpi	-
	4 dpi	-
	5 dpi	-
i.c.	1 hpi	-
	3 dpi	-
	5 dpi	-
i.v.	1 hpi	-
	3 dpi	+
	5 dpi	+

Stücke des isolierten Nasengewebes wurden auch auf infektiöse Viren getestet. Hierbei zeigte sich, dass das isolierte und steril filtrierte Nasenhomogenisat unterschiedlicher Proben in der Lage war, einen CPE bei RG2 Zellen zu induzieren. In Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen verursachten die Proben der tumortragenden Tiere nur nach i.v.-Infektion und

1 hpi einen CPE bei RG-Zellen. Alle anderen H-1PV-positiven Proben stammten von nicht tumortragenden Tieren (

Abbildung 23). Im Unterschied zu der PCR-Analyse verursachte jedoch die Probe des i.c.-infizierten Tieres, welche 1 h nach Infektion entnommen wurde, einen deutlichen CPE.

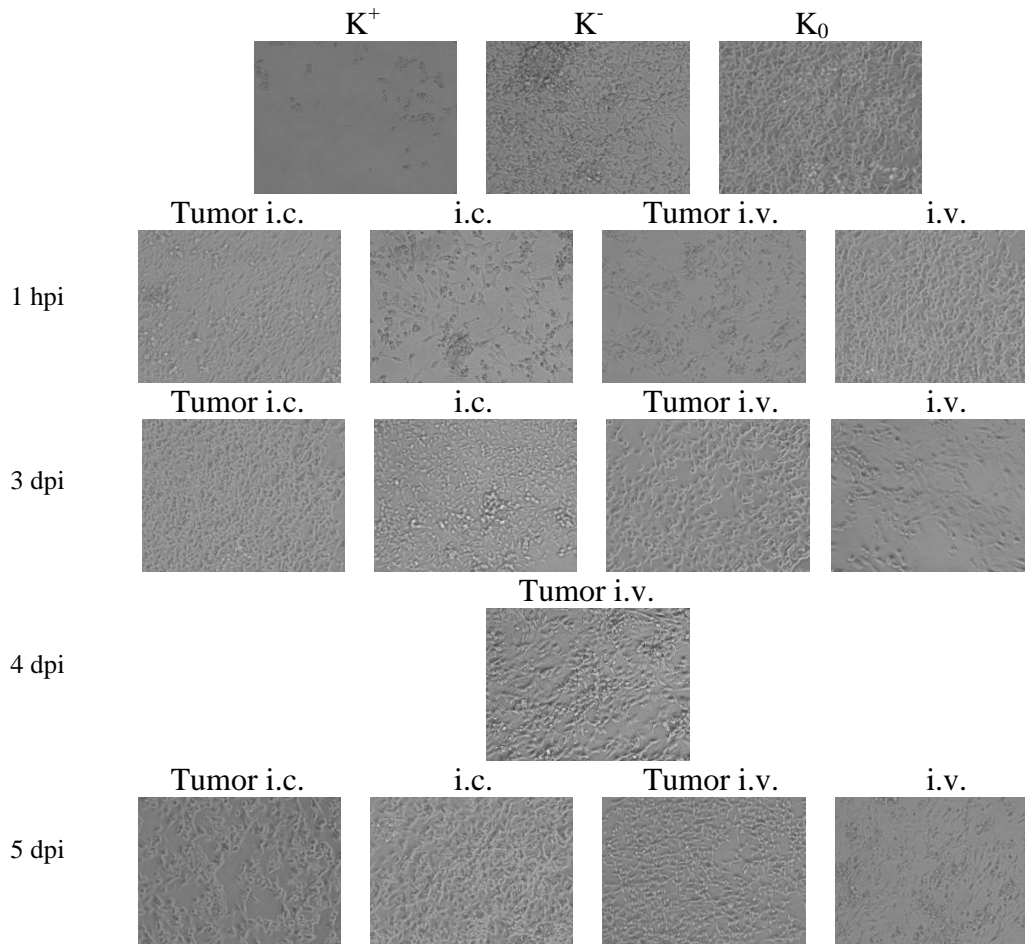


Abbildung 23: Effekt von Nasengewebe infizierter Ratten auf RG2 Zellen

Effekt des Nasengewebes infizierter Tiere auf RG2 Zellen 5 Tage nach Inokulation, K₀ = nicht infizierte Zellen, K⁺ = mit H-1PV infizierte Zellen, K⁻ = Zellen behandelt mit Nasengewebe von einem nicht infizierten Tier

Die PCR-Ergebnisse weichen bei einzelnen Proben von der Analyse der infektiösen Viren ab. Dennoch konnte bestätigt werden, dass der beobachtete CPE von einer Virusinfektion verursacht wurde, da sich dieser Effekt auch durch Passagieren auf neue Zellen übertragen ließ. Tabelle 15 zeigt das Ergebnis der Passage der Überstände auf neue Zellen 3 Tage nach Behandlung.

Tabelle 15: Effekt von Nasengewebe auf RG2 Zellen
 CPE verursacht durch Übertragung von Zellkulturüberständen
 von mit Nasengewebe infizierter Ratten behandelten RG2 Zellen

Behandlung	Zeitpunkt der Gewebeentnahme	CPE
Tumor i.c	1 h	+
	3	-
	5	-
Tumor i.v.	1 h	+
	3	-
	4	-
	5	+
i.c.	1 h	+
	3	+
	5	+
i.v.	1 h	+
	3	+
	5	+

Zusammenfassend ergab die Analyse der Ausscheidungsproben, dass sich virale DNA und infektiöse Viren im Urin und Speichel infizierter Ratten befinden, und dies somit die wahrscheinliche Infektionsquelle bei der Übertragung zwischen den Tieren ist. Im Gegensatz dazu konnte in den untersuchten Kotproben keine virale DNA oder infektiöses Virus nachgewiesen werden. Außerdem konnten im Nieren- und Nasengewebe infizierter Tiere infektiöse Viren nachgewiesen werden, was aber durch eine Verteilung über das Blut mit sich gebracht haben könnte.

Da infektiöse Viren im Speichel und in der Nasenschleimhaut detektiert werden konnten, könnte die Tröpfcheninfektion eine natürliche Infektionsroute für H-1PV darstellen. Daher sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Infektion und Wirksamkeit von H-1PV über die *intranasale* Route untersucht werden. Die Übertragung der Infektion zwischen den Tieren durch Urin ist auch eine Möglichkeit, die aber unwahrscheinlich über die Käfiggrenze hinweg stattfindet. Hier könnte jedoch eine artifizielle Infektion durch die Tierpfleger beim Reinigen der Käfige stattfinden.

3.1.2 Intranasale Applikation von H-1PV

Der *intranasale* Applikationsweg (i.n.) für Substanzen, die ins Gehirn gelangen sollen, stellt eine einfache und schmerzfreie Methode der Verabreichung dar, die keinen chirurgischen Eingriff erfordert. Um diesen möglichen Übertragungsweg von H-1PV und dessen therapeutische Nutzung näher zu untersuchen, sowie zur Optimierung der H-1PV Therapie, sollte die Effizienz einer *intranasalen* Applikation von H-1PV im Rattengliommodell untersucht werden.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine einzige *intratumorale* bzw. mehrere *intravenöse* Applikationen von H-1PV im Rattengliommodell mit RG2 abgeleiteten Tumoren ausreichen, um eine vollständige Tumorregression herbeizuführen. Dabei wurde das Virus über den Organismus verteilt, die Expression viraler Proteine war jedoch stets auf das Tumorgebiet beschränkt. Bei immundefizienten RNU-Ratten mit U87-abgeleiteten Tumoren konnte mit einer Kombination von i.c. und i.v.-Infektion eine vollständige Heilung kleiner Tumore und ein Wachstumsarrest großer Tumore erzielt werden (Geletneky et al, 2010).

Analog dazu genügte eine *intranasale* Gabe von H-1PV (10^8 pfu) im immunkompetenten Rattenmodell mit RG2-abgeleitetem Tumor, um ein vollständiges Verschwinden des Tumors sowie ein signifikant längeres Überleben der Tiere im Vergleich mit den Kontrollen herbeizuführen. Im immundefizienten Xenograft-Modell (RNU-Ratte & U87-Zell-Tumor) führten mehrere *intranasale* Applikationen ($5\times$) des Virus zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens der tumortragenden Tiere im Vergleich mit den Kontrollen (Kiprianova et al, 2011).

Bei der Analyse des an den Tumor angrenzenden Gewebes der Tiere wurden - wie bereits für die *intratumorale* und die *intravenöse* Applikation gezeigt - keine pathologischen Veränderungen im gesunden Gehirngewebe festgestellt (vgl. Geletneky et al, 2010 und Kiprianova et al, 2011). Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass das Virus nach *intranasaler* Applikation in den Tumor gelangte und dort virale Proteine gebildet wurden.

3.1.2.1 Nachweis viraler DNA nach intranasaler Applikation

A) Im Gehirn

Zunächst wurde untersucht, ob nach *intranasaler* Applikation das Virus ins Gehirn und zu dem dort etablierten Tumor gelangt. Hierfür wurden verschiedene Bereiche des Gehirns *intranasal*-infizierter Ratten mittels PCR und Hybridisierung mit einer NS-1 spezifischen DNA-Sonde (vgl. 2.2.4.5) auf das Vorhandensein viraler DNA untersucht. Abbildung 24 zeigt, dass virale DNA nach *intranasaler* Applikation im Gehirn bzw. im Tumor 1 Tag nach

Infektion bei Wistar- und RNU-Ratten nachweisbar ist. Im Falle der tumortragenden Wistar-Ratten war eine Konzentration der viralen DNA im Tumorbereich innerhalb von 72 Stunden nach Infektion erkennbar (Abbildung 24 A). Bei den infizierten RNU-Ratten konnte gezeigt werden, dass sich das Virus vermehrt bei tumortragenden Tieren im Gehirn wieder findet, wobei das Signal hier aber 5 Tage nach Infektion deutlich schwächer war als einen Tag nach Virusgabe (Abbildung 24 B).

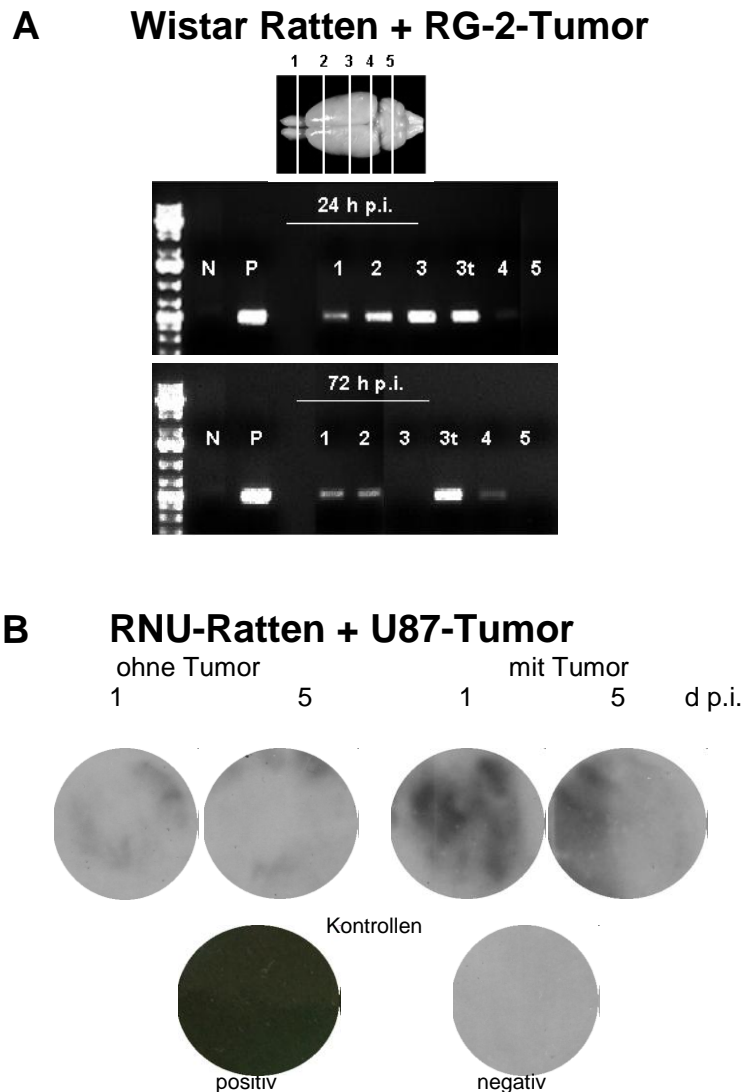


Abbildung 24: Detektion von H-1PV im Gehirn nach *intranasaler* Applikation

A) PCR mit Proben verschiedener Gehirnregionen von RG2-tumortragenden Wistar-Ratten 1 und 3 Tage nach Infektion (24 & 72 hpi). Das Schema über den Gelelektrophoresebildern zeigt die verschiedenen Regionen, die mittels spezifischer PCR untersucht wurden. Hierbei ist Region 3 unterteilt in tumortragende (3t) und contralaterale Hemisphäre (3). Als Negativkontrolle diente DNA aus Gehirngewebe von nicht infizierten Tieren, die Positivkontrolle war DNA aus infizierten RG2-Zellen.

B) Hybridisierung von Zellen nach Behandlung mit sterilisiertem Gehirnhomogenisat aus U87-tumortragenden RNU-Ratten 1 und 5 Tage nach Infektion. NBK Zellen wurden mit sterilem, homogenisiertem Gewebe aus den Gehirnen der Ratten behandelt und nach Auftreten eines CPEs auf eine Membran gesaugt und mit einer H-1PV spezifischen Sonde hybridisiert.

Da H-1PV nach i.c.- und i.v.-Infektion über die Blutbahn im Organismus verteilt wird und anschließend virale DNA in verschiedenen Organen nachgewiesen werden kann (Geletneky et al, 2010), sollte die Verteilung von H-1PV in der Ratte nach *intranasaler* Applikation ebenfalls analysiert werden.

B) Verteilung von H-1PV in den Organen nach i.n.-Infektion

Zusätzlich wurde die Verteilung der viralen DNA in den verschiedenen Organen untersucht. Die Verteilung der viralen Partikel nach *intranasaler* Applikation war am ersten Tag nach Infektion nicht vollständig. Während Milz und Leber in allen Tieren zu allen Zeitpunkten positiv für H-1PV-DNA waren, konnte im Herz sowie in der Lunge in mehreren Fällen keine virale DNA detektiert werden. Die Verteilung ist jedoch scheinbar nicht abhängig vom Zeitpunkt nach Infektion oder von der Anwesenheit eines Tumors. Tabelle 16 zeigt, zu welchem Zeitpunkt bei welcher Tiergruppe virale DNA mittels spezifischer PCR-Reaktion in den einzelnen Organen detektiert werden konnte.

Tabelle 16: Verteilung viraler DNA in Organen nach intranasaler Applikation von H-1PV

Rattenstamm und Tumorart	Zeitpunkt der Organentnahme [dpi]	Niere	Lunge	Herz	Milz	Leber	Darm
Wistar + RG2 Tumor	1	+	-	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+
Wistar	1	-	-	+	+	+	+
	3	+	-	-	+	+	+
RNU + U87 Tumor	1	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	-	+	+	-
RNU	1	+	-	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	-

Die Tumore wurden 7 Tage vor der Infektion implantiert, die Organe der verschiedenen Tiere wurden 1 und 3 Tage nach Infektion entnommen und die DNA mittels PCR untersucht. + = PCR-Ergebnis positiv für H-1PV, - = kein Fund viraler DNA in dem jeweiligen Organ zum angegebenen Zeitpunkt

Da bei den bisher untersuchten Applikationsmethoden zur Anwendung von H-1PV *in vivo* die Expression des viralen NS-1 Proteins stets auf das Tumorgewebe beschränkt war, soll analog dazu die Expression von NS-1 nach i.n.-Infektion der Expression von NS-1 nach i.c.- und i.v.-Applikation gegenüber gestellt werden.

3.1.2.2 Nachweis von NS-1 nach verschiedenen Applikationsarten im Tumorgewebe

Das virale NS-1 Protein von H-1PV gehört zu den frühen Proteinen, die nach einer Infektion der Wirtszelle gebildet werden. Es ist unter anderem für die Replikation notwendig und für die onkolytische Fähigkeit von H-1PV verantwortlich (Brandenburger et al, 1990; Rhode 1985, Rhode 1989). Daher ist seine Expression im Tumorgewebe von entscheidender Bedeutung bei der Therapie. Wie man in Abbildung 25 sehen kann, ist H-1PV nach i.v.- und i.n.-Infektion in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, den Tumor zu erreichen und dort NS-1 zu synthetisieren. Nach einer Infektion mit Parvovirus H-1 auf der *intranasalen* Route konnte gezeigt werden, dass die Expression des viralen NS-1 Proteins ebenso auf die Tumoreregion beschränkt war, wie auch bei den anderen Applikationsarten. In keinem Fall konnten virale Proteine in anderen Gehirnregionen oder Geweben detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Nach der i.c.-Infektion war das Signal im Tumorgebiet stärker als nach *intravenöser* oder *intranasaler* Applikation. Nach *intranasaler* Applikation konnte NS-1 erst 5 dpi im Tumor nachgewiesen werden, während nach i.c.- oder i.v.-Infektion bereits nach 3 Tagen NS-1 im Tumor detektiert werden konnte. Abbildung 25 zeigt die Produktion von NS-1 (grün) im Tumorgebiet nach Markierung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen. Die Zellkerne wurden durch ein DAPI-haltiges Eindeckmedium markiert.

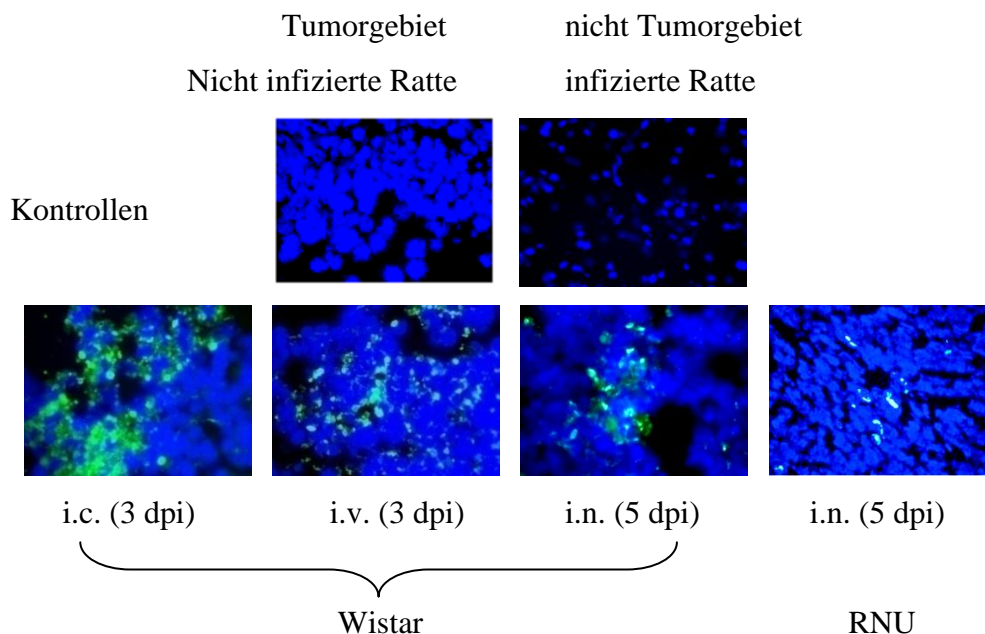


Abbildung 25: Nachweis des viralen NS-1 Proteins im Tumorgewebe
Nachweis von NS-1 im Tumorgebiet nach i.c.-, i.v.- oder i.n.-Infektion mittels Immunfluoreszenz. Grün: NS-1, blau: Zellkernfärbung mit DAPI. Kontrollfärbungen des Tumorgebietes einer nicht infizierten Ratte und eines Gehirngbietes ohne Tumor einer infizierten Ratte (In Zusammenarbeit mit Dr. I. Kiprianova)

Obwohl bei allen Applikationsarten die Bildung viraler Proteine (NS-1 und VP, Daten nicht gezeigt) auf das Tumorgebiet beschränkt war, konnte doch in verschiedenen Organen (z.B. in der Leber) virale DNA detektiert werden. Daher sollte anschließend untersucht werden, ob sich die Infektion mit H-1PV auf normales Gewebe pathologisch auswirkt.

3.1.2.3 Apathogenität von H-1PV in normalem Gewebe *in vivo*

Da in der Leber zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Infektion virale DNA nachgewiesen werden konnte, wurden Gewebeschnitte von gesunden Gehirnabschnitten, vom Tumorgebiet und von der Leber von infizierten und nicht infizierten Ratten nach HE-Färbung histologisch analysiert. Mit dieser Methode können pathologische Gewebeveränderungen sichtbar gemacht werden (vgl. 2.2.7.1). Nach Infektion der Tiere mit H-1PV zeigten sich ausschließlich im Tumorbereich nekrotische Veränderungen.

Abbildung 26 zeigt exemplarisch die Gewebeveränderungen nach *intratumoraler* Infektion mit H-1PV. Auch nach *intravenöser* und *intranasaler* Applikation konnten keine pathologischen Veränderungen in anderen Gebieten als dem Tumorbereich festgestellt werden (Geletneky et al, 2010; Kiprianova et al, 2011).

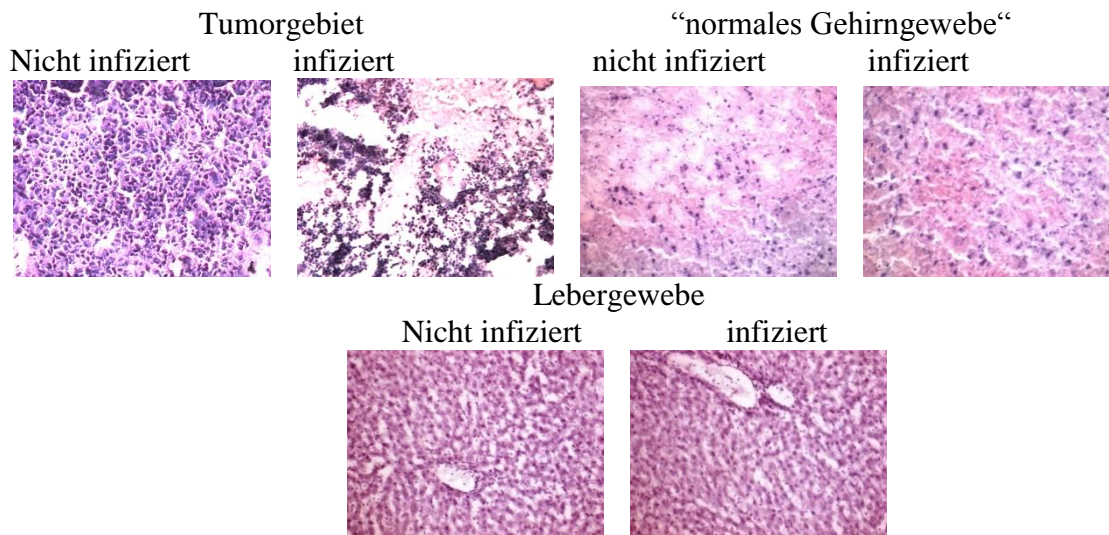


Abbildung 26: Untersuchung pathologischer Veränderungen nach Infektion HE-Färbung der Gehirne und Lebern von infizierten und nicht infizierten tumortragenden Wistar-Ratten. Ausschließlich im Tumorgebiet konnte nach Infektion eindeutig eine nekrotische Gewebeveränderung nachgewiesen werden. Färbung in Zusammenarbeit mit Dr. I. Kiprianova

Obwohl H-1PV keine histologisch nachweisbaren pathologischen Veränderungen in den Organen verursachte, konnte nach allen Applikationsarten transient virale DNA in verschiedenen Organen detektiert werden. Offenbar wird das Virus auch nach i.c.- und i.n.-Infektion über die Blutbahn im Organismus verteilt. Um zu untersuchen, wann und wie lange

Virus im Blut nach den verschiedenen Applikationsarten nachgewiesen werden kann, wurden Blutproben von infizierten Ratten analysiert.

3.1.2.4 Nachweis einer Virämie nach H-1PV-Infektion im Rattenmodell

Die tägliche Blutabnahme bei den Ratten aus der Schwanzvene ergab nur eine sehr geringe Menge, die nicht für Zytotoxizitätsexperimente ausreichte. Dennoch konnte gezeigt werden, dass bei allen infizierten Tieren eine Virämie auftrat. Um den zeitlichen Verlauf der Virämie zu untersuchen, wurde die Anwesenheit viraler DNA im Blut mittels PCR untersucht.

Abbildung 27 gibt einen Überblick über die PCR-Ergebnisse der Blutproben der einzelnen Tiere nach i.c.- und i.v.-Infektion. Bei der Analyse der Blutdaten sind deutlich zwei Peaks zu erkennen. Bei allen Gruppen - mit Ausnahme der tumortragenden Tiere nach i.v.-Infektion - konnte 1 dpi virale DNA im Blut nachgewiesen werden; anschließend war das Signal negativ und wurde ca. 1 Woche nach Infektion wieder positiv für H-1PV. Dies trat unabhängig von der Anwesenheit eines Tumors auf.

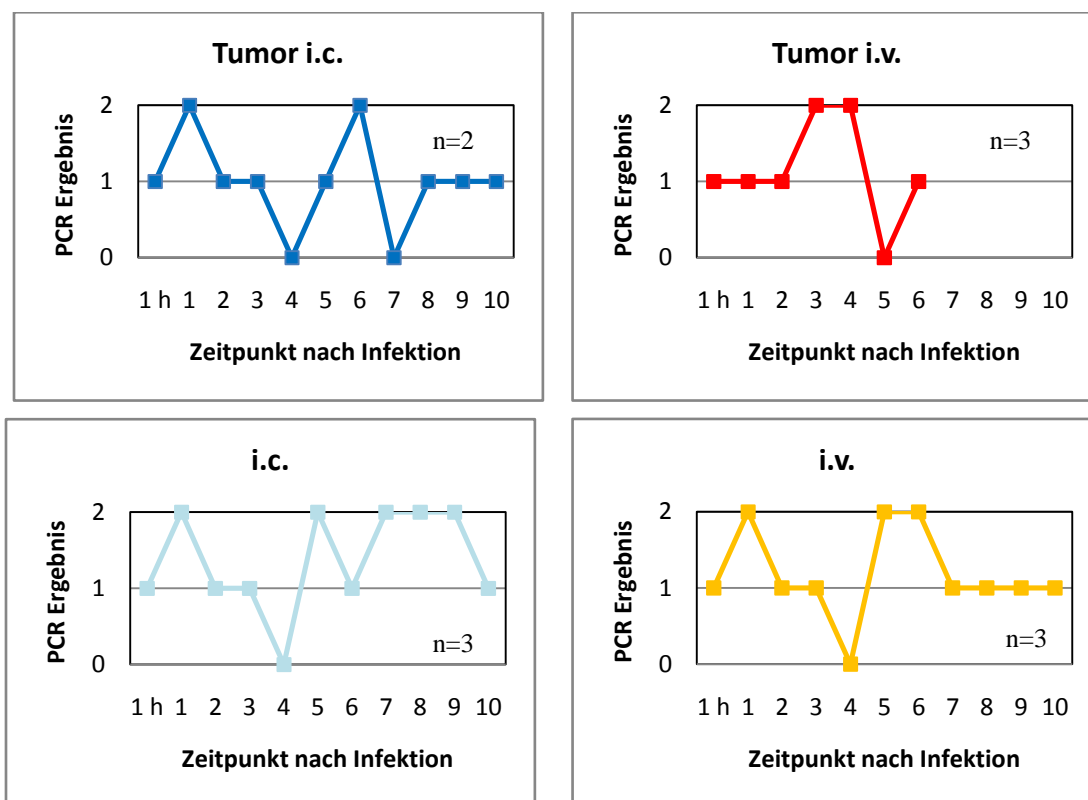


Abbildung 27: Nachweis viraler DNA im Blut

Grafische Darstellung der Ergebnisse der PCR der Blutproben von i.c.- und i.v.-infizierten Tieren mit und ohne Tumor über einen Zeitraum von 10 Tagen. 0 = keine Probe vorhanden, 1 = PCR negativ, 2 = PCR positiv für H-1PV

Nach *intranasaler* Applikation wurden die Blutproben nur zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (1 und 5 dpi). Alle PCR-Ergebnisse nach i.c.-, i.v.- und i.n.-Infektion der verschiedenen Tiere sind in Tabelle 17 zusammengestellt, wobei die Analyse der Blutproben unterschiedlicher Tiere zum gleichen Zeitpunkt manchmal voneinander abwich. Es konnte gezeigt werden, dass bei den tumortragenden Tieren mit i.c- oder i.n.-Infektion 1 Tag nach Infektion immer virale DNA im Blut detektiert werden konnte. Die tumortragenden Tiere mit i.v.-Infektion zeigten keine einheitlichen Ergebnisse, jedoch konnte hier eine Woche lang virale DNA nachgewiesen werden. Bei den Tieren ohne Tumor konnte nach *intranasaler* Infektion zu keinem untersuchten Zeitpunkt im Blut H-1PV-DNA detektiert werden. Die i.v.-Infektion ohne Tumor unterschied sich nicht von der bei tumortragenden Tieren, während die i.c.-Infektion bei Tieren ohne Tumor an mehreren Zeitpunkten zur Ausscheidung viraler DNA führte als bei den tumortragenden Tieren.

Tabelle 17: Nachweis viraler DNA im Blut

Tierstamm		Wistar						RNU	
Tumor		Tumor						Tumor	
Infektion		i.c.	i.v.	i.n.	i.c.	i.v.	i.n.	i.n.	i.n.
Zeitpunkt nach Infektion [hpi / dpi]	1 h	-	-		-	-			
	1 d	+	- / +	+	+	+	-	+	-
	2 d	-	- / +		- / -	- / + / -			
	3 d	-	+		-	- / + / -			
	4 d		+ / +						
	5 d	-	+	-	+	+	-	-	-
	6 d	+	-		-	+ / +			
	7 d				- / +	-			
	8 d	-			- / +	-			
	9 d	-			+	- / -			
	10 d	-			-	- / +			

Übersicht über die Untersuchung der Blutproben infizierter Tiere mit PCR nach viraler DNA. Die Ergebnisse der PCR-Reaktion waren nicht bei allen Tieren einer Gruppe gleich, daher sind in der Tabelle alle erhaltenen Ergebnisse nebeneinander dargestellt.

Die quantitative Analyse der viralen DNA in den Blutproben der infizierten Tiere ergab nur bei den i.v.-infizierten Tieren von Tag 1 - 3 nach Infektion Werte über der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung auf neutralisierende Antikörper gegen H-1PV im Serum nach den verschiedenen Applikationsmethoden ergab, dass die i.c.-infizierten Tiere Antikörper nach 4 - 7, und die i.v. infizierten Tiere nach 5 - 7 Tagen aufwiesen, während nach *intranasaler* Applikation Antikörper zwischen 5 und 10 Tagen nach Infektion nachweisbar waren (Geletneky et al, 2010; Kiprianova et al, 2011).

Somit konnte durch die Analyse des Blutes das Auftreten einer Virämie bei allen infizierten Tieren einschließlich der Bildung neutralisierender Antikörper gegen H-1PV gezeigt werden.

Wie bereits erwähnt, wird H-1PV nach allen Applikationsarten im Organismus über die Blutbahn meist innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion verteilt, die Expression der viralen Proteine ist aber stets auf das Tumorgewebe beschränkt. Nun sollte untersucht werden, ob H-1PV tatsächlich auch nach der Proteinexpression in der Lage ist, sich *in vivo* im Tumorgebiet zu replizieren und infektiöse Nachkommen zu bilden. Diese könnten nach einmaliger Applikation initial nicht infizierte Zellen inklusive etwaiger Metastasen infizieren und somit die verabreichte virale Dosis vor Ort erhöhen.

3.1.3 Replikation von H-1PV nach onkolytischer Virotherapie von Gliomen

3.1.3.1 Replikation von H-1PV *in vitro* unter Zellkulturbedingungen

Das Parvovirus H-1 kann sich in unterschiedlichen transformierten Zelllinien verschiedener Spezies erfolgreich vermehren. Dazu gehören unter anderem Rattenzelllinien wie RG2 und C6 aber auch humane Zelllinien, wie z.B. NBK. In anderen transformierten humanen Zelllinien kann sich das Virus jedoch nicht so effizient vermehren, es kann oft nur einen Teil der Zellen infizieren und töten (Herrero Y Calle, 2004; Faisst et al, 1995). Die nicht infizierten Zellen beginnen anschließend wieder zu wachsen, da wenige oder keine infektiösen Nachkommen von H-1PV gebildet werden. Abbildung 28 zeigt die virale DNA-Replikation unter Zellkulturbedingungen in den Zelllinien RG2 und NBK. Hier können alle 3 typischen replikativen Formen (ssDNA, mRF, dRF) der DNA-Vermehrung gezeigt werden (Berns, 1990). Die DNA-Replikation von H-1PV war in den Rattenzellen (RG2) effizienter als in der humanen Zelllinie NBK, was man deutlich an der Intensität des Signals der Southern Blot-Analysen erkennen kann.

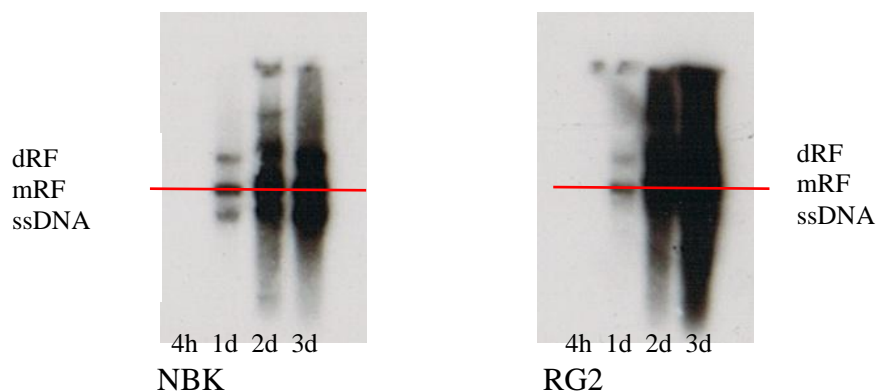


Abbildung 28: DNA-Replikation von H-1PV *in vitro*
Southern Blot Analysen der viralen DNA Replikation *in vitro* in den Zelllinien NBK und RG2, von 4 Stunden bis 3 Tage nach Infektion. dRF: doppelte replikative Form, mRF: monomere replikative Form, ssDNA: Einzelstrang DNA

In vitro, kann neben der DNA-Vermehrung eine deutliche Zunahme infektiöser Viren in den Zelllinien RG2 und NBK gezeigt werden. In RG2-Zellen scheint die Produktion viraler Nachkommen effizienter als in NBK-Zellen, da der Titer dort schneller auf einen hohen Wert stieg. Hier wurden jedoch nur die Zell-assoziierten Viren im Pellet untersucht, die in den Überstand freigesetzten Viren wurden hier nicht berücksichtigt. Abbildung 29 zeigt die Zunahme der viralen Partikel in RG2 und NBK Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infektion.

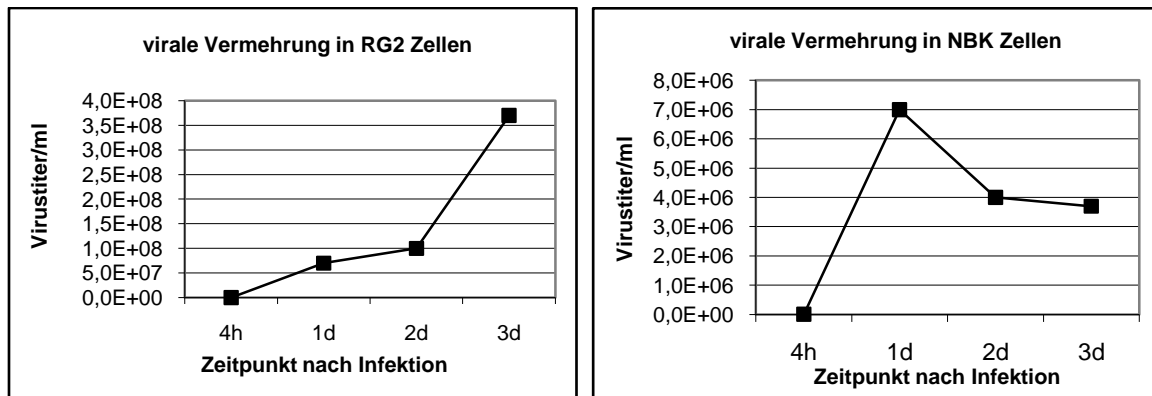


Abbildung 29: Produktion infektiöser Viren *in vitro*
 Vermehrung von H-1PV *in vitro* in den Zelllinien RG2 und NBK über einen Zeitraum von 4 h bis 3 Tagen nach Infektion mit einer MOI von 1 pfu/Zelle, Messung des Zell-assoziierten Virustiters/ml Suspension

Die Vermehrung von Viren *in vitro* unterscheidet sich deutlich von der Replikation *in vivo*, da dann das Immunsystem des Wirtes eine antivirale Immunantwort erzeugt, die die Vermehrung der Viren aktiv hemmt (Prestwich et al, 2009). Hier soll die Fähigkeit von H-1PV nach onkolytischer Virotherapie von Gliomen im immunkompetenten Rattemodell analysiert werden.

3.1.3.2 Replikation von H-1PV *in vivo* in der immunkompetenten Ratte

A) DNA-Replikation

Die Gehirne von infizierten Wistar Ratten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach H-1PV-Infektion entnommen, um die Vermehrung der viralen DNA dort zu untersuchen. Hierbei wurden die beide Hemisphären (tumortragende (r) und contralaterale Hemisphäre (l)) jeweils voneinander getrennt. Abbildung 30 zeigt die Analyse der viralen DNA aus Gehirnhomogenisaten nach Hybridisierung mit einer H-1PV-spezifischen Sonde. In den untersuchten Gehirnen konnte mit dieser Methode nur eine virale DNA-Form nach einer Stunde bzw. nach einem Tag bei den tumortragenden Tieren nach i.c.-Infektion detektiert werden. Das Signal in den Hemisphären eine Stunde nach Infektion kann jedoch nur das applizierte Virus anzeigen (input), da der virale Replikationszyklus 8-16 Stunden benötigt (J. Rommelaere, persönliche Mitteilung; vergleiche auch für MVM: Tullis et al, 1994). Die hier gezeigte Einzelstrang-DNA (ssDNA) ist die entpackte DNA-Form nach Eintritt des Virus in den Zellkern. Die beiden anderen Formen (mRF und dRF) konnten hier nicht nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch, dass sich bei Anwesenheit eines Tumors 1 dpi die virale DNA dort konzentriert vorlag, während sie ohne Tumor gleichmäßig verteilt in beiden Hemisphären nachweisbar war. An Tag 3 nach Infektion ist die Konzentration der viralen DNA so gering, dass gar kein Signal mehr erfasst werden konnte (Daten nicht gezeigt).

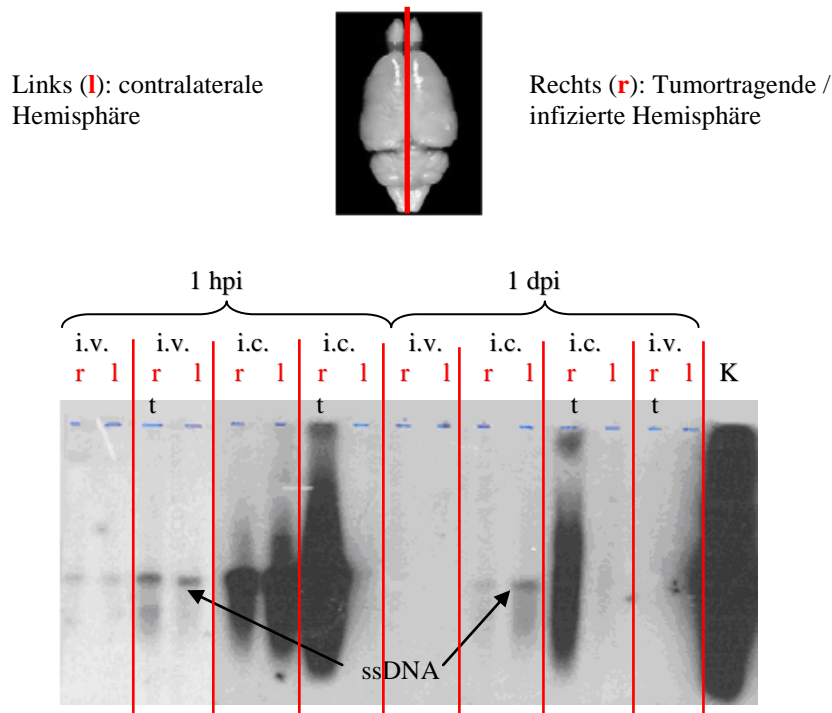


Abbildung 30: DNA-Replikation von H-1PV im Gehirn infizierter Ratten

Southern Blot Analyse der Replikation viraler DNA im Gehirn von Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.c- oder i.v.-Infektion (1 h – 1 dpi). Darstellung des Rattengehirns mit Unterteilung in rechte und linke Hemisphäre. r: DNA aus der tumortragenden bzw. infizierten Hemisphäre des Gehirns, l: contralaterale Hemisphäre ohne Tumor, bzw. korrespondierende DNA aus der linken und rechten Hemisphäre nach i.v.-Infektion, t: tumortragendes Tier, K = Kontrolle (mit H-1PV infizierte RG2 Zellen), ssDNA = Einzelstrang-DNA von H-1PV

Bei der Untersuchung der viralen Vermehrung sollte zusätzlich die Bildung infektiöser viraler Partikel gezeigt werden. Dabei wurden Stücke der Gehirne – getrennt nach Hemisphären, wie bei der Analyse der DNA-Replikation beschrieben – homogenisiert, steril filtriert und mittels Plaque Assay die Menge an infektiösen Viren bestimmt. Als Vergleich wurden Stücke der Leber verwendet, da zu allen Zeitpunkten nach allen Applikationsarten virale DNA in der Leber nachgewiesen werden konnte (i.c./i.v. vgl. Geletneky et al, 2010). Wenn sich H-1PV im Tumorgewebe vermehren kann, sollte ein deutlicher Unterschied in der detektierbaren Menge zwischen Leber und Gehirn bestehen.

B) Synthese infektiöser Nachkommen von H-1PV im Gehirn

Zum Nachweis infektiöser Viren wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion getötet und das Gehirn sowie ein Teil der Leber (als Vergleich; De Silva et al, 2010) entnommen. Die Organe wurden in PBS homogenisiert und 1 ml der Lösungen steril filtriert. Mit diesen Proben wurden dann Plaque Assays durchgeführt. Abbildung 31 zeigt die Rückgewinnung viraler Partikel in % verglichen mit der Inputmenge an H-1PV bei den verschiedenen Applikationsarten. Man kann deutlich erkennen, dass die Anzahl der

infektiösen Viren, die nach der Infektion im Gewebe detektiert werden können, sehr gering ist. Nach einer Infektion mit $10^8 - 10^7$ pfu konnten schon 1 h nach Infektion nur $\leq 1\%$ der Viren wiedergefunden werden. Des Weiteren sieht man, dass über den beobachteten Zeitpunkt im Gehirn die Virusmenge stetig abnahm, während sie in der Leber relativ konstant blieb. Bei den i.c.-infizierten Tieren konnte jedoch in der Leber nur zu wenigen Zeitpunkten infektiöses Virus nachgewiesen werden. Bei den i.v.-infizierten Ratten war auffällig, dass bei den tumortragenden Tieren weniger infektiöses Virus in der Leber nachgewiesen werden konnte im Vergleich mit der Leber von tumorfreien Ratten (Abbildung 31). Auch bei den *intranasal* behandelten Tieren zeigten alle Gehirnproben eine Abnahme der Menge an funktionstüchtigen Viren von 1 bis 5 Tagen nach Infektion (Daten nicht gezeigt).

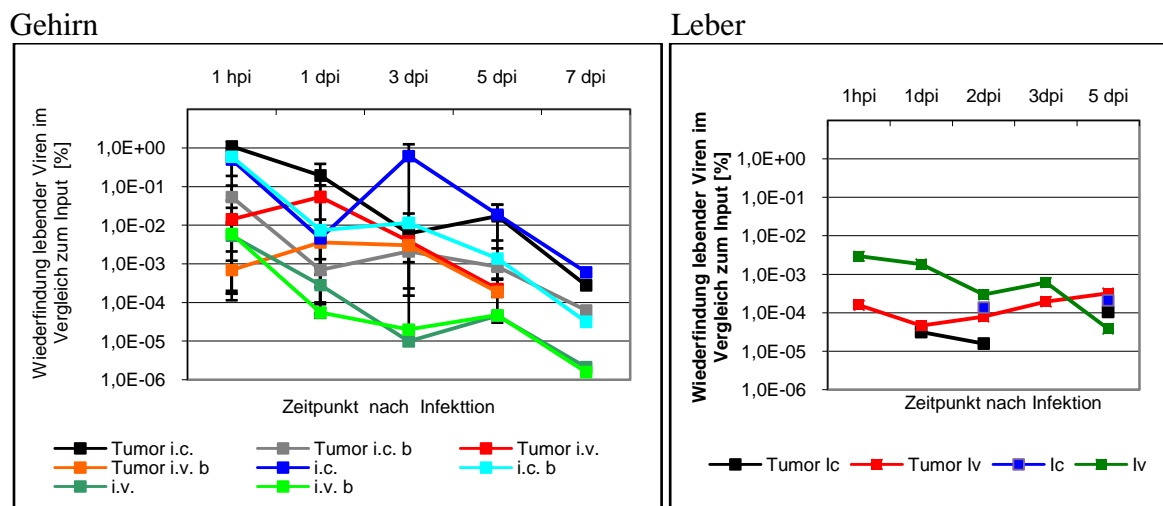


Abbildung 31: Rückgewinnung infektiöser Viren im Gehirn und der Leber

Rückgewinnung infektiöser Viren nach i.c. oder i.v. Infektion im Gehirn und der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bei tumortragenden und nicht tumortragenden Ratten. Fehlerbalken = Standardfehler

Prinzipiell waren nach i.c.-Infektion mehr Viren im Gehirn nachweisbar als nach i.v.-Infektion. Interessanterweise konnte bei den tumortragenden Tieren zu den frühen Zeitpunkten (1 h – 1 dpi) ein deutlicher Unterschied in der Virusmenge zwischen der tumortragenden und der contralateralen Hemisphären bei beiden Infektionsarten gezeigt werden (i.c. & i.v. jeweils 1 log Stufe mehr in der Tumorchemisphäre). Bei den Tieren ohne Tumor verteilte sich das Virus nach i.c.-Infektion anfangs gleichmäßig über beide Hemisphären, in der infizierten Hemisphäre blieb der Virustiter aber länger erhöht im Vergleich mit der contralateralen Hemisphäre (Tag 3 bis 7 nach Infektion). Nach i.v.-Infektion von nicht tumortragenden Tieren konnte die geringste Menge infektiöser Viren gezeigt werden, die sich gleichmäßig über beide Hemisphären verteilte. Die tumortragenden Tiere nach i.v.-Infektion zeigten alle einen höheren Virustiter ähnlich dem nach i.c.-Infektion.

7 Tage nach Infektion konnten von den tumortragenden Tieren mit einer einzigen i.v.-Infektion keine Daten mehr erhalten werden, da diese Tiere vorher an den Folgen des Tumors starben. Zu diesem Zeitpunkt war auch nach i.c.-Infektion nur noch ein Unterschied zwischen den infizierten und den contralateralen Hemisphären zu sehen. Die Virusrückgewinnung war in der infizierten Hemisphäre 7 dpi besser, unabhängig von der vorherigen Implantation eines Tumors, was nicht überrascht, da im Schnitt 7 Tage nach i.c.-Infektion kein Tumor im Gehirn mehr nachweisbar war (Geletneky et al, 2010). Bei der i.n.-Infektion war die Konzentration der nachweisbaren Viren im Vergleich mit den anderen Applikationsarten gering; vergleichbar mit der in den Leberstücken. Bei diesen Tieren konnte hier kein Unterschied zwischen den tumortragenden und den nicht tumortragenden Tieren zu den beiden untersuchten Zeitpunkten (1 und 5 dpi) festgestellt werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Versuche jedoch darauf hin, dass H-1PV in der Lage ist, sich in der Ratte während der onkolytischen Virotherapie von Gliomen im Tumorgebiet zu vermehren. Dies konnte am eindrücklichsten nach i.v.-Infektion gezeigt werden, da hier der Titer infektiöser Viren in der tumortragenden Hemisphäre über einen längeren Zeitraum (1h – 3 dpi) relativ stabil und höher war im Vergleich mit der tumorfreien Hemisphäre. Weiterhin wurde in den tumorfreien Tieren nach i.v.-Infektion über den gesamten Zeitraum der Untersuchung eine deutlich geringere Menge Virus detektiert (1 - 2 log-Stufen).

H-1PV ist ein natürlich vorkommendes Nagerparvovirus und muss daher auch ein „normales“ Reservoir für die Virusvermehrung in der Ratte besitzen. Da hier gezeigt werden konnte, dass ein möglicher Infektionsweg über die Nasenschleimhaut stattfinden könnte, soll im Folgenden untersucht werden, ob sich H-1PV im Nasengewebe der Ratte vermehren kann.

3.1.3.3 Untersuchung der Nasenschleimhaut der Ratte

Die Zellen der Nasenschleimhaut sind einer starken Teilungsrate unterlegen; sie erneuern sich stetig und könnten daher ein geeignetes Reservoir für H-1PV bilden (Gil-Carcedo et al, 2000). Um zu prüfen, ob H-1PV dort im Tier vermehrt wird, wurde in diesem Teil der Arbeit eine Primärkultur aus der Nasenschleimhaut der Ratte angelegt. Abbildung 32 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der aus dem Nasenschleimhaut-Explantat ausgewachsenen Zellen.

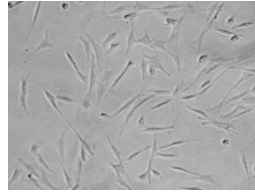


Abbildung 32: Zellmorphologie der aus der Nase isolierten Primärkultur
Lichtmikroskopische Aufnahme der aus dem Nasengewebe einer Ratte
ausgewachsenen Zellen, 100-fache Vergrößerung

A) Bestimmung des Zelltyps der Primärkultur aus der Nase

Nach Anlegen der Primärkultur aus den aus dem Nasengewebe der Ratte isolierten Zellen wurde untersucht, zu welchem Zelltyp die auswachsenden Zellen gehören. Die isolierten Zellen wurden mit Hilfe eines epithelialen Markers (Cytokeratin Klon AE1/AE3) untersucht. Die gliale Tumorzelllinie NCH82 wurde als Negativ- und die Nierenepithelzelllinie 293T als Positivkontrolle für die Expression von Cytokeratin verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die auswachsenden Zellen nicht epithelialen Ursprungs waren.

Abbildung 33 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der fixierten und gefärbten Zellen.

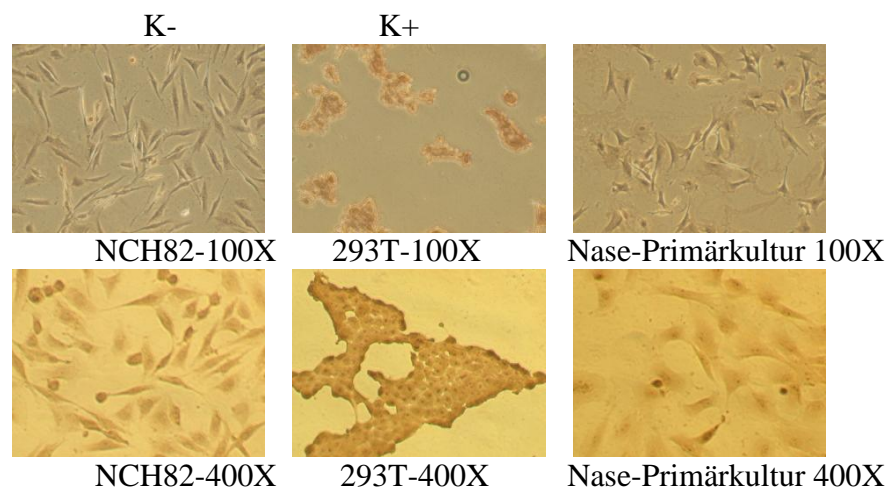


Abbildung 33: Färbung epithelialer Zellen in der Nasenprimärkultur
Färbung der Nasen-Primärkultur mit dem Epithelzellmarker Pancytokeratin (braun).
K⁻ = Negativkontrolle NCH82, K⁺ = Positivkontrolle 293T-Zellen

Offenbar wuchsen unter den hier verwendeten nicht selektiven Bedingungen vorwiegend Fibroblasten aus. Diese Annahme bedarf jedoch einer Überprüfung. Nach Erreichen der benötigten Zellzahl wurden dennoch Infektionen dieser Zellen mit H-1PV durchgeführt.

B) Infektion der Nasen-Primärkultur mit Parvovirus H-1

Die aus der Nase isolierten Zellen wurden mit H-1PV in verschiedenen Konzentrationen infiziert und MTT-Tests für den Nachweis einer durch das Virus verursachten Verringerung der Stoffwechsel-aktiven Zellen durchgeführt. Die isolierten Zellen waren fast nicht sensitiv für das Virus. Ein maximaler Effekt konnte hier mit einer MOI von 5 erzielt werden, wobei 77 % der Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle noch Stoffwechsel-aktiv waren. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der MTT-Tests.

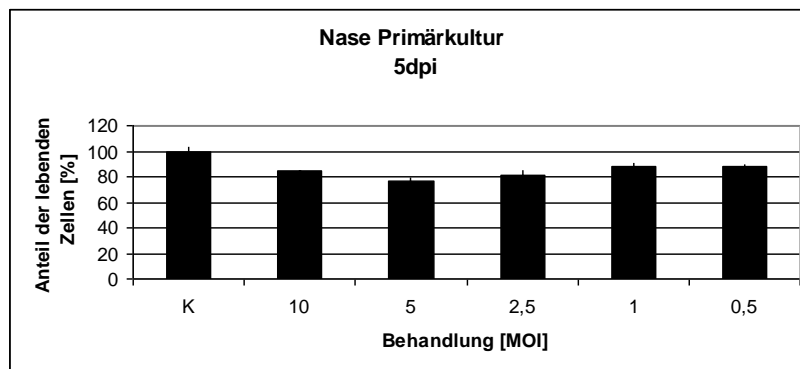


Abbildung 34: Zytotoxizität von H-1PV in der Nasenprimärkultur
MTT-Tests der Primärkultur aus der Nase der Ratte nach Infektion mit H-1PV. Die Zellen in 96 Well-Platten wurden mit 10- 0,5 pfu/Zelle mit H-1PV infiziert und 5 Tage nach Infektion mit MTT-Lösung gefärbt. Als Kontrolle (K) dienten unbehandelte Zellen. Fehlerbalken = Standardfehler

Da es sich bei den isolierten Zellen um nicht transformierte Zellen handelt (vermutlich Fibroblasten), konnte erneut bestätigt werden, dass H-1PV für normale Zellen apathogen ist.

Die Untersuchung der Vermehrung viraler DNA in den isolierten Zellen mittels Southern Blot Analyse über einen Zeitraum von 4 h bis 3 d nach Infektion ergab, dass H-1PV nicht in diesen Zellen vermehrt wird.

3.2 Adaptierung von H-1PV an humane Glioblastomzellen

H-1PV wird in humanen Glioblastomzellen nicht oder nur weniger repliziert als in Rattengliomzellen (Herrero Y Calle, 2004). Neben der selektiven Toxizität für transformierte Zellen wäre die Fähigkeit durch Replikation und Synthese infektiöser Nachkommen die ganze Tumormasse auch nach einmaliger Applikation zu infizieren von Vorteil bei der Virotherapie von humanen Gliomen. *In vivo* war die onkolytische Effizienz von H-1PV im Rattenmodell (Wistar-Ratte und RG2-Tumor) immer größer als im humanen Xenograft-Modell in der immundefizienten RNU-Ratte (U87-Tumor) (Geletneky et al, 2010; Kiprianova et al, 2011). Um in Zukunft ein Virus zur Verfügung zu haben, das auch in humanen Glioblastommodellen effizient repliziert wird, wurde das Wildtyp Virus durch 22-maliges Passagieren an eine humane Glioblastomzelllinie (NCH149) adaptiert. Durch die Sequenzanalyse der in den einzelnen Passagen des Adaptionsprozesses produzierten Viren kann außerdem die Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV untersucht werden, was möglicherweise für die Sicherheit während einer klinischen Studie von Bedeutung ist. Durch die Passagierung von Viren auf Zelllinien werden diese bewusst auf eine verbesserte Replikationsfähigkeit selektioniert (Ebert, 2008). Nach den 22 Passagierungsschritten konnte dann auch ein Anstieg der Replikationsrate in dieser Zelllinie beobachtet werden (J. P. F. Nüesch, unveröffentlichte Daten). Aus dieser Vermehrungsrunde (Passage 22) wurden mittels Plaque-Selektion 9 Einzelklone selektiert, die im Folgenden näher charakterisiert wurden.

3.2.1 Adaptiertes H-1PV *in vitro*

Für die *in vitro* Testung der Klone wurden Virusstocks auf NBK-Zellen produziert. Die Infektionen von Zellen für die Kristallviolett-, MTT und LDH-Tests erfolgte mit einer MOI von 1 falls nicht anders angegeben. Bei der Plaque Selektion wurden zu Beginn 14 Klone gepickt, wovon aber nur von 9 Klonen Vorratsstocks produziert werden konnte, die Infektionen von NCH149 Zellen mit den anderen 5 Klonen verliefen abortiv (da die Namen der ursprünglich selektierten Klone beibehalten wurden, ist die Nummerierung der Klone nicht fortlaufend). Die 9 infektiösen Klone wurden auf verschiedenen humanen Gliom-Zelllinien charakterisiert, daher werden die verwendeten Zellen im folgenden Teil kurz vorgestellt.

3.2.1.1 Zellen und Wachstum

Die Replikations- und zytotoxischen Eigenschaften der Einzelklone wurden auf verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Als Kontrolle wurden jeweils auch die Rattengliom-Zelllinie RG2, die humane Zelllinie NBK (als Produktionszelllinie für H-1PV, B. Leuchs) sowie humane nicht transformierte Zellen (E6, D7, MRC5, kindliche Astrozyten) untersucht. Abbildung 35 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen in Zellkultur bei 100- sowie 400-facher Vergrößerung.

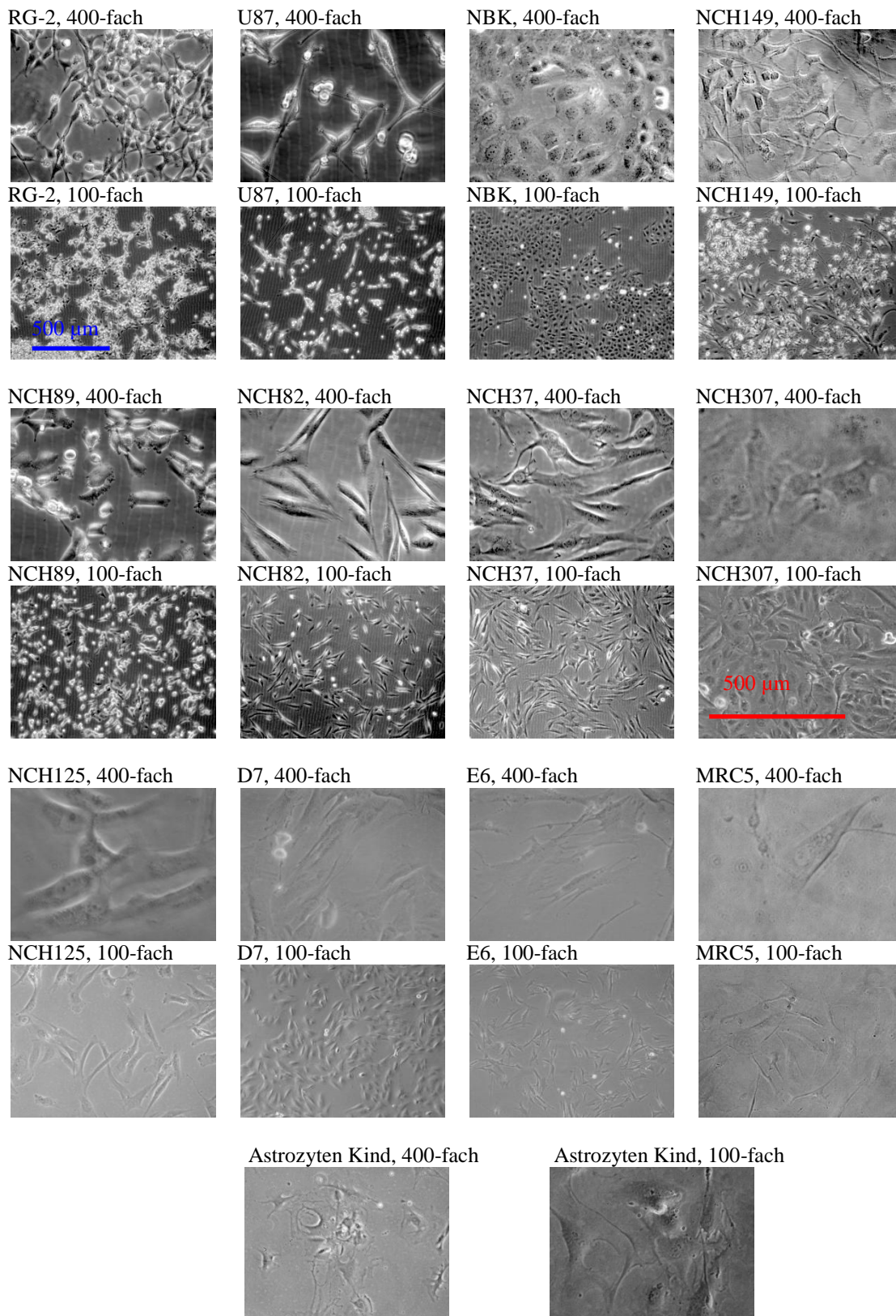


Abbildung 35: Zellmorphologie der verwendeten Zelllinien

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie in 100-facher und 400-facher Vergrößerung, RG2, NBK, U87, NCH37, NCH82, NCH89, NCH149, D7, E6 mit blauem Größenmarker, MRC5, NCH307, kindliche Astrozyten, NCH125 mit rotem Größenmarker

Von diesen Zellen wurde das Wachstumsverhalten untersucht, da H-1PV für seine Vermehrung abhängig von der S-Phase des Zellzyklus ist (Kerr et al, 2006). Abbildung 36 zeigt die Wachstumskurven der hier verwendeten Zelllinien. Von den nicht transformierten Zellen wurden keine Wachstumsexperimente durchgeführt, da diese Zellen sehr langsam wuchsen und nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Des Weiteren wurde die Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen bestimmt, um ein Maß für die Geschwindigkeit der Zellteilung zu haben.

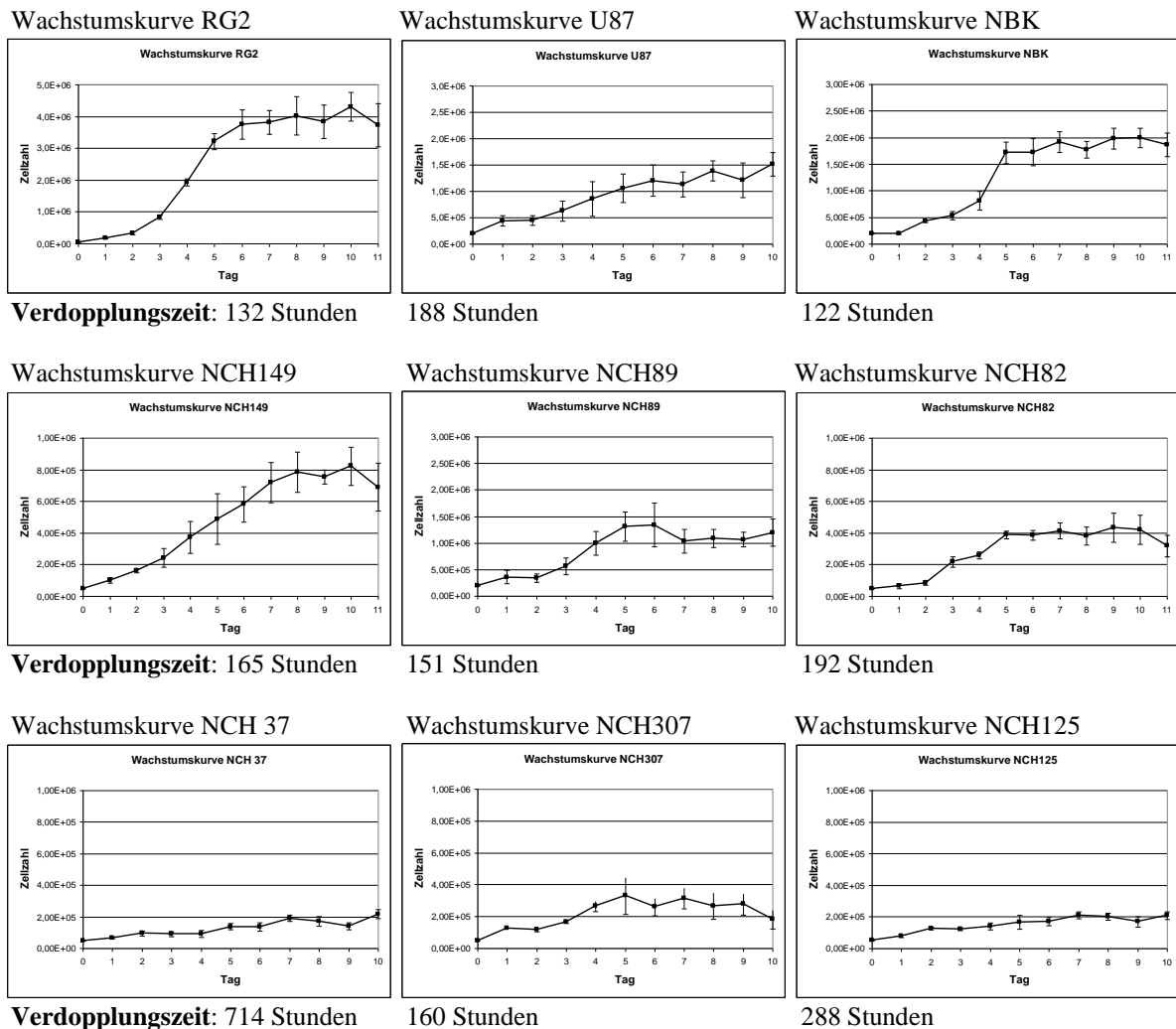


Abbildung 36: Wachstumskurven der Zelllinien
 Wachstumskurven der verwendeten Zelllinien mit Verdopplungszeit der Zellpopulation in der exponentiellen Wachstumsphase (Berechnung zwischen Tag 3 und 4 nach Aussaat). Fehlerbalken = Standardfehler

Wie Abbildung 36 zeigt, unterscheiden sich die Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten voneinander. Auffällig war, dass die NCH-Zellen (etabliert aus humanen Gliomen) langsamer wuchsen als die NBK- (etablierte humane SV40-transformierte Nierenzelllinie) und U87- (etablierte humane Gliomzelllinie) Zellen. Am schnellsten wuchsen die Rattengliomzellen RG2. Bei den NCH-Zellen war die Linie NCH 89 mit einer Verdopplungszeit von ca. 6 Tagen

am schnellsten. Die Zelllinien NBK, RG2 und NCH89 sind auch die Zellen, in denen sich der Wildtyp am besten vermehren kann (Herrero Y Calle et al, 2004). Auf den vorgestellten Zellen wurden die adaptierten Virus-Einzelklone auf ihr zytotoxisches Potenzial bei humanen Gliomzellen im Vergleich mit dem Wildtyp (H-1PV) untersucht.

3.2.1.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Klone in verschiedenen Zelllinien

Wildtyp H-1PV zeigte in humanen Gliom-Zelllinien bei gleicher MOI eine geringere zytotoxische Effizienz als in den Rattengliom Zelllinien RG2 und C6 (Herrero Y Calle et al, 2004). Um herauszufinden, ob die adaptierten Viruskclone Gliomzelllinien effizienter töten können, soll hier zunächst der zytotoxische Effekt der Einzelklone im Vergleich mit dem Wildtyp auf den verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Die gliomadaptierten viralen Klone lysierten die humane Gliomzelllinie U87 effizienter als das Wildtypvirus, während der H-1PV Wildtyp in der Rattenzelllinie RG2 effizienter zur Zelllyse führte. Abbildung 37 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der MTT-Tests der Einzelklone im Vergleich mit dem Wildtyp H-1PV in den Zelllinien U87 und RG2.

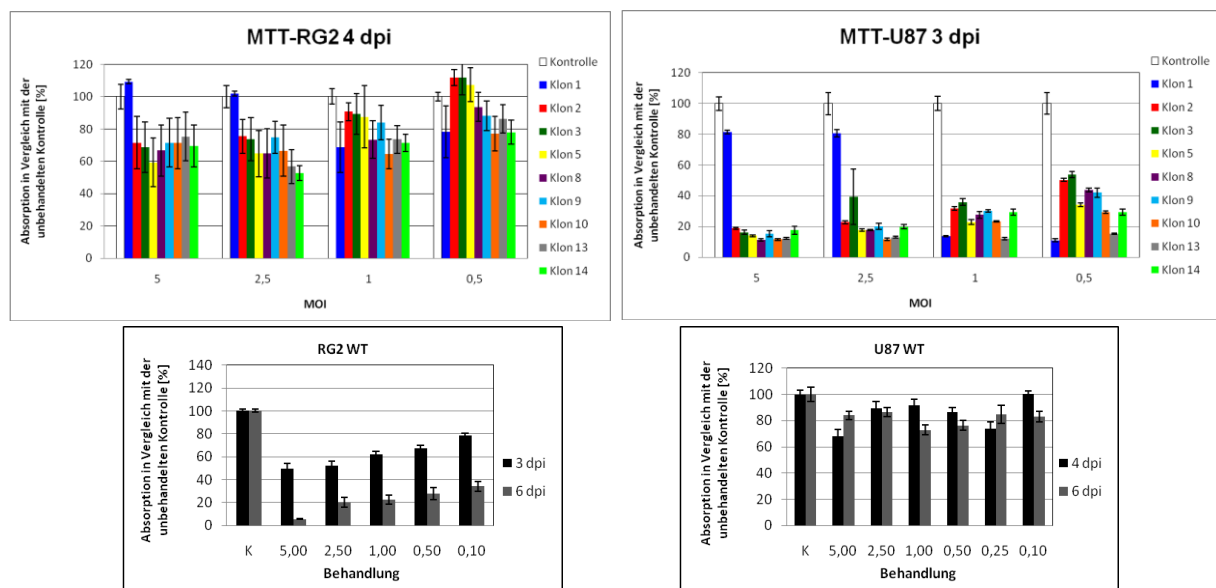


Abbildung 37: Zytotoxizität der Viruskclone im Vergleich mit dem Wildtyp MTT-Tests der verschiedenen Klone und des Wildtyp nach Infektion mit verschiedenen MOIs (5-0,1 pfu/Zelle). Exemplarische Darstellung der Linien RG2 und U87. Die gemessene Absorption im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle ist ein Maß für die Menge der Stoffwechsel-aktiven Zellen.

Bei den anderen untersuchten Gliomzelllinien zeigte immer mindestens einer der Klone eine größere Zytotoxizität als das Wildtypvirus. Nur bei den NBK-Zellen waren alle Virussuspensionen gleich erfolgreich. Tabelle 18 gibt einen Überblick, welcher Klon auf welcher Zelllinie den größten zytotoxischen Effekt bei der kleinsten MOI verursachte. Hierfür

wurden jeweils der Zeitpunkt nach Infektion und die MOI angegeben, die zur Verminderung der Zellzahl um mindestens 50 % führte.

Tabelle 18: Übersicht über die Zytotoxizität der Virusstocks

Zelllinie Klon	RG2	NBK	U87	NCH37	NCH82	NCH89	NCH125	NCH307
1	> 5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	> 5	> 5	> 5	> 5
2	> 5	< 0,5	< 1	< 1	< 5	> 5	> 5	> 5
3	> 5	< 0,5	< 1	< 1	< 5	> 5	< 1	> 5
5	> 5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1	< 5	< 0,5	> 5
8	> 5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 2,5	< 5	< 0,5	> 5
9	> 5	< 0,5	< 0,5	< 5	< 5	> 5	< 2,5	> 5
10	> 5	< 0,5	< 0,5	< 2,5	< 5	< 2,5	< 2,5	> 5
13	> 5	< 0,5	< 0,5	< 1	< 5	< 2,5	< 2,5	> 5
14	> 5	< 0,5	< 0,5	< 5	< 5	> 5	< 5	> 5
WT	< 2,5 / < 0,1	< 0,5	> 5	< 5 / > 5	> 5	> 5	> 5	> 5
Zeitpunkt des Tests [dpi]	WT 3+6 Klone 4	WT 4+6 Klone 3	WT 4+6 Klone 3	WT 4+6 Klone 3	WT 4+6 Klone 3	WT 4+6 Klone 6	WT 4 Klone 3	WT 4+6 Klone 4

Übersicht über die Ergebnisse der Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit den verschiedenen Virusstocks im MTT-Test. Angabe der MOI, die zum angegebenen Zeitpunkt nach Infektion zu einer Zelllyse von mindestens 50 % geführt hat.

Mit dem MTT-Test kann jedoch nicht zwischen einem zytotoxischen und einem zytostatischen Effekt unterschieden werden, da nur die Stoffwechsel-aktiven Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt gefärbt werden. Das bedeutet, würde das Wachstum der Zellen durch die Infektion mit H-1PV verlangsamt werden im Vergleich zu einer normal wachsenden Kontrolle, wären hier auch weniger Stoffwechsel-aktive Zellen angefärbt. Somit wäre ein solches Ergebnis nicht von einer Zelllyse des gleichen Ausmaßes durch Virus zu unterscheiden. Um zu testen, ob tatsächlich ein Zelltod eingetreten ist, bedarf es einer weiteren Methode, dem LDH-Test. Hierbei wird die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand gemessen, welches nur beim Tod von Zellen (hier Virus-induzierte Zelllyse) aus der Zelle austritt. Dieser Test wurde bei der Untersuchung der nicht transformierten Zellen durchgeführt, um festzustellen, ob die Adaptierung der Virenklone an eine humane Glioblastomzelllinie mit einer erhöhten Zytotoxizität für nicht transformierte humane Zellen einhergeht.

3.2.1.3 Zytotoxizität der adaptierten Virenklone für nicht transformierte Zellen

Um zu prüfen, ob die adaptierten Klone weiterhin wie auch das Wildtypvirus selektiv zytotoxisch für transformierte Zellen sind, wurden LDH-Tests durchgeführt, da nach einer Infektion dieser sehr langsam wachsenden Zellen keine Verringerung der Zellzahl bei der Durchführung der MTT-Tests nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse der LDH-Tests der nicht transformierten Fibroblasten E6, D7, MRC5, sowie der kindlichen Astrozyten. Die Ausschüttung von Laktatdehydrogenase als indirektes Maß für die Zelllyse zeigte keine erhöhte Zytotoxizität der Virusklone bei nicht transformierten Zellen im Vergleich mit dem Wildtyp. Bei den kindlichen Astrozyten war die Freisetzung von LDH nach Infektion etwas erhöht im Vergleich mit der Kontrolle.

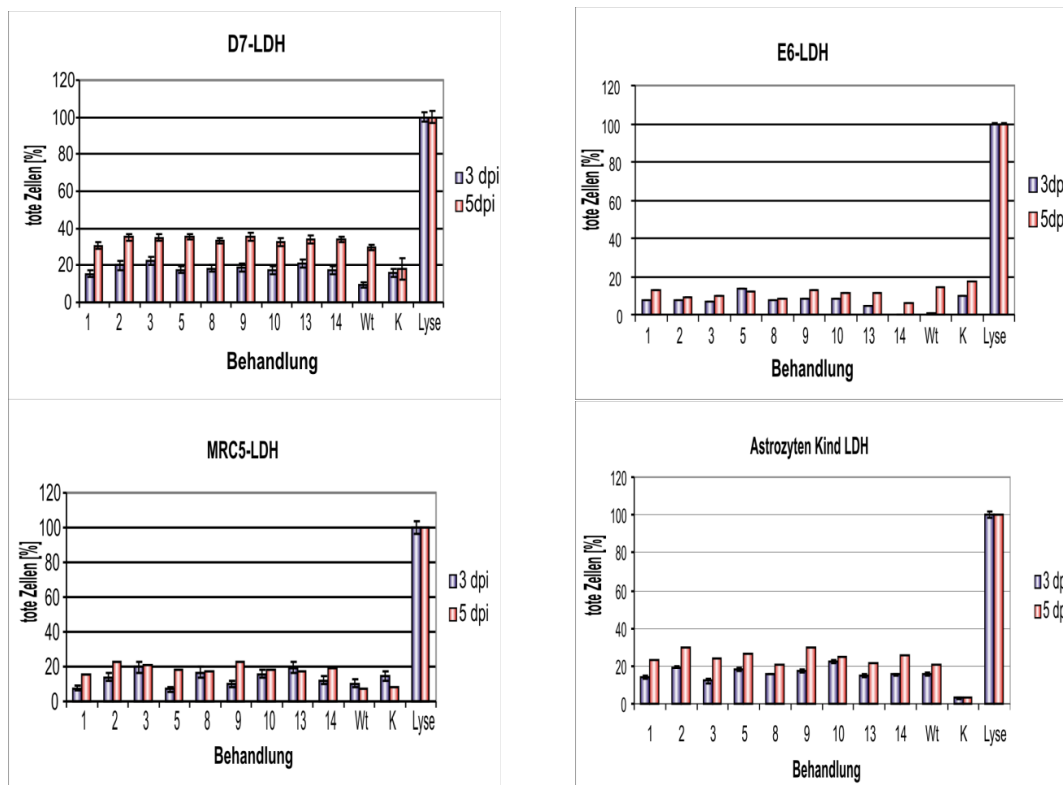


Abbildung 38: Zytotoxizität der Virusstocks in nicht transformierten Zellen

Ergebnisse der Zelltodmessung der nicht transformierten Zellen (E6, D7, MRC5, Astrozyten Kind) nach Infektion mit MOI 1 der Klone 1-14 im Vergleich mit dem Wt (Wildtyp H-1PV) 3 und 5 Tage nach Infektion. K: nicht infizierte Kontrolle, Lyse: 100% Zelltod nach Behandlung der Zellen mit lysierenden Reagenzien. Fehlerbalken: Standardfehler

3.2.1.4 Vermehrung der adaptierten Klone in humanen Glioblastom-Zelllinien

Auch bei transformierten Zellen gibt es H-1PV resistente Populationen, die nicht infiziert werden (López-Guerrero et al, 1997, Parrish, 2010). Zusammen mit einer wenig effizienten viralen Vermehrung in manchen Zelllinien kann das dazu führen, dass man nach einer Infektion oftmals einen frühen Effekt beobachten kann, nach längerer Zeit wird die Schale jedoch von den nicht infizierten Zellen wieder vollständig bewachsen. Da sich die adaptierten Virusklone, die bei der Passagierung auf der Zelllinie NCH 149 erzeugt wurden, effizienter in dieser Zelllinie vermehren konnten, wurde untersucht, ob die adaptierten Klone nach Infektion von Zellen mit einer geringen MOI in der Lage sind einen vollständigen CPE auf humanen Glioblastomzelllinien hervorzurufen. Dadurch soll gezeigt werden, dass die Klone

in der Lage sind, in verschiedenen humanen Zelllinien effizient vermehrt zu werden, ohne dass resistente Subpopulationen nach der Infektion erneut einen konfluenten Zellrasen bilden. Hierfür wurden nach der Infektion in 24-Well-Platten, sobald die Kontrollen konfluent wuchsen (ca. 5 dpi), die überlebenden Zellen mit Kristallviolett dargestellt. Abbildung 39 zeigt die gescannten Platten nach erfolgreicher Infektion im Vergleich mit dem Wildtypvirus. Man kann bei den humanen Zelllinien erkennen, dass immer mindestens ein oder mehrere Viruskclone den Zellrasen vollständig abgetötet haben, oft mit einer geringeren MOI als das Wildtypvirus. Das bedeutet, dass die adaptierten Viren in der Lage sind, in den humanen Zellen infektiöse Nachkommen zu bilden. Bei der Zelllinie RG2 erwies sich jedoch der Wildtyp als erfolgreicher, während in der Zelllinie NBK alle Virussuspensionen etwa gleich effizient zu sein scheinen. Diese Zelllinie vermehrt das Wildtypvirus sehr gut und wird zur Produktion der Virusstocks verwendet. Diese Eigenschaft scheint sich durch die Adaptation auch bei den Klonen nicht verändert zu haben.

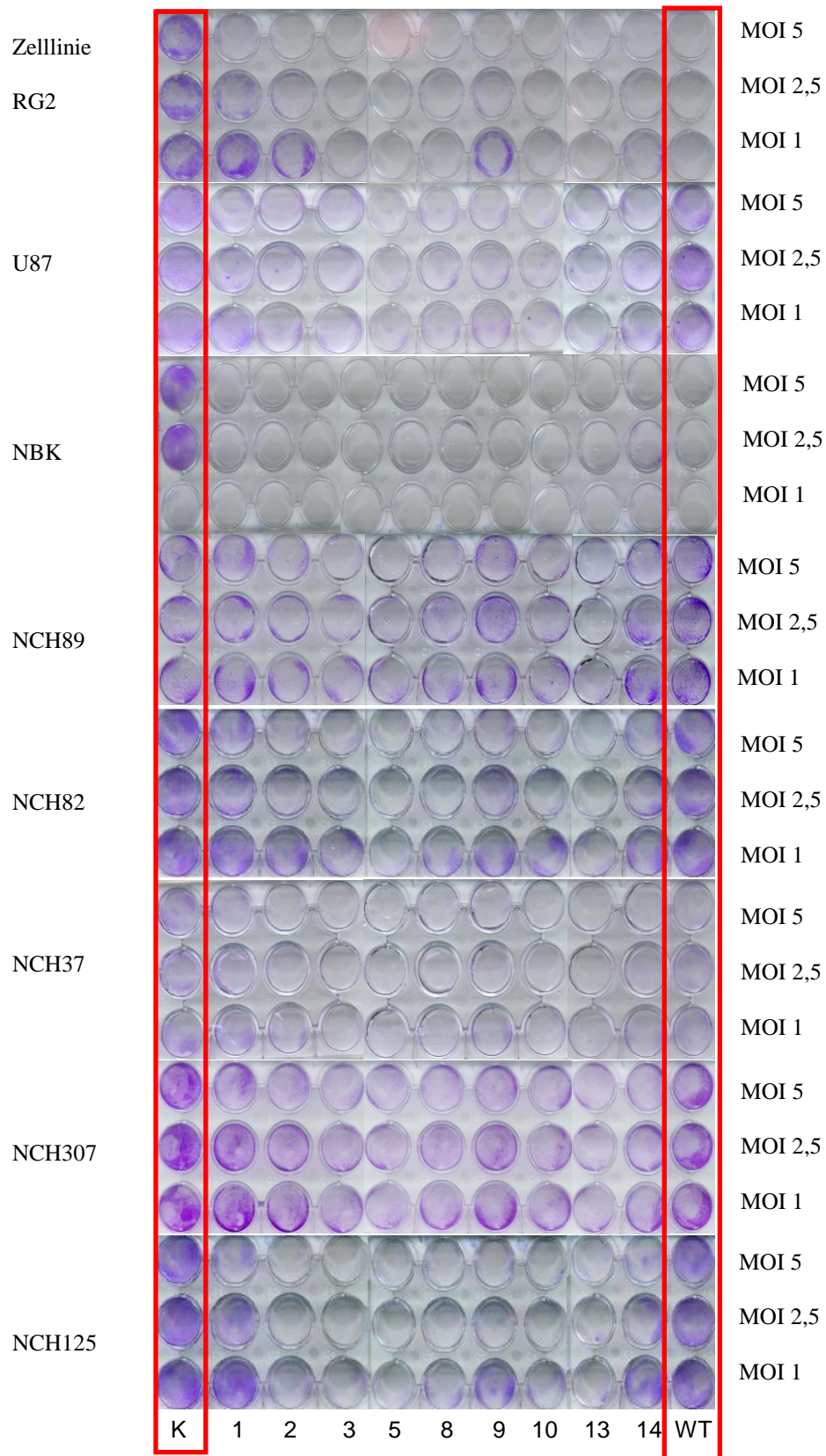


Abbildung 39: Virale Vermehrung *in vitro*
 Kristallviolett färbung der verschiedenen Zelllinien 5 Tage nach Infektion mit den verschiedenen Virusklonen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (K) und dem Wildtyp (WT). RG2 = Rattengliomzelllinie, NBK = humane embryonale Nierenzelllinie auf der H-1PV produziert wird, U87 + NCH-Zellen = humane Glioblastomzelllinien, NCH37 = humane Gliosarkomzelllinie, Infektion mit 3 verschiedenen MOIs (5; 2,5; 1)

3.2.1.5 Nachweis viraler DNA-Replikation der adaptierten Virusklone

Da die adaptierten Klone nach Infektion der humanen Glioblastomzelllinien auch bei einer geringen MOI einen vollständigen CPE auslösten, wurde untersucht, wie schnell die Viren in den jeweiligen Zelllinien ihre DNA vermehren können. Abbildung 40 zeigt die Southern Blot-Analysen der viralen DNA-Vermehrung der Klone in den verschiedenen Zellen über einen Zeitraum von 4 h bis 3 Tagen nach Infektion.

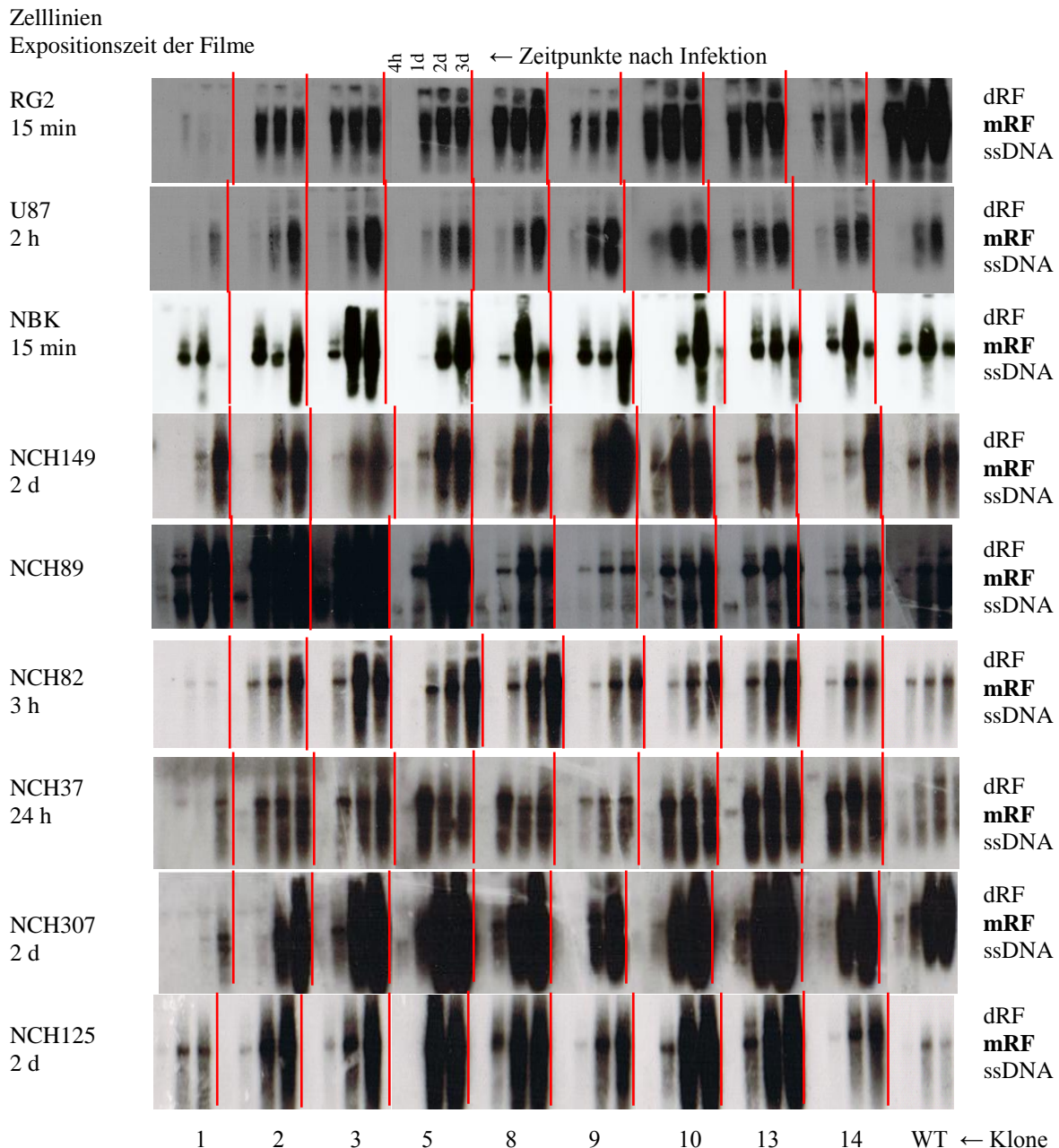


Abbildung 40: DNA-Replikation der adaptierten Virusklone
Southern Blot Analysen der viralen DNA-Replikation der adaptierten Virusklone auf verschiedenen Zelllinien im zeitlichen Verlauf von 4 hpi bis 3dpi. dRF = doppelte replikative Form, mRF = monomere replikative Form, ssDNA = Einzelstrang DNA. Die in allen Zelllinien aufgetretene Bande entspricht in der Größe der mRF.

Die DNA des Wildtyps von H-1PV wurde in der Rattenzelllinie RG2 besser vermehrt als die DNA der adaptierten Virusklone. In den humanen Zelllinien hingegen war eine effizientere Replikation der DNA der adaptierten Virusklone zu beobachten. In allen Zelllinien konnte eine Zunahme der monomeren Replikationsform (mRF) im Zeitverlauf festgestellt werden. Die anderen Formen (dRF, ssDNA) wurden auch gebildet, sind aber auf Grund der Signalstärke nicht so deutlich zu erkennen. Das bedeutet, dass die virale DNA der adaptierten Klone in allen humanen Zelllinien effizient repliziert wurde. An Hand der Expositionszeit der Filme ziegte sich, dass die Signale in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark waren. Bei den Zelllinien RG2 und NBK hat eine Expositionszeit von 15 min ausgereicht, um ein deutliches Signal bei allen Klonen zu erhalten, während bei den Zelllinien NCH149 und NCH125 2 Tage nötig waren, um die entsprechenden Banden hervortreten zu lassen. Weiterhin unterscheidet sich der zeitliche Ablauf der DNA-Replikation von Klon zu Klon und von Zelllinie zu Zelllinie. Klon 1 war am effizientesten in Zelllinie NCH89, während bei Klon 9 die stärkste Vermehrung der DNA in NCH149 Zellen zu beobachten war. Im zeitlichen Ablauf der Replikation konnten auch wesentliche Unterschiede detektiert werden. Dies ist sehr deutlich bei der Zelllinie NCH89 zu erkennen; während Klon 2 bereits 1 dpi ein sehr starkes Signal verursachte, zeigte Klon 5 erst an Tag 2 nach Infektion ein ähnlich starkes Signal und bei Klon 13 fand eine wesentliche Vermehrung der DNA erst zwischen Tag 2 und 3 statt.

Da die Vermehrung der DNA nicht zwangsläufig mit der Bildung infektiöser Nachkommenviren einhergeht, wurden die Synthese und die Vermehrung infektiöser Viren für die adaptierten Einzelklone in den verschiedenen Zelllinien analysiert. Hierbei wurde der Titer der infektiösen Viren von 4 Stunden bis 3 Tage nach Infektion ausschließlich im Zellpellet untersucht; die Zellkulturüberstände wurden nicht berücksichtigt.

3.2.1.6 Bildung infektiöser Nachkommenviren

Für die Bestimmung der Titer der Zell-assoziierten Viren in den Zellpellets der verschiedenen Zelllinien über einen Zeitraum von 3 Tagen wurden Zytotoxizitätsexperimente mit logarithmischen Verdünnungsreihen der Proben auf NBK-Zellen durchgeführt. Die maximale Titerzunahme der Virusklone innerhalb von 3 Tagen nach Infektion wurde anschließend mit der Vermehrung des Wildtyps in der jeweiligen Zelllinie verglichen. Abbildung 41 zeigt die maximale Virusproduktion in x-facher Zunahme im Vergleich mit der Produktion des Wildtyps in den angegebenen Zelllinien.

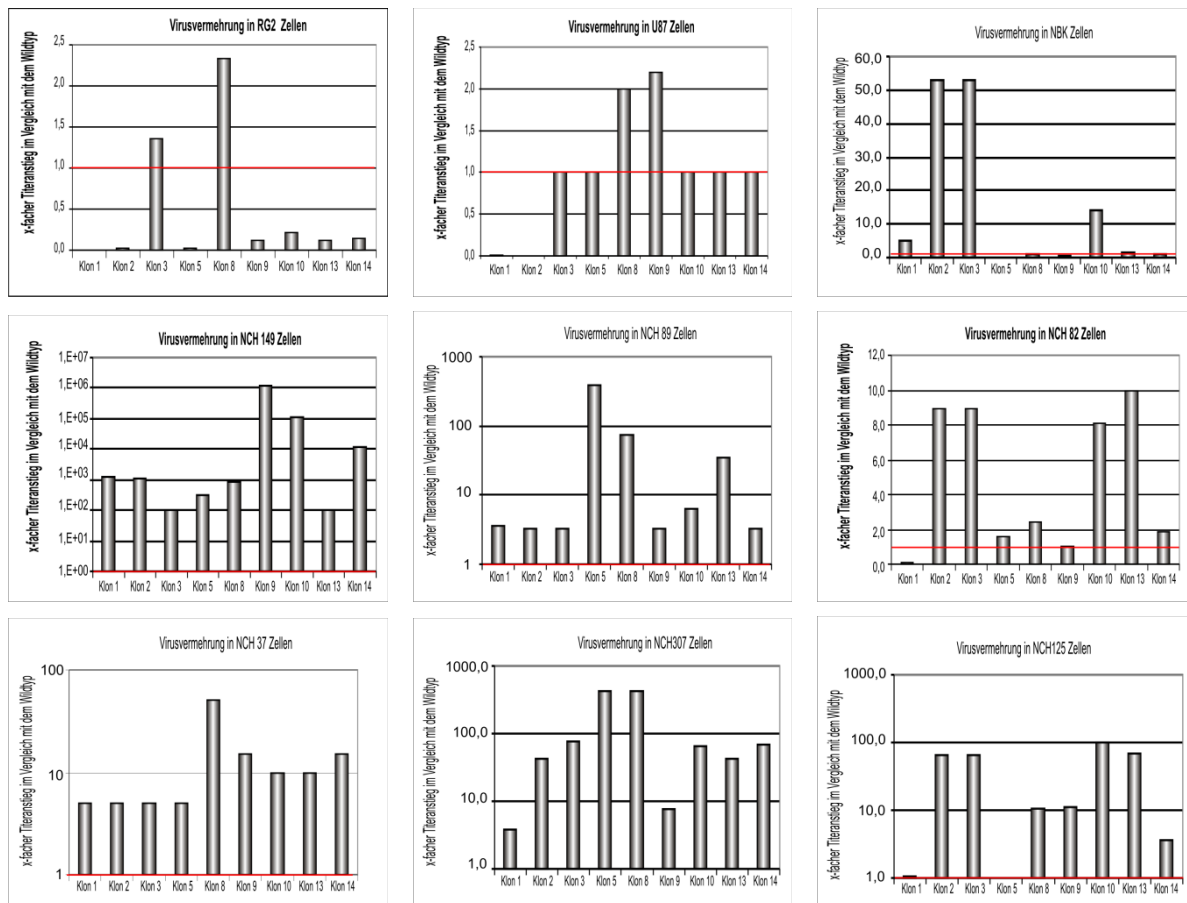


Abbildung 41: Produktion infektiöser Viren im Vergleich mit dem Wildtyp
 Produktion infektiöser Viruspartikel innerhalb von 3 Tagen nach Infektion in den verschiedenen Zelllinien im Vergleich mit dem Wildtyp H-1PV. Rote Linie = Wildtypvermehrung entspricht 1. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit einer MOI von 1 infiziert und jeweils 1 Schale 4 h, 1 Tag, 2 Tage und 3 Tage nach Infektion geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl VTE suspendiert. NBK Zellen wurden mit 10 µl der Proben und logarithmischen Verdünnungen infiziert und 5 dpi mit Kristallviolett gefärbt. Mit der größten Verdünnung der Proben, die einen CPE verursachte, wurde die Viruskonzentration bestimmt. Die maximale Zunahme infektiöser Partikel wurde anschließend mit der Zunahme der H-1PV-Wildtypartikel verglichen.

Wie in Abbildung 41 zu sehen, wurden alle adaptierten Klone in den humanen Zelllinien vermehrt. Hierbei war die Zunahme des Virustiters in der Zelllinie NCH149, auf der H-1PV adaptiert wurde, am größten. Am wenigsten effizient war die Synthese infektiöser Nachkommen in der Zelllinie NCH82, gefolgt von den U87 Zellen. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die erfolgreichsten Klone in den verschiedenen Zelllinien.

Tabelle 19: Übersicht über die Vermehrung infektiöser Viren

Am effizientesten vermehrter Klon	Zelllinie	maximale Vermehrung im Vergleich mit dem Wildtyp [x-fach]	Klone, die auch effizienter vermehrt wurden als der Wildtyp
8	RG2	2,3	3, 8
9	U87	2,2	8, 9
2 / 3	NBK	52,9	1, 2, 3, 10, 13
9	NCH 149	1,2E6	Alle (1 - 14)
5	NCH 89	389	Alle
13	NCH 82	10	2 - 14
8	NCH 37	50	Alle
5	NCH 307	428,5	Alle
10	NCH 125	100	Alle außer 5

Übersicht über die Vermehrung der adaptierten Klone in den verschiedenen Zelllinien

Tabelle 19 zeigt, dass in jeder der untersuchten humanen Zelllinien mindestens ein Virusklon erfolgreicher vermehrt wurde als der Wildtyp. Bei den von Patienten etablierten NCH-Zelllinien wurden fast immer alle adaptierten Klone effizienter vermehrt. Nur die humane lange etablierte Gliomzelllinie U87 produzierte die Viren nicht sehr effizient. Die NBK-Zellen produzierten fast ebenso stark das Wildtypvirus. In der Rattenzelllinie RG2 (die aus dem natürlichen Wirt (Ratte) von H-1PV etabliert wurde) wurden auch zwei der adaptierten Virusklone (3 und 8) effizienter vermehrt als H-1PV Wildtyp.

Anschließend sollen die genetischen Veränderungen, die durch die Adaptierung entstanden sind und zu einer verbesserten Replikation in humanen Zelllinien geführt haben könnten, untersucht werden.

3.2.1.7 Sequenzanalyse

Von sieben der neun adaptierten Klone wurde die genetische Sequenz analysiert, um mögliche Unterschiede zum Wildtypgenom, die im Verlauf der Passagierung in der Zelllinie NCH149 aufgetreten waren, festzustellen. Hierfür wurde das Genom der Klone in drei Segmente unterteilt und in einen Vektor kloniert. Von dieser Plasmid-DNA wurde die Sequenz bestimmt und anschließend mit der Wildtypsequenz verglichen.

Bei der Sequenzierung der sieben Klone ergaben sich folgende Veränderungen im Vergleich mit der Wildtypsequenz (Tabelle 20), wobei die Änderungen 1, 2, 3, 8, 11, 17, 20, 21, 24, 26 und 27 typische Sequenzierfehler sind, die häufig auftreten, aber keine reale Veränderung darstellen (Referenzsequenz: pSR19 Vergleich mit Genbank-Nummer: X01457) (Faisst et al,

1995; Wrzesinski et al, 2003). Die Mutation X zeigt die von S. Faisst beschriebene, beim Wildtyp aufgetretene Mutation (Faisst et al, 1995).

Tabelle 20: Übersicht über die Mutationen der Virusklone am Ende der Adaptierung

Klon			1	2	3	5	8	13	14
Mutation	nt	Was							
1	305	A/C	X	X	X	X	X	X	X
2	634	C/A	X	X	X	X	X	X	X
3	1101	G/A	X	X	X	X	X	X	X
4	1610	C/T				X			
5	2115-2200 / 2115-2150 / 2021-2150	Deletion	X	X	X	X	X	X	X
6	2277	G/C	X						
7	2660	C/G	X						
8	3107	+TGA	X	X	X	X	X	X	X
9	3489	T/G			X				
10	3561	G/A			X				
11	3674 / 3687	+G / -G	X	X	X	X	X	X	X
12	3712	G/A			X				
13	3745	G/C							X
14	3913	C/T	X	X	X	X	X	X	X
15	3964	G/A		X	X		X	X	
16	4108	G/A	X	X	X				
17	4310	A/G	X	X	X	X	X	X	X
18	4592	C/T							X
19	4629	C/T							X
20	4664	-T	X	X	X	X	X	X	X
21	4683	+TT	X	X	X	X	X	X	X
22	4757	A/G							X
23	4809	T/C			X	X			
24	4814	A/G	X	X	X	X	X	X	X
25	4828	+ 57 nt		X					
26	4832	A/G	X	X	X	X	X	X	X
27	4839	A/G	X	X	X	X	X	X	X
X	2021-2135	Deletion S. Faisst							
Start			165	163	169	185	167	166	177
Ende			4941	4940	4940	4935	4948	4941	4923

Übersicht über die aufgetretenen Veränderungen im Vergleich mit dem Wildtypgenom bei den sequenzierten Virusklonen am Ende der Adaptierung. X = Klon beinhaltet die in Spalte 2 und 3 beschriebene Veränderung, rot: Deletion bei Klon 13, die anders als bei den anderen Klonen war, blau: Sequenzierfehler, grün: bekannte Deletion von S. Faisst (Faisst et al, 1995)

Auffällig war, dass alle untersuchten Klone eine Deletion von mehreren AS im zweiten Segment (1657-3517 nt) des Genoms aufweisen. Die hier aufgetreten Deletion liegt im gleichen Genabschnitt wie die bekannte Deletion (Faisst et al, 1995), unterscheidet sich aber von dieser in der Lage und Größe. Bei Klon 14 konnte ein Sequenzabschnitt (Position 4360-4558 nt) nicht sequenziert werden. Da jedoch in allen anderen Klonen keine Veränderungen in diesem Abschnitt aufgetreten sind, wurde auf eine intensive Wiederholung der Sequenzierung verzichtet. Abbildung 42 zeigt die Genomorganisation von H-1PV. In dieser Karte sind die bei den adaptierten Virusklonen aufgetretenen Mutationen eingetragen. Die

Karte zeigt, auf welche Proteine sich die Änderungen eventuell auswirken könnten und wodurch der veränderte Phänotyp der Klone hervorgerufen wurde.

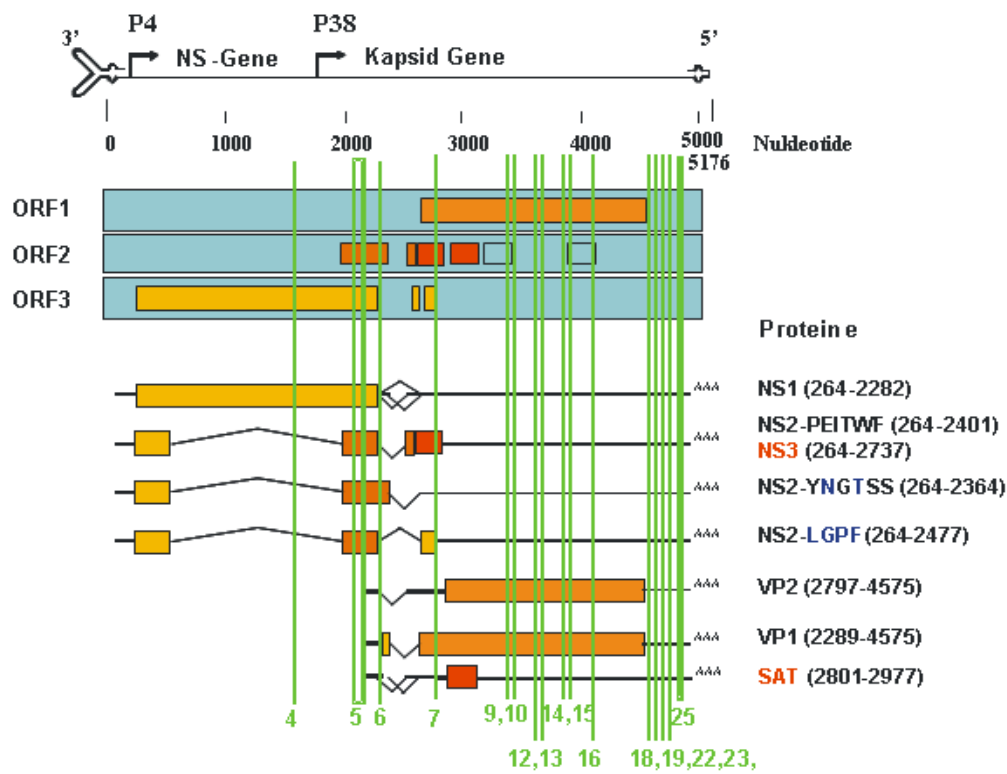


Abbildung 42: Lage der detektierten Mutationen im Genom von H-1PV
Genomorganisation von H-1PV mit Kennzeichnung der in den adaptierten Klonen aufgetretenen Mutationen. Die Mutationen 1, 2, 3, 8, 11, 17, 20, 21, 24, 26, 27 sind Sequenzierfehler und daher nicht in der Karte markiert. Mit freundlicher Genehmigung und entsprechenden Veränderungen von Dr. J. P. F. Nüesch.

Die in den adaptierten Virusklongenomen aufgetretene Deletion von 28 AS (Mutation 5) liegt im Bereich der NS-Gene. Des Weiteren sind die Veränderungen 4 und 6 ebenfalls in dieser Region zu finden. Die Mutationen 7-16 liegen im kodierenden Bereich der VP-Gene. Im nicht kodierenden Bereich sind fünf weitere Veränderungen (18, 19, 22, 23, 25) aufgetreten. Hier besaß Klon 2 eine Insertion von 19 AS. Die im kodierenden Bereich des Genoms gefundenen Mutationen könnten verantwortlich für die verbesserte Replikation der Klone in den humanen Zelllinien sein.

Da alle sieben adaptierten Virusklone verschiedene Mutationen zeigten, stellt sich die Frage nach der Mutationsgeschwindigkeit von H-1PV. Im Zuge der onkolytischen Gliomtherapie beim Menschen ist dies ein wesentlicher Sicherheitsaspekt. Daher wurde untersucht, wie schnell die Anpassung von H-1PV an die humane Glioblastomzelllinie stattfand. Die hier durchgeführte Adaptierung erfolgte über 22 Passagen in der Zelllinie NCH149 nach anfänglicher Transfektion des Wildtyp-(pSR19)-Genoms in diese Zelllinie. Um zu

untersuchen, zu welchem Zeitpunkt im Adaptionsprozess die Veränderungen aufgetreten sind, wurde zunächst das Auftreten der prominent in allen Klonen vertretene Deletion von 28 AS mittels spezifischer qRT-PCR im Verlauf des Anpassungsprozesses verfolgt.

3.2.1.8 Auftreten der Deletion von 28 AS im Verlauf der Adaptierung von H-1PV

Die Adaptierung von H-1PV erfolgte über 22 Passagen an die humane Zelllinie NCH149. Aus den gesammelten Überständen und Zellen der einzelnen Passagen wurde die DNA isoliert und die Menge der viralen Genome mittels qRT-PCR ermittelt. Hierfür wurden zwei Detektionssysteme entwickelt, mit denen zwischen Wildtyp-Genomen (Wildtyp-System) und Klon-Genomen mit Deletion (Deletions-System) unterschieden werden konnte. Mit einem dritten Detektionssystem wurde die Gesamtmenge viraler DNA in den Proben bestimmt. Damit sollte gezeigt werden, ab welcher Passage die Deletion auftrat und ab wann die Mehrzahl der vorhandenen Viren die Deletion besaß. Mit dem beschriebenen TaqMan-System (2.2.4.4 D) konnte spezifisch in Virenmischungen zwischen Wildtyp und Klon unterschieden werden. Die Spezifität der entwickelten Systeme wurde mit Standardplasmiden von Wildtyp-DNA und Klon-DNA sowie Mischungen aus beiden Plasmiden überprüft. Wie in Abbildung 43 gezeigt, konnten die Systeme nur die jeweilige DNA detektieren. Da bei den Systemen jeweils ein Fragment mit unterschiedlicher Größe amplifiziert wurde, konnte mittels Gelelektrophorese zusätzlich die Spezifität abgesichert werden. Nach der Amplifikation der Standards und der Mischungen war bei beiden Systemen in der Gelelektrophorese nur eine Bande der jeweiligen Größe sichtbar (Daten nicht gezeigt).

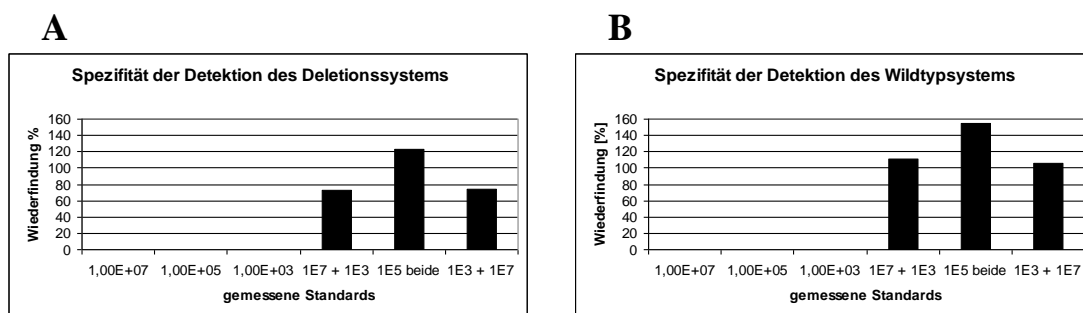


Abbildung 43: Spezifität der qRT-PCR Detektionssysteme

A) Deletionssystem, Messung der Wildtypstandards und der Mischungen von Wildtyp und Deletionsmutante (1E7 Vg WT + 1E3 Vg Deletion; 1E5 Vg beide, 1E3 Vg WT + 1E3 Vg Deletion) B) Wildtypsystem, Messung der Deletionsstandards und der Mischungen wie bei A

Daraufhin wurden die DNA-Proben der einzelnen Passagen mit den 3 Detektionssystemen untersucht. In Abbildung 44 ist die Menge der verschiedenen viralen Genome pro ng eingesetzter DNA in den einzelnen Passagen des Adaptionsprozesses gezeigt.

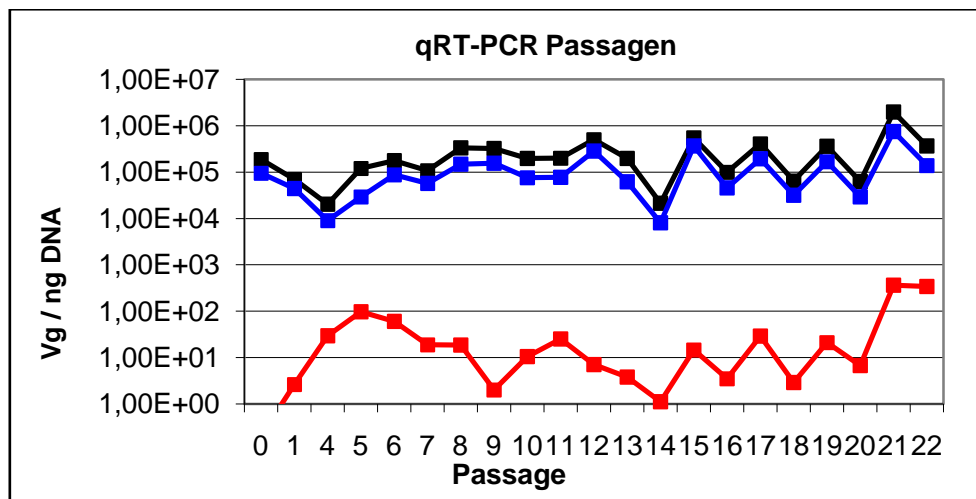


Abbildung 44: Quantifizierung der viralen DNA im Verlauf der Adaptierung
Menge der viralen Genome (Vg) in den Passagen der Adaptierung pro ng eingesetzter DNA. Schwarz: Detektion der Gesamtmenge an viralen Genomen in den Proben, blau: Detektion der Wildtypgenome, rot: Detektion der Deletionsmutanten (28 AS). Passage 0 = Transfektion von H-1PV (pSR19) in NCH149 Zellen.

In allen DNA-Proben der verschiedenen Passagen wurden hauptsächlich Wildtypgenome detektiert (Abbildung 44). Die Menge an Deletionsmutanten blieb bis zur letzten Passage (22) gering. Zu Beginn konnte keine Deletionsmutante detektiert werden; erst ab Passage 21 stieg die Menge der Genome mit der Deletion deutlich an. Dies spricht dafür dass die Deletion erst relativ spät im Adaptationsprozess auftrat.

Zusätzlich zu der Analyse des Auftretens der Deletion wurden mit den gesammelten Überständen von Passagen 4, 7, 10, 15 und 20 erneut NCH149 Zellen infiziert, daraus die DNA isoliert und das virale Genom wie oben beschrieben in drei Abschnitten amplifiziert. Die aufgereinigten PCR-Fragmente von 11-16 parallelen Infektionen pro Passage wurden erneut sequenziert, um das Auftreten aller Mutationen über den Adaptierungsprozess zu verfolgen.

3.2.1.9 Sequenzanalyse der Passagen 4, 7, 10, 15 und 20 der Adaptation

Da mittels qRT-PCR nur das Auftreten der Deletion verfolgt werden konnte und dies keine Aussage über das Auftreten der anderen Mutationen zulässt, wurden die anderen Veränderungen durch Sequenzierungen von unterschiedlichen Passagen des Anpassungsprozesses verfolgt. Tabelle 21 zeigt, welche in den charakterisierten Virusklonen aufgetretene Veränderungen wann im Adaptationsprozess auftraten.

Tabelle 21: Auftreten der Mutationen im Verlauf der Adaptation

Passage	Proben- anzahl	Anteil der aufgetretenen Mutationen [%]				
		5	7	14	18	22
4	16	0	0	0	0	0
7	14	0	0	0	0	7
10	15	0	0	0	7	0
15	11	13	0	0	0	0
20	15	20	20	27	0	7

Sequenzanalyse der viralen Genome in den Passagen 4, 7, 10, 15 und 20. Mit den gesammelten Überständen der Passage wurden 11-16 parallele Infektionen von NCH149 Zellen durchgeführt und anschließend die produzierten viralen Genome sequenziert. Dargestellt ist der Anteil der in der jeweiligen Passage aufgetretenen Mutationen 5, 7, 14, 18 und 22 in % bei den untersuchten Infektionen. Alle anderen Veränderungen traten erst nach Passage 20 auf.

Bei der Analyse der viralen DNA in den verschiedenen Passagen konnten nicht alle Veränderungen nachgewiesen werden, die bei den charakterisierten Virusklonen am Ende der Adaptierung auftraten. Weiterhin war der Prozentsatz der veränderten viralen Genome bis Passage 20 sehr gering, was darauf hin deutet, dass auch alle anderen Mutationen – nicht nur die Deletion - erst zu einem späten Zeitpunkt im Verlauf der „Anpassung“ aufgetreten sind. Im Verlauf der Passagierung traten jedoch auch Variationen der Deletion im NS-Bereich auf. In Passage 15 gab es zwei Mal eine Deletion: Bei Nukleotid 2069 einmal -120 nt und bei Nukleotid 2165 einmal -42 nt. In Passage 20 konnte drei Mal eine Deletion in diesem Bereich beobachtet werden: zwei Mal eine Deletion von 75 nt bei Base 2023 und einmal eine Deletion von 72 nt bei Nukleotid 2058. Somit scheint die Position der Deletion im NS-kodierenden Genombereich keine Rolle zu spielen und variabel aufzutreten. Abbildung 45 zeigt eine Übersicht über die Positionen der Deletionen im NS-Bereich. Alle Deletionen lagen in der Transaktivierungsdomäne von NS-1, was einen Einfluss auf die Aktivierung des P38-Promotors zur Expression der Kapsidproteine haben könnte.

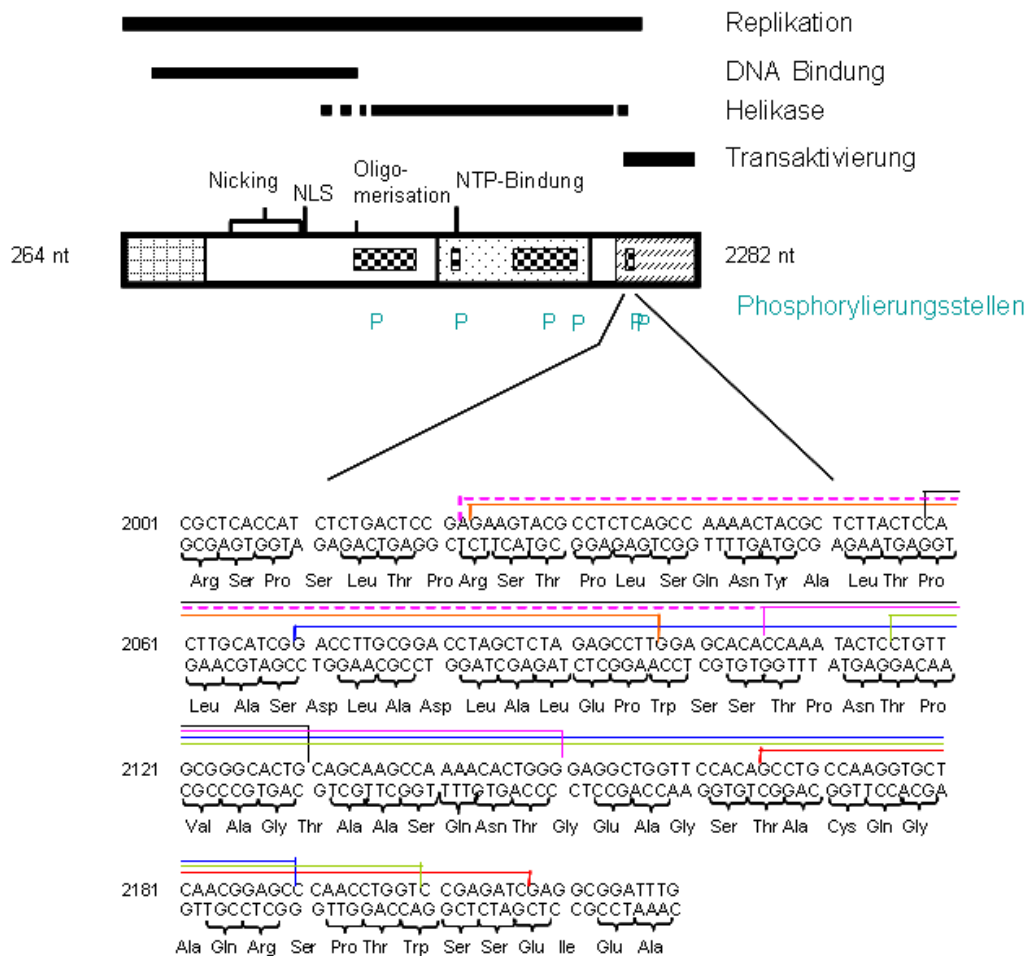


Abbildung 45: Position der aufgetretenen Deletionen im NS-Bereich

Schematische Darstellung des kodierenden Sequenzabschnittes des NS-1Proteins (264 – 2282 nt) mit den für verschiedene Aktivitäten zuständigen Domänen. Die Deletionen im NS-Bereich traten alle in der Transaktivierungsdomäne des Proteins auf und waren sehr variabel. Im unteren Teil sind die in den Passagen und adaptierten Virusklonen aufgetretenen Deletionen in die Genkarte eingetragen. **Passage (P) 15 – Sequenzierung (S) 5, P 15 – S 6, P 20 – S 4 & S 10, P 20 – S 9**, adaptierte Virusklone 1-14, **adaptierter Virusklon 13**

In Passage vier trat auch einmal eine Deletion bei Base 4714 von 58 nt auf. Diese Deletion lag jedoch im nicht-kodierenden Bereich des Genoms. Weiterhin konnte in Passage 4 einmal eine Insertion von 60 nt bei Base 4840 gezeigt werden. Diese Änderung war in ähnlicher Weise bei Klon 2 nur an einer anderen Position aufgetreten (Insertion von 57 nt bei Base 4828).

Da die Klone *in vitro* im Vergleich mit dem Wildtyp in allen untersuchten humanen Glioblastomzelllinien effizienter zur Lyse geführt haben, sollten ausgewählte Klone auch *in vivo* untersucht werden, um zu prüfen, ob die *in vitro* verbesserte Replikation und Zytotoxizität auch *in vivo* zu einer verbesserten Tumorregression führt. Hierfür wurde zunächst die Infektionseffizienz der adaptierten Virusklone im Vergleich mit dem Wildtyp in

der humanen Glioblastomzelllinie U87 untersucht, da Tumore aus dieser Zelllinie im Tierversuch eingesetzt wurden.

3.2.1.10 Infektionseffizienz der adaptierten Virusklone im Vergleich mit H-1PV

Mit der Infektionseffizienz, die hier durch die Expression des viralen NS-1-Proteins 24 hpi untersucht wurde, soll verglichen werden, wie viele Zellen von der jeweiligen Virussuspension bei gleicher MOI infiziert werden. 24 hpi wird bereits NS-1 gebildet, aber es findet noch keine Re-Infektion der Zellen mit neu gebildeten Nachkommenviren statt. Somit kann bei gleicher MOI gezeigt werden, welcher Virusklon mehr Zellen infizieren kann. Hierfür wurden U87 Zellen mit drei verschiedenen MOIs (30, 10, 3, 1) infiziert und nach 24 h mit einem spezifischen Antikörper für NS-1 sowie einem Antikörper für Lamin β zur Kennzeichnung der Zellkernmembran markiert. Anschließend wurde die Anzahl der infizierten Zellen bei den verschiedenen MOIs ausgezählt (vgl. Tabelle 22). Abbildung 46 zeigt die Fluoreszenzbilder der infizierten Zellen in 400-facher Vergrößerung und einem Zoom von 1,5.

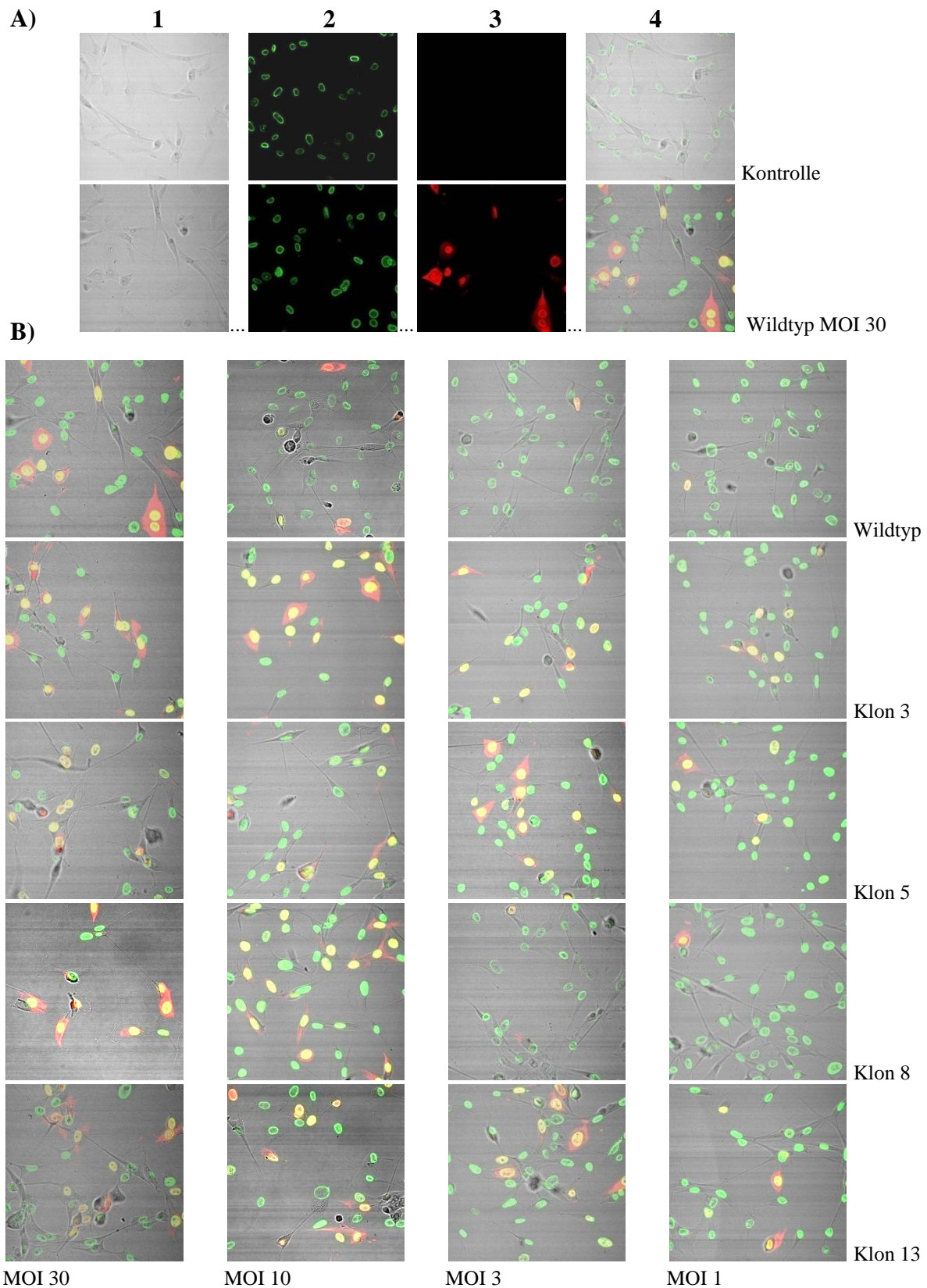


Abbildung 46: Infektionseffizienz der Virusklone
 Fluoreszenzfärbung von U87 Zellen 24 h nach Infektion **A)** Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzfärbung von U87 Zellen: unbehandelte Kontrolle und Infektion mit Wildtyp H-1PV (MOI 30 pfu/Zelle). 1: Durchlichtbild der Zellen, 2: Fluoreszenzbild der mit Lamin β gefärbten Zellkernmembranen (grün), 3: Fluoreszenzbild der mit NS-1 gefärbten Zellen (rot), 4: Überlagerung der Abbildungen 24 hpi. **B)** Überlagerung der Fluoreszenzbilder mit den Durchlichtaufnahmen nach Infektion der Zellen mit den verschiedenen Viruspensionen und den verschiedenen MOIs, infizierte Zellen in gelb

Abbildung 46 zeigt, wie effizient die einzelnen Virussuspensionen die Zelllinie U87 infizieren können. Bei niedrigen MOIs (MOI 1 und 3) sind deutliche Unterschiede in der Anzahl der infizierten Zellen bei den verschiedenen Virusklonen zu erkennen. Klon 3, Klon 5 und Klon 13 konnten mehr U87-Zellen innerhalb von 24 h infizieren als das Wildtyp H-1PV. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Auszählung der infizierten Zellen nach Infektion mit den einzelnen Klonen und den unterschiedlichen MOIs zusammengefasst.

Tabelle 22: Infektionseffizienz der Virusklone im Vergleich mit Wildtyp H-1PV

MOI	Virus	Gezählte Zellen	inf [%]	Standardfehler
30	3	192	53,48	2,22
	5	160	55,69	2,89
	8	144	44,66	4,41
	13	218	51,98	5,48
	WT	200	31,11	2,41
10	3	144	52,24	4,61
	5	174	40,42	2,92
	8	200	29,74	6,33
	13	174	55,00	7,71
	WT	189	19,84	2,64
3	3	167	47,25	3,05
	5	212	30,20	3,38
	8	225	16,71	3,44
	13	219	31,39	3,33
	WT	243	6,75	1,06
1	3	204	28,41	1,33
	5	222	15,47	2,65
	8	238	4,78	2,66
	13	191	16,33	2,87
	WT	216	4,22	1,14

Anteil der infizierten Zellen [%] 24 Stunden nach Infektion mit den verschiedenen adaptierten Viren und MOIs.

Um die Unterschiede in der Infektionseffizienz der verwendeten Virussuspensionen zu zeigen, sind die Daten der Auszählung (Tabelle 22) in einem Diagramm grafisch dargestellt (Abbildung 47). Dadurch wird deutlich, dass alle Klone U87 Zellen bei allen verwendeten MOIs effizienter infizierten als das Wildtyp H-1PV. Hierbei erwies sich Klon 3 als am stärksten „infektiös“, während Klon 8 am wenigsten effizient die Zellen infizierte. Jedoch war die Infektionseffizienz von Klon 8 immer noch höher als die des Wildtyps H-1PV. Bei MOI 30 und 10 infizierten die Klone ca. 50 % der Zellen innerhalb von 24 h, während der Wildtyp nur 31 % bzw. 20 % der Zellen infizierte. Mit der geringsten hier untersuchten MOI von 1 konnten bei Infektion mit Klon 3 30 % der Zellen als positiv für NS-1 gezeigt werden, im Vergleich zu 4 % nach Infektion mit dem Wildtyp.

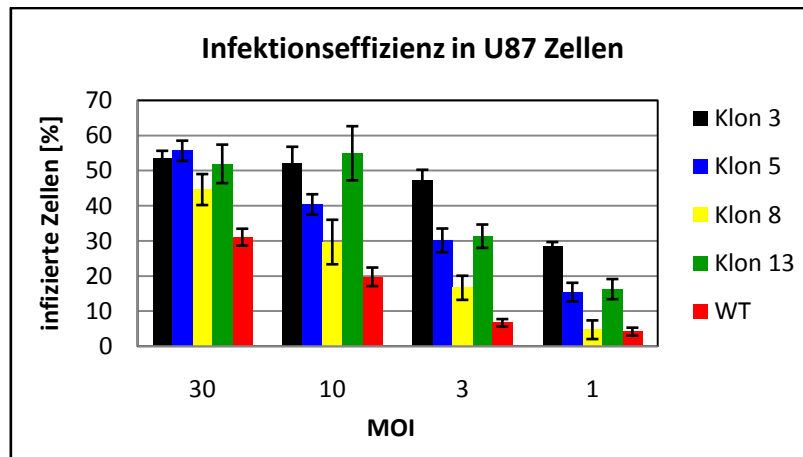


Abbildung 47: Grafische Darstellung der Infektionseffizienz
 Infektionseffizienz der Klone in U87 Zellen 24h nach Infektion. Grafische Darstellung der Auszählung des Prozentsatzes an NS-1-positiven Zellen 24 h nach Infektion mit den verschiedenen adaptierten Virusstocks und einer MOI von 1 – 30 pfu/Zelle. Als Fehlerbalken wurde der Standardfehler angegeben.

Um herauszufinden, welche der beobachteten Mutationen (siehe 3.2.1.7) für die bessere Infektionseffizienz, Replikation und Zytotoxizität der Klone verantwortlich ist, wurden rekombinante infektiöse Klone hergestellt, die die verschiedenen Veränderungen einzeln oder in Kombination besaßen (Rekombinanten). Der erste rekombinante Klon hatte die Mutationen 5, 14, 15 und 16 im kodierenden Bereich, die auch bei Klon 3 aus der Plaque-Selektion nach dem Adaptierungsprozess gefunden wurden. Die Veränderungen im nicht kodierenden Bereich wurden nicht in den rekombinanten Klon eingefügt, um deren Bedeutung für den neuen Phänotyp beurteilen zu können. Im Zuge dieser Arbeit konnten erste Versuche mit der Rekombinanten von Klon 3 durchgeführt werden. Wobei erneut die Replikationsfähigkeit und die Zytotoxizität sowie die Infektionseffizienz des Rekombinanten Klons 3 untersucht wurde.

3.2.1.11 Untersuchung des Rekombinanten Klons 3 *in vitro*

Zunächst wurden verschiedene Zelllinien mit dem rekombinanten Klon 3 mit verschiedenen MOIs infiziert und nach 5 Tagen die lebenden Zellen mit Kristallviolett färbung dargestellt. Die Infektion wurde im Vergleich mit Klon 3 und dem Wildtyp durchgeführt. Abbildung 48 zeigt die mit Kristallviolett gefärbten überlebenden Zellen nach der Infektion mit dem Klon 3, dem rekombinanten Klon 3 und dem Wildtyp H-1PV bei verschiedenen Zelllinien.

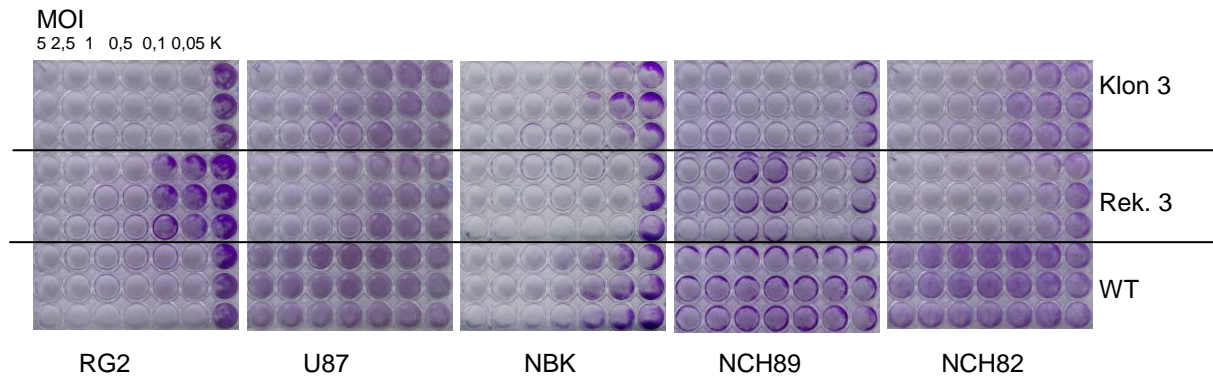


Abbildung 48: Zytotoxizitätsvergleich des rekombinanten Klons 3 mit Klon 3 und H-1PV
 Infektion der Zelllinien RG2, U87, NBK, NCH89 und NCH82 mit dem Rekombinanten Klon 3 im Vergleich mit Klon 3 und Wildtyp. Färbung der lebenden Zellen mit Kristallviolett 5 Tage nach Infektion der Zellen mit verschiedenen MOIs (5 - 0,05 pfu/Zelle)

Die Infektion der verschiedenen Zelllinien mit dem Rekombinanten Klon 3 im Vergleich mit dem Plaque-selektierten Klon 3 und dem Wildtyp zeigte, dass das rekombinante Virus ebenso in der Lage war, sich effizient in allen Zelllinien zu vermehren und alle Zellen in den Wells zu lysieren. Des Weiteren war der rekombinante Klon 3 in allen humanen Zelllinien ähnlich effizient wie der ursprüngliche Klon 3 und besser als das Wildtypvirus. Ein Unterschied zeigte sich bei der humanen Glioblastomzelllinie NCH89, in der der rekombinante Klon weniger effektiv war als der Klon 3. Bei der Zelllinie RG2 zeigte die Rekombinante eine geringere Zytotoxizität als die anderen Virussuspensionen.

Um den rekombinanten Klon 3 zu charakterisieren, wurde auch hier die Infektionseffizienz in U87-Zellen im Vergleich mit Klon 3 analysiert. Abbildung 49 zeigt die Fluoreszenzmarkierung des viralen Proteins NS-1 in U87-Zellen 24 h nach Infektion mit dem rekombinanten Klon 3 bei Verwendung der MOIs 30, 10, 3 und 1 (Zellkernmembran (grün) und NS-1 (rot)).

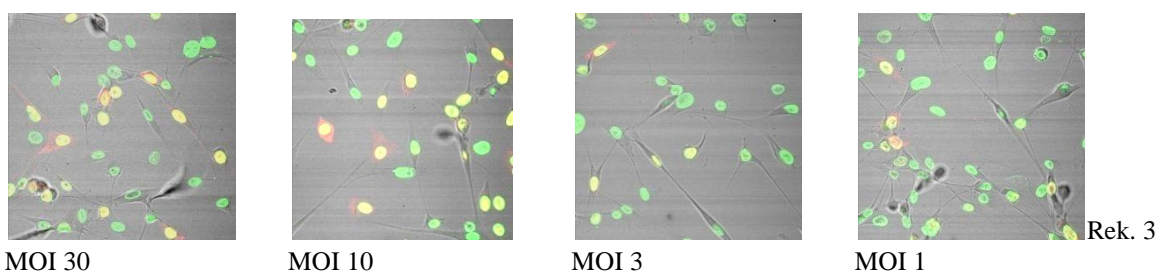


Abbildung 49: Infektionseffizienz des rekombinanten Klons 3
 Fluoreszenzfärbung von U87-Zellen 24 h nach Infektion mit MOI 30, 10, 3 und 1 des rekombinanten Klons 3. Markierung der Zellkernmembran in grün, Markierung des viralen NS-1-Proteins in rot, infizierten U87 Zellen in gelb

Die Auszählung der infizierten Zellen nach Infektion mit dem rekombinanten Klon 3 ergab, dass die Rekombinante in der Lage war, die U87-Zellen ähnlich effizient zu infizieren wie der Klon 3 (Tabelle 23). Beide Virustypen waren infektiöser für U87-Zellen als das Wildtyp H-1PV.

Tabelle 23: Infektionseffizienz des rekombinanten Klons 3

MOI	Virus	Gezählte Zellen	inf [%]	Standardfehler
30	3	192	53,48	2,22
	rek3	169	46,74	3,05
	WT	200	31,11	2,41
10	3	144	52,24	4,61
	rek3	178	53,57	4,93
	WT	189	19,84	2,64
3	3	167	47,25	3,05
	rek3	169	33,06	1,66
	WT	243	6,75	1,06
1	3	204	28,41	1,33
	rek3	235	24,78	1,83
	WT	216	4,22	1,14

Anteil der infizierten U87-Zellen [%] 24 h nach Infektion. Vergleich der Infektionseffizienz zwischen rekombinantem Klon 3 (rek3), Klon 3 (3) und Wildtyp H-1PV (WT)

Mit den vorgestellten *in vitro* Versuchen konnten gezeigt werden, dass die adaptierten Virusklone aus dem Anpassungsprozess von H-1PV an die Zelllinie NCH149 auf allen getesteten humanen Glioblastomzelllinien in den Eigenschaften Infektion, Replikation und Zytotoxizität effizienter waren als das Wildtypvirus.

Um zu überprüfen, ob die Virotherapie mit H-1PV *in vivo* durch den Einsatz der adaptierten Virusklone verbessert werden kann, wurden ausgewählte Klone im Vergleich mit H-1PV im Tiermodell untersucht. Für diese Versuche wurde ein Xenotransplantat von U87-Zellen in der Maus ausgewählt. Da nicht auszuschließen war, dass das veränderte Verhalten der Klone *in vitro* in RG2-Zellen dazu führt, dass die Klone auch *in vivo* im ursprünglichen Wirt (Ratte) ein verändertes Verhalten zeigen, wurde ein für alle verwendeten Viren artifizielles System (Maus) gewählt. Somit sollte verhindert werden, dass das Wildtyp H-1PV, welches ein natürliches Replikationsreservoir in der Ratte hat, einen Replikationsvorteil gegenüber den adaptierten Klonen im Tierversuch hat.

3.2.2 Adaptiertes H-1PV *in vivo*

3.2.2.1 Virusproduktion

Für die exemplarische Untersuchung der adaptierten Virusklone *in vivo* wurden Klon 3 und 8 ausgewählt. Klon 3 trug die meisten der aufgetretenen Mutationen, während sich Klon 8 in allen Zellen effizienter vermehrte als das Wildtypvirus (auch in RG2-Zellen). Diese Klone wurden für die Tierversuche auf NBK-Zellen produziert und über einen Iodixanol-Dichtegradienten aufgereinigt. Zum Vergleich wurde ein Wildtypstock mit demselben Protokoll hergestellt. Die Titer der Virussuspensionen wurden durch Plaque Assay und qRT-PCR bestimmt. Tabelle 24 gibt die gemessenen Titer der Virenstämme an.

Tabelle 24: Konzentration der Virusstocks für die Tierversuche

Virenstamm	Lösungsmittel	Titer in pfu/ml	Titer in Vg/ml
H-1 Wt	Iodixanol	5,58E+10	2,60E+13
Klon 3	Iodixanol	2,53E+09	1,18E+13
Klon 8	Iodixanol	8,03E+09	5,85E+12

Alle Virusstocks konnten mit einem ausreichend hohen Titer produziert werden. Hierbei unterschied sich das Verhältnis von viralen Genomen (Vg/ml) zu infektiösen Viren (pfu/ml) bei Klon 8 und Wildtyp H-1PV nicht wesentlich, während bei der Produktion von Klon 3 das Verhältnis von viralen Genomen zu infektiösen Viren zehn Mal kleiner war.

3.2.2.2 Onkolytische Virotherapy mit den adaptierten Virusklonen in der Maus

Bei diesen Versuchen wurde die Wirksamkeit zweier adaptierter Virusklone im Tier mit dem Wildtyp verglichen. Hierfür wurden immundefizienten Nacktmäusen (8 Mäuse pro Gruppe) subkutan, mit den adaptierten Virusklonen 3, 8 und Wildtyp H-1PV und einer MOI von 1,5 infizierte, U87 Zellen implantiert. Der Kontrollgruppe wurden nicht infizierte U87 Zellen implantiert (ex vivo-Infektion vgl. Haag et al, 2000; Wetzel et al, 2001; Enderlin et al, 2009). Sobald die ersten Tumore wuchsen (12 Tage nach Implantation) wurde die Größe der Tumore bestimmt.

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Biostatistik des DKFZ wurde eine Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit durchgeführt, die Aufschluss darüber gibt, ob eine Behandlung einen Erfolg gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit sich bringt. Das mittlere Tumorstadium und die Überlebenswahrscheinlichkeit der einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 50 dargestellt.

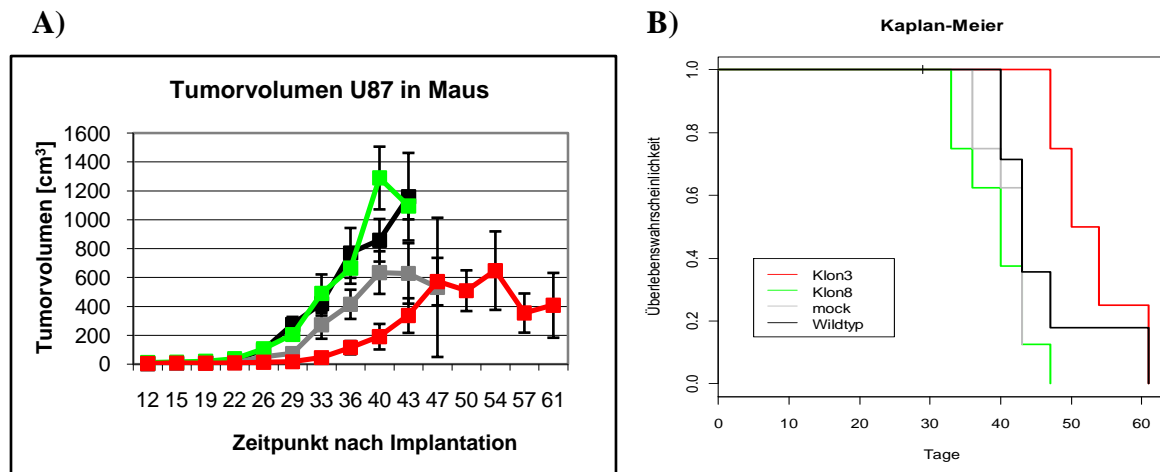


Abbildung 50: Tumorwachstum und Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse

Tumorwachstum und Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse nach Implantation infizierter U87 Zellen im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Die Zellen wurden mit einer MOI von 1,5 pfu/Zelle mit dem jeweiligen Virus infiziert und 4 h später subkutan implantiert **A)** Tumorvolumen [mm³] der infizierten und 4 h später subkutan implantierten U87 Zellen in der Nacktmaus über einen Zeitraum von 61 Tagen nach Zellimplantation. Mock, Wildtyp, Klon 8, Klon 3, **B)** Kaplan-Meier Statistik der Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse in den einzelnen Behandlungsgruppen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der mit Klon 3 behandelte Gruppe war signifikant größer als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0014$) Schwarz: unbehandelte Kontrolle (Mock), grau: Wildtyp H-1PV, grün: Klon 8, rot: Klon 3

Bei dem hier verwendeten Tumormodell führte keine der Virussuspensionen zu einer Genesung der Tiere, alle Tiere mussten auf Grund des Tumorwachstums zu verschiedenen Zeitpunkten getötet werden. Jedoch war das Tumorwachstum der mit Klon 3 infizierten Zellen im Tier wesentlich langsamer im Vergleich mit den mit anderen Viren infizierten U87-Tumoren der anderen Tiergruppen. Von den Tieren mit Implantat aus Klon 3 infizierten U87-Zellen lebten am Ende des Experiments (61 Tage) noch zwei Tiere, deren Tumor noch nicht den zulässigen Durchmesser von 1,5 cm überschritten hatte (GV SOLAS; Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäuse und Ratten). Das letzte Tier der Gruppe mit den mit Klon 8 infizierten Zellen musste 43 Tage nach Implantation getötet werden; zu diesem Zeitpunkt lebten noch zwei Tiere aus der Kontrollgruppe, 2 Tiere aus der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere, die mit Klon 3 infizierte Zellen implantiert bekamen (siehe Abbildung 50 A). Die aus den Daten errechnete Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier (Abbildung 50 B) ergab, dass sich das *in vivo*-Wachstum der mit Klon 3 infizierten U87-Zellen signifikant von den anderen Gruppen unterschied ($p = 0,0014$). Zwischen Klon 8, Wildtyp und der Kontrollgruppe konnte in diesem Experiment kein Unterschied im Tumorwachstum festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob die Viren in der Lage waren, *in vivo* in den Tumorzellen vermehrt zu werden und diese zu lysieren, wurde am Ende des Experiments von jeder Gruppe Tumorgewebe entnommen und auf die Anwesenheit von Virus hin untersucht.

3.2.2.3 Detektion der Viren im Tumorgewebe

An Tag 61 nach Zellimplantation wurde aus den mit verschiedenen Viren infizierten U87 Zellen entstandenen Tumoren der Mäuse DNA isoliert und mittels PCR das Genom wie bereits beschrieben in drei Segmenten amplifiziert. Abbildung 51 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente nach der PCR.

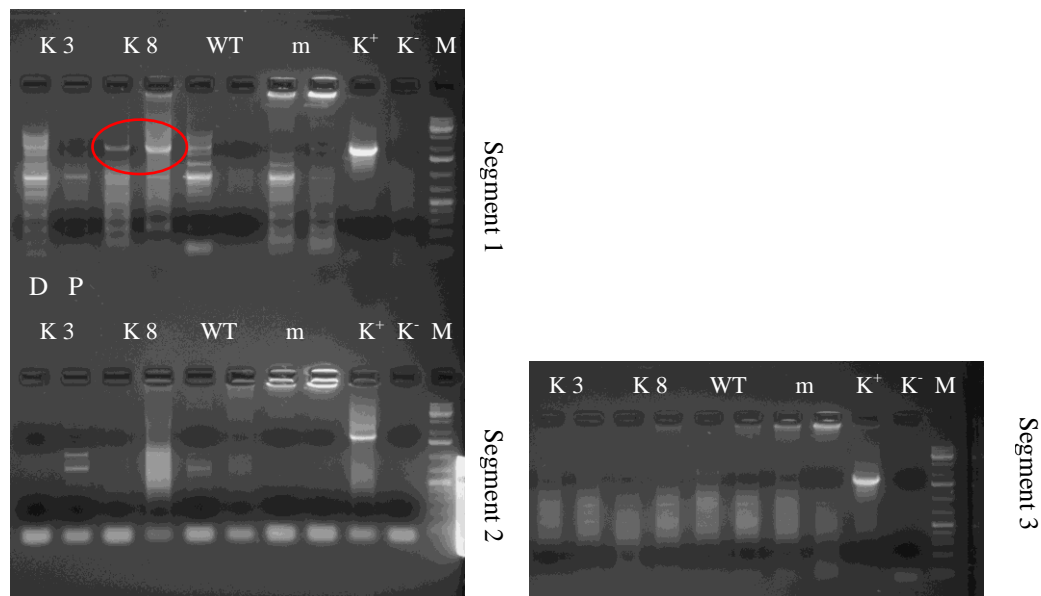


Abbildung 51: Amplifikation viraler DNA aus Tumorgewebe der Maus
Gelelektrophorese der viralen PCR-Fragmente aus der DNA des Tumorgewebes der Mäuse. Isolierung der DNA mit zwei verschiedenen DNA-Kits (PureLink Genomic Kit = P, DNeasy = D) K+: mit H-1PV infizierte RG2-Zellen, K: Wasserkontrolle, M: DNA-Größen Marker GeneRuler 1 kb DNAladder plus, K3: Klon 3, K8: Klon 8, WT: Wildtyp H-1PV, m: unbehandelte U87 Zellen.

Aus den Tumorgeweben der Mäuse konnten nicht alle viralen Genomfragmente amplifiziert werden (vgl. 2.2.4.6). Einzig bei den mit Klon 8 infizierten Tumorzellen konnten spezifische Banden von Segment 1 detektiert werden (roter Kreis, Abbildung 51). Die beiden anderen Segmente des Genoms konnten in keiner DNA-Probe amplifiziert werden. Daher konnten die DNA-Banden nicht ausgeschnitten und analysiert werden. Um jedoch die DNA-Replikation im Tumorgewebe zu untersuchen, wurde die DNA aus dem Gel mit den PCR-Fragmenten aus Segment 1 und 2 des Genoms nach der PCR auf eine Nylonmembran geblottet und mit der bei den Southern Blot-Analysen verwendeten radioaktiven NS-1-Sonde hybridisiert (vgl. 2.2.4.5). Die Ergebnisse der Hybridisierung zeigten erneut nur bei den mit Klon 8 infizierten U87-Zell-Tumoren ein positives Signal (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden Gefrierschnitte aus den Tumorgeweben angefertigt, um die Tumore auf Expression des viralen NS-1-Proteins hin zu untersuchen. Die Schnitte wurden mit einem spezifischen NS-1-Antikörper mittels Immunfluoreszenz analysiert. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI-haltigem

Eindeckmedium markiert. Abbildung 52 zeigt die Expression von NS-1 im Tumorgewebe der Mäuse aus den Gruppen mock, Wildtyp und Klon 3.

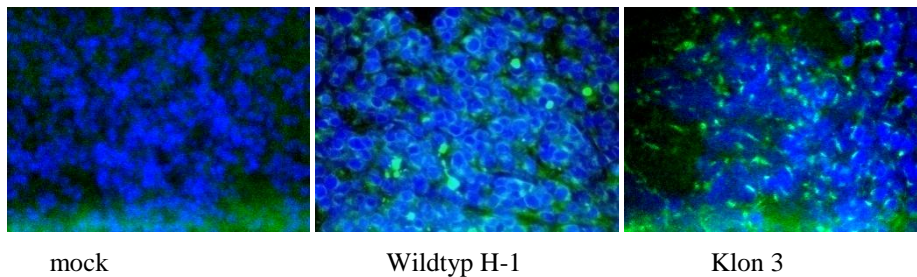


Abbildung 52: Nachweis viraler Proteine im Tumorgewebe
Nachweis des viralen NS-1 Proteins in Schnitten der Maustumore der Behandlungsgruppen Klon 3, Wildtyp und mock. Blau: Dapi, grün: NS-1, Vergrößerung: 200-fach

Die Schnitte aus den U87-Zell-Tumoren mit Klon 3 zeigten das stärkste NS-1-Signal; bei den mit Wildtyp behandelten Zellen konnten hingegen nur vereinzelte NS-1-positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 52). Bei dem Tumor aus mit Klon 8 behandelten U87 Zellen konnte im Mikroskop kein positives NS-1-Signal detektiert werden (nicht gezeigt).

Um sicherzustellen, dass die im Tierversuch verwendeten Klone die identischen Mutationen besaßen wie die plaque-selektierten adaptierten Virusklone nach der Anpassung an NCH149, wurden die für den Tierversuch produzierten Stocks sequenziert.

3.2.2.4 Sequenzierungen der im Tierversuch verwendeten Virusstocks

Da aus den Tumorgeweben der Mäuse keine geeigneten DNA-templates gewonnen werden konnten, wurden die im Tierversuch eingesetzten Virusstocklösungen für die Sequenzierung verwendet. Tabelle 25 gibt einen Überblick über die aufgetretenen Mutationen der im Tierversuch verwendeten Virusstocks im Vergleich mit dem Genom der ursprünglichen Klone 3 und 8.

Tabelle 25: Sequenzierung der im Tierversuch verwendeten Virusstocks

Klon →	3	3 (T)	8	8 (T)
Mutation ↓				
5	X	X	X	X
6				2650 C/T
7				2760 + A
9	X			Keine sinnvollen Sequenzdaten, nur Bruchstücke
10	X			
12	X			
14	X		X	
15	X		X	
16	X			
23	X			
25		X + 19 AS		
Start		177		160
Ende		4957		3467

Sequenzanalyse der im Tierversuch verwendeten Virusstocks (T) im Vergleich mit den ursprünglichen Klonen 3 und 8. X: Mutation konnte bei der Analyse der Sequenz nachgewiesen werden.

Die Sequenzierung ergab, dass bei dem im Tierversuch verwendeten Klon 3 (3 (T)) andere Mutationen auftraten, als beim ursprünglich untersuchten Klon 3. Bei der im Tierversuch verwendeten Virussuspension fehlten die Mutationen 9,10, 12, 14, 15, 16 und 23. Des Weiteren trat bei Klon3 (T) eine Insertion von 19 AS bei Nukleotid 4828 auf. Diese Insertion trat bei den Plaque-selektierten Klonen bei Nummer 2 auf. Bei der Sequenzierung des im Tierversuch verwendeten Klon 8 (8 (T)) war von Segment 3 (3270-5000 nt) keine Sequenzierung möglich. Dieser Klon zeigte zwei neue Veränderungen zwischen Mutation 7 und 8, die bei keinem plaque-selektierten Klon auftraten. Bei Nukleotid 2650 war Cytosin gegen Thymin getauscht und bei Nukleotid 2760 fand sich ein zusätzliches Adenin.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil gezeigt werden, dass die Adaptation zu einer verbesserten Replikation und Zytotoxizität aller Virusklonen in humanen Glioblastomzellen geführt hat, ohne zu einer erhöhten Toxizität für nicht transformierte Zellen zu führen. Dies könnte zum Teil auf eine erhöhte Infektionseffizienz der adaptierten Klone zurückzuführen sein. Die Analyse der Mutationsgeschwindigkeit zeigte, dass die genetischen Veränderungen erst bei den letzten Passageschritten auftraten, was bedeutet, dass H-1PV eine große genetische Stabilität hat. *In vivo* im Tierversuch führte die Infektion von U87-Zellen *ex vivo* mit Klon 3 nach der subkutanen Implantation zu einem signifikant verlangsamten Tumorwachstum im Vergleich mit dem Wildtyp und der Kontrolle.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag bei der Entwicklung einer klinischen Anwendung von H-1PV zur Therapie von Glioblastoma multiforme und möglicherweise weiteren Krebserkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass H-1PV in der Ratte nach verschiedenen Applikationsmethoden über das Blut im Organismus verteilt wird, die Blut-Hirn-Schranke überwindet, in den Tumor gelangt, ausschließlich dort virale Proteine gebildet werden und der Tumor effizient lysiert wird, was zu einem signifikant längeren Überleben der Tiere führte (Geletneky et al, 2010; Kiprianova et al, 2011). Im Tierversuch konnte hier die Ausscheidung infektiöser Viren durch Urin und Speichel nachgewiesen werden. Die *intranasale* Route für die Applikation von H-1PV konnte als einfache, effiziente und sichere Option der Virotherapie gezeigt werden, wobei auch hier die virale Proteinexpression auf das Tumorgewebe begrenzt war. Bei der Untersuchung der Replikationsfähigkeit von H-1PV *in vivo* im Gliom bei der Ratte zeigte sich, dass sich das Virus präferentiell im Tumorgewebe anreichert und dort höchst wahrscheinlich vermehrt wird. Ein weiterer Teil dieser Arbeit betraf die Effizienzsteigerung von H-1PV durch Adaptierung an humane Glioblastomzellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass H-1PV an humane transformierte Zelllinien adaptiert werden kann. Hierbei konnten die virale Replikation und die Zytotoxizität von H-1PV in humanen Glioblastomzellen verstärkt werden, ohne die Onkoselektivität des Virus einzubüßen.

Die hier gezeigten Daten sollen in zwei getrennten Abschnitten diskutiert werden, da somit besser zwischen Wildtyp H-1PV und den Experimenten mit den adaptierten Virusklonen unterschieden werden kann.

4.1 Anwendung von H-1PV *in vivo*

1) Ausscheidung von H-1PV

Bereits nach einmaliger Infektion (i.c. / i.v.) konnte im Rattenmodell eine Ausscheidung infektiöser Viren über Urin und Speichel bis zu 27 dpi nachgewiesen werden. Die Ausscheidung infektiöser Viren über Urin steht im Einklang mit den Untersuchungen an anderen Nager-Parvoviren, welche laut Kerr et al im Urin nachgewiesen werden können (Kerr et al, 2006). Bei drei Behandlungsgruppen (i.c. / i.v. / Tumor i.v.) konnten infektiöse Viren sowie virale DNA im Urin detektiert werden. Nach i.c.-Infektion von tumortragenden Ratten konnte kein infektiöses Virus im Urin oder im Nierengewebe nachgewiesen werden, jedoch konnte im Urin, aber nicht in der Niere, mittels PCR virale DNA gezeigt werden. Die Diskrepanz zwischen PCR-Ergebnis und Detektion infektiöser Viren in dieser Tiergruppe

kann durch die Analyse von unterschiedlich gewonnenen Proben bei beiden Versuchen erklärt werden. Da die mittels Stoffwechsellkäfig gesammelten Urinproben stark verunreinigt waren und zu einer starken Inhibition der PCR-Reaktion geführt habe, wurden für den Nachweis viraler DNA in einem erneuten Experiment reine Urinproben durch manuelles Ausstreichen der Blase erhalten. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Urinentnahme im Stoffwechsellkäfig ein Mal pro Tag eine Ausbeute von ca. 10 ml Urin mit sehr starkem Sediment erbrachte. Eventuell war die Menge der Viren in den Proben deshalb zu stark verdünnt, um mittels PCR sicher detektiert werden zu können.

In Speichelproben infizierter Tiere konnte bei allen Behandlungsgruppen virale DNA und infektiöses Virus nachgewiesen werden, wobei die virale DNA bei tumortragenden Tieren nach 5 - 6 Tagen und bei Tieren ohne Tumor schon nach 2 bzw. 3 Tagen detektiert werden konnte. Interessanterweise zeigte sich bei der Ausscheidung infektiöser Viren, dass bei 3 Tiergruppen (i.v.-Infektion mit Tumor, i.v.-Infektion ohne Tumor, i.c.-Infektion ohne Tumor) ein biphasischer Ausscheidungsverlauf stattfand. Schon 1 h nach Applikation konnten infektiöse Viren im Speichel detektiert werden, wobei es sich hier um die applizierten Viren (input) handeln müsste. Danach war nur virale DNA im Speichel nachweisbar, und erst 4 - 6 Tage nach Infektion konnten erneut infektiöse Viren im Speichel detektiert werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Funden in den untersuchten Nasengewebe, ist das Muster ein anderes. Bei den Tumor freien Tieren konnten von 1 h bis 5 dpi infektiöse Viren im Nasengewebe nachgewiesen werden, während bei den tumortragenden Ratten zuerst 1 hpi Virus gezeigt werden konnte und dann nicht mehr. Bei den i.v.-infizierten Tieren mit Tumor trat 5 dpi wieder infektiöses Virus in der Nase auf, während nach i.c.-Infektion bis 5 dpi kein H-1PV nachgewiesen wurde.

In Kotproben konnte nach einmaliger Infektion nie Virus (weder virale DNA noch infektiöse Partikel) nachgewiesen werden. Somit ist dieser Infektionsweg unwahrscheinlich. Bei der Infektion verschiedener Mausstämme mit dem immunsuppressiven Minute Virus of Mice (MVMi), einem H-1PV sehr ähnlichen Virus, konnten Janus et al 2008 nur virale DNA, aber nie infektiöse Viren, in den Stuhlproben nachweisen. Wie aber auch hier für H-1PV im Speichel gezeigt (27 Tage) ging die Ausscheidung viraler DNA von MVMi 20 dpi stark zurück (Janus et al, 2008).

Die quantitative Analyse der H-1PV DNA-Menge in den Urin- und Speichelproben ergab, dass über beide Wege eine ähnliche Menge virale DNA ausgeschieden wird und dass bei den Tieren ohne Tumor in den Ausscheidungen größere Mengen viraler DNA nachgewiesen werden konnten als bei den tumortragenden Tieren. Dies könnte auf eine Anreicherung und

längere Verweildauer von H-1PV im Gehirn, auf Grund des Tumors, hindeuten. (Abbildung 17, Abbildung 21). Auffällig ist, dass die Ausscheidung infektiöser Viren über den Zeitraum hinaus stattfand, in dem die Tumore gewöhnlich lysiert werden: Im Durchschnitt waren die infizierten Tumore 7 dpi im MRT nicht mehr nachweisbar (Geletneky et al, 2010). Folglich wird das Virus ohne passenden Wirt weiterhin ausgeschieden, was darauf hin deutet, dass H-1PV in der Ratte ein Reservoir haben muss, wo es zumindest zeitweise persistieren bzw. repliziert werden kann. Wo sich dieses Reservoir für H-1PV befindet, ist bisher unbekannt. In der Literatur gibt es verschiedene Untersuchungen zur Persistenz von Rattenparvoviren. Dabei wurde jedoch hauptsächlich die virale DNA im Blut der Tiere detektiert (vgl. Gaertner et al, 1996; Jacoby et al, 2000; Jacoby et al, 2001). Eine Persistenz von H-1PV DNA konnte z.B. in humanen T- und B-Lymphomzellen erzeugt werden (Faisst et al, 1990). Es wird jedoch vermutet, dass sich das Reservoir von H-1PV im Bronchialgewebe bzw. in den Schleimhäuten befinden könnte, da eine Infektion über Speichel durch die hier erhaltenen Daten erhärtet wird, zumal eine Infektion zwischen den Ratten auch über die Käfiggrenze hinweg stattfand. Auffällig war zudem, dass im Urin maximal 12 Tage nach Infektion der Tiere noch infektiöses Virus nachgewiesen werden konnte, während in den Speichelproben bis zu 27 Tage nach Infektion infektiöse Viren detektiert werden konnten. Somit scheint eine Tröpfcheninfektion viel länger möglich, als eine Infektion über Kontakt mit Urin. Jedoch konnte bei der gemeinsamen Haltung von infizierten und nicht infizierten Ratten in einem Isolator nicht ausgeschlossen werden, dass eine Übertragung von H-1PV über die Handschuhe der Tierpfleger beim Reinigen der Käfige und beim Umsetzen der Tiere stattfand. Bei getrennter Haltung der infizierten und nicht infizierten Tiere in unterschiedlichen Isolatoren fand nie eine zufällige Übertragung von H-1PV statt.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass H-1PV im natürlichen Wirt über Urin und Speichel ausgeschieden wird. Es war auffällig, dass bei Anwesenheit eines Tumors und *intratumoraler* Infektion die Ausscheidung zu einem späteren Zeitpunkt einsetzte, was bedeuten könnte, dass sich H-1PV vermehrt im Tumorgewebe anreichert und dort länger verweilt im Vergleich mit den Tieren ohne Tumor. Nach der systemischen Infektion (i.v.) konnte kein Unterschied in der Virusausscheidung zwischen tumorfremen und tumortragenden Tieren beobachtet werden, was an der Applikationsart liegen könnte. Nach der i.v.-Applikation wird das Virus zunächst im gesamten Organismus verteilt und muss den Weg zum Tumorgewebe erst finden. Offenbar wird das Virus dabei nach Passage durch die Leber und Nieren zum Teil sofort wieder ausgeschieden. Das bedeutet aber auch, dass die positiven Funde von Viren in der Niere zum Teil auch auf Grund der Durchblutung verursacht worden sein könnten und somit nicht die

Nierenzellen an sich infiziert waren. Für die getrennte Untersuchung von Organen und Blut hätte eine Perfusion der Ratten vor der Organentnahme durchgeführt werden können.

Der oftmals biphasische Verlauf der Ausscheidung lässt sich dadurch auch erklären: Zunächst wird das input-Virus im Organsimus verteilt und ein Teil wieder direkt ausgeschieden (frühe Ausscheidung 1h – 1 dpi). Daraufhin findet das Virus seinen Replikationsort (Tumor, natürliche Wirtszellen in der Ratte), wird dort vermehrt, was dann nach einer bestimmten Zeit zu einer Ausscheidung der neu gebildeten Viren über Urin und Speichel führt (späte Ausscheidung ca. 1 Woche nach Infektion). Hierbei wird das Virus dann an andere Tiere weitergegeben.

Dies bedeutet, dass bei einer Anwendung am Menschen im Rahmen klinischer Studien zu prüfen ist, ob deren Ausscheidungen möglicherweise infektiöse Viren enthalten und ob der zeitliche Ablauf der Ausscheidung dem der Ratten entspricht. Gegebenenfalls müssten die Patienten über den ermittelten Zeitraum isoliert werden.

Abschließend darf nicht unterschätzt werden, dass diese Daten alle nach einer artifiziellen Infektion erhoben wurden. Die Ausscheidung von H-1PV könnte nach einer Infektion über die „natürliche“ Route anders verlaufen. Des Weiteren könnten sich auch die Replikation und die Verteilung der Viren im Organismus, insbesondere bei natürlicher Infektion ohne Anwesenheit eines Tumors, unterscheiden. Dabei hätte das Virus erst die natürlichen Eintrittsbarrieren in den Organismus zu überwinden (Schütt & Bröker, 2009). Wobei das Kapsid der Parvoviren sehr stabil gegenüber Umwelteinflüssen ist (Kerr et al, 2006)

2) *intranasale* Applikation von H-1PV

Da H-1PV offenbar durch Tröpfcheninfektion unter den Ratten verbreitet wird, lag es nahe die *intranasale* Applikation von H-1PV zu analysieren, die sich als einfach durchzuführende und schnelle Methode der Medikation erwies. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit H-1PV auf diesem Wege zu einer effizienten Onkolyse und signifikanter Verlängerung des Überlebens der Ratten führte (Kiprianova et al, 2011). Wie bei den anderen Applikationsarten (i.c. / i.v.) auch war die Expression der viralen Proteine auf das Tumorgewebe beschränkt, und auch hier konnte eine Anreicherung bzw. Konzentration des Virus im Tumor beobachtet werden (Abbildung 24). Die Verteilung viraler DNA in den Organen entsprach den früher von uns beschriebenen Daten nach *intratumoraler* und *intravenöser* Applikation (Geletneky et al, 2010). Ergänzend wurde in dieser Arbeit die Virusverteilung in Tieren ohne Tumor 1 und 3 Tage nach *intranasaler* Infektion untersucht, wobei sich kein Unterschied zwischen tumortragenden und tumorfreien Tieren ergab. Bei der

Analyse des Lungengewebes auf virale DNA konnte gezeigt werden, dass nicht bei allen infizierten Tieren dort H-1PV nachgewiesen werden konnte. Somit scheint die Lunge nicht das primäre Zielorgan nach *intranasaler* Applikation zu sein. Bei der Verteilung der viralen DNA im Organismus konnte gezeigt werden, dass es unabhängig von der Anwesenheit der DNA im Blut, für H-1PV negativ und positiv getestete Organe gab. Dies ist damit zu erklären, dass H-1PV nach der Infektion schnell (innerhalb der ersten Stunden bis 1 dpi, je nach Infektionsart) im Organismus verteilt wird. Die im Blut befindlichen Viren werden dann aktiv von Komponenten des angeborenen Immunsystems beseitigt und sind somit nicht mehr im Blut nachzuweisen, die zuvor verteilten Partikel verbleiben aber noch in den Organen, um dann nach und nach über das Blut verdünnt und abtransportiert zu werden (Schütt & Bröker, 2009). Dabei konnte bisher noch keine lytische Infektion der Organe beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Virus in der Lage ist, ohne pathologische Veränderungen in gesundem Gehirngewebe hervorzurufen, über die *intranasale* Route ins Gehirn zu gelangen und dort die Tumorzellen zu infizieren und selektiv abzutöten. Somit könnte dies eine einfache und komfortable Art der Behandlung von Patienten bei der onkolytischen Virotherapie sein, wodurch die Risiken eines chirurgischen Eingriffs, wie bei der *intratumoralen* Applikation, vermieden werden könnten. Des Weiteren ermöglicht diese Route die Menge der verabreichten Viren zu vergrößern, da hier der Platz im Schädelknochen kein limitierender Faktor ist, und die Applikation problemlos mehrmals wiederholt werden kann (bis zum Auftreten der H-1PV-spezifischen Antikörper). Obwohl die Expression viraler Proteine im Tumorgebiet verzögert stattfand im Vergleich zu der i.c.- und i.v.-Infektion und die Onkolyse nicht so rasch einsetzte, konnte dennoch ein eindeutiger Behandlungserfolg im Tiermodell erzielt werden.

Da sich die *intranasale* Applikationsmethode als erfolgversprechend zeigte und die Übertragung der Infektion zwischen den Tieren höchst wahrscheinlich durch Tröpfcheninfektion stattfindet, wurde hier die Nasenschleimhaut als mögliches Reservoir für H-1PV in der Ratte untersucht. Die Isolierung von Zellen aus Nasengewebe und die Infektions- und Replikationsexperimente mit H-1PV in den ausgewachsenen Zellen zeigte, dass H-1PV nicht in diesen Zellen persistiert und sich dort auch nicht repliziert.

3) Virämie

Um den Verlauf einer Virämie nach H-1PV-Infektion und die Geschwindigkeit der Verteilung des Virus im Organismus zu untersuchen, wurde das Blut infizierter Tiere über einen Zeitraum von zehn Tagen nach Infektion untersucht. Bei allen tumortragenden Tieren, unabhängig von der Applikationsart, konnte 1 dpi virale DNA im Blut nachgewiesen werden. Nach i.v.-Infektion konnte bis 5 dpi durchgehend H-1PV-DNA detektiert werden, während nach i.c.-Infektion nur die Blutprobe von Tag 6 erneut ein positives Ergebnis ergab und alle anderen Proben negativ für H-1PV waren. Das Blut der tumortragenden, *intranasal*-infizierten Wistar und RNU Ratten war an Tag 1, aber nicht an Tag 5 nach Infektion positiv für H-1PV. Bei i.v.- und i.c.-behandelten Ratten ohne Tumor konnte zu mehreren Zeitpunkten virale DNA im Blut nachgewiesen werden, während bei tumorfreien Tieren nach i.n.-Infektion keine DNA an Tag 1 oder 5 nach Infektion im Blut gezeigt werden konnte (Tabelle 17). Da jedoch bei allen i.n.-infizierten Tieren virale DNA in den Organen nachweisbar war (1 oder 3 dpi), läuft offenbar die Verteilung im Organismus / die Virämie nach i.n.-Infektion sehr schnell ab, und somit konnte zu den hier untersuchten Zeitpunkten (1 und 5 dpi) kein Virus bzw. kein Virus mehr im Blut detektiert werden. Die Menge viraler DNA im Blut nach i.c.- und i.v.-Infektion war so gering, dass eine quantitative Bestimmung der DNA nur bei den i.v.-infizierten Tieren von Tag 1 - 3 nach Infektion erfolgreich war. Durch das mehrfache Auftreten viraler DNA in den Blutproben nach i.v.- und i.c.-Infektion konnte bei allen Gruppen das Einsetzen einer Virämie gezeigt werden (Bonin, 1973). Bei den tumortragenden Tieren mit i.v.-Infektion konnte die Untersuchung der späteren Zeitpunkte auf Grund des frühen Ablebens der Tiere dieser Gruppe nicht stattfinden, daher konnte in dieser Gruppe nur das erste Auftreten viraler DNA im Blut gezeigt werden. In allen Fällen war jedoch die Infektion mit H-1PV mit einer Immunantwort verbunden, was durch den Nachweis H-1PV spezifischer Antikörper im Serum bereits gezeigt werden konnte. Nach i.c.- und i.v.-Infektion bei tumortragenden Tieren konnte 7 Tage nach Infektion ein hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern detektiert werden, während nach *intranasaler* Applikation erst nach 10 Tagen Antikörper auftraten (Geletneky et al, 2010; Kiprianove et al, 2011). Da die Immunität der Bevölkerung gegen H-1PV bisher sehr gering ist und somit nach einer Infektion erst Antikörper gebildet werden müssten, ist das therapeutische Fenster nach der Infektion im besten Fall 10 Tage, bevor das Immunsystem aktiv gegen die Infektion vorgeht. In einem experimentellen Heilversuch konnte bereits an zwei Patienten gezeigt werden, dass nach einer Infektion (i.m. / s.c. / i.t.) mit H-1PV Antikörper 10 bzw. 14 Tage nach Infektion im Blut

nachweisbar waren. Diese antivirale Immunantwort verursachte jedoch keine schwerwiegenden Nebenwirkungen (Toolan et al, 1965).

Die Eigenschaft von Viren, selektiv vermehrt zu werden, ist einer der wichtigsten Vorteile der Virotherapie im Vergleich mit anderen Medikationen, und hat deren Anwendung erst interessant gemacht, da somit die verabreichte Dosis sehr gering sein kann. Trotzdem birgt diese Eigenschaft auch einige Gefahren, wie z.B. genetische Veränderung des Virus einhergehend mit einem möglichen Verlust der Onkoselektivität. Eine Ansteckung und Verbreitung in der Bevölkerung in Kombination mit einer entstehenden breiten Immunität gegen das Virus ist hierbei ebenso unerwünscht (vgl. Vile et al, 2002). Daher war es von großem Interesse die Vermehrung von H-1PV *in vivo* zu analysieren.

4) Replikation

H-1PV ist *in vitro* in der Lage sich in verschiedenen Ratten- und humanen transformierten Zelllinien effektiv zu vermehren (Herrero Y Calle et al, 2004). Hier wurde die Fähigkeit von H-1PV, sich *in vivo* im immunkompetenten Tier im Tumorgewebe zu vermehren, analysiert. Nach den verschiedenen Applikationsarten (i.c. / i.v.) wurde den Ratten das Gehirn entnommen und beide Hemisphären getrennt analysiert. Hierbei konnte keine Zunahme der Gesamtvirusmenge im Tumor über einen Zeitraum von 7 Tagen nachgewiesen werden. Bei der Analyse der DNA-Replikation in den Gehirnhälften zeigte sich, dass 1 hpi bereits eine Konzentration der Viruspartikel im Tumor stattgefunden hat. 1 dpi konnte jedoch nur noch bei den i.c.-infizierten Tieren mit und ohne Tumor virale DNA mit der verwendeten Southern Blot-Methode im Gehirn nachgewiesen werden. Dort konnte jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen dem tumortragenden Tier sowie dem Tier ohne Tumor und den beiden Hemisphären gezeigt werden. An Tag 3 nach Infektion war bei keinem Tier im Gehirn mittels Southern Blot Analyse virale DNA nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte so keine Zunahme der viralen DNA im zeitlichen Verlauf nach Infektion gezeigt werden. Auffällig war jedoch, dass in der Leber als Vergleichsorgan nie genug virale DNA vorhanden war, um ein Signal mittels Southern Blot-Analyse zu erhalten. Diese Daten decken sich mit den Beobachtungen infektiöser Viren im Gehirn, bei denen auch eine stetige Abnahme der Virusmenge gezeigt werden konnte. Dies war jedoch zu erwarten, da das Virus nach Infektion sehr schell über die Blutbahn im Organismus verteilt wird. Interessanterweise konnte 1 dpi in den tumortragenden Hemisphären von i.c.- und i.v.-infizierten Tieren am meisten Virus nachgewiesen werden. Dieser Unterschied amortisierte sich bei den i.c.-behandelten Ratten im Laufe der Zeit wieder. Nach 7 Tagen konnte nur noch gezeigt werden, dass die

Hemisphäre, in die das Virus injiziert wurde, einen höheren Titer aufwies, unabhängig davon, ob zu Beginn ein Tumor vorhanden war oder nicht. Die tumortragenden Tiere mit i.v.-Infektion wiesen bis zum Ende der Untersuchung eine größere Menge infektiöser Viren auf, als die nicht tumortragenden Ratten nach i.v.-Infektion, wobei ab 3 dpi kein Unterschied mehr zwischen den Hemisphären (tumortragend / contralateral) zu beobachten war.

Mit diesen Daten konnten zwar keine Zunahme der Gesamtmenge infektiöser Viren im Gehirn gezeigt werden, es deutet jedoch alles darauf hin, dass sich das Virus nach Infektion im Gehirn tumortragender Ratten zumindest konzentriert und dort länger verweilt, als in den Tieren ohne Tumor. Da die Virusmenge im Gehirn stetig abnahm, konnte nicht direkt eine virale Replikation im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Es könnte jedoch sein, dass bei den i.c.-infizierten Tieren das Gehirn durch die große Inputmenge an Virus (10^7 pfu) überflutet wurde und da nie alle viralen Partikel eine Zellen infizieren (siehe 3.2.1.1.10, Kerr et al, 2006), vermehrt sich nur ein Bruchteil der input-Virusmenge, was dann bei der Gesamtmenge nicht ins Gewicht fällt. Des Weiteren hat das Virus nur einen kurzen Zeitraum von 7-10 Tagen für seine Vermehrung zur Verfügung, bis es zur Neutralisation durch antivirale Antikörper kommt. 5 dpi war die Lyse des Tumors nach i.c.-Infektion bereits weit fortgeschritten, was bedeutet, dass fast keine Zielzellen für H-1PV mehr vorhanden waren. Folglich verwundert es nicht, dass ab dann bei diesen Tieren kein Unterschied in der Menge an infektiösen Viren zwischen tumortragenden und tumorfreien Tieren gezeigt werden konnte.

Nach i.v.-Infektion hingegen war bis zu 5 dpi ein deutlicher Unterschied der Virusmenge zwischen tumortragenden und tumorfreien Tieren im Gehirn zu erkennen. Hier wurde das Virus nicht direkt ins Gehirn injiziert, wodurch die Daten dieser Tiere einen unverfälschten (ohne input-Virus) Überblick über die Virusmenge im Gehirn geben. Bis zu 3 dpi bleibt die im Tumor angekommene Virusmenge bei diesen Tieren fast stabil, obwohl stetig Virus über die Blutbahn aus dem Gehirn transportiert wird. Anschließend nimmt die Menge infektiöser Viren ab. Somit ist eine zeitlich begrenzte Vermehrung des Virus im Tumor sehr wahrscheinlich. Passend dazu war nach 5 Tagen die Virusmenge nach i.v.-Infektion bei tumortragenden Tieren - nach der von vornherein weniger Virus im Gehirn ankommt im Vergleich mit der i.c.-Infektion – fast genauso groß, wie nach i.c.-Infektion in den contralateralen Hemisphären.

Die Daten aus den analysierten Lebergeweben unterstützen zumindest die Theorie der Tumorpräferenz von H-1PV. Die Menge infektiöser Viren in der Leber von tumortragenden Tieren immer geringer, als bei nicht-tumortragenden Tieren.

Nach i.n.-Infektion konnte auch nur eine Abnahme der viralen Partikel im Gehirn über die Zeit gezeigt werden. Hier wurden jedoch nur 2 Zeitpunkte (1 und 5 dpi) untersucht, wobei jedoch mittels Hybridisierung mit Gehirnproben behandelter Zellen gezeigt wurde, dass die Menge viraler DNA bei tumortragenden RNU-Ratten immer größer war, als bei tumorfreien RNU-Ratten. Für i.n.-infizierte Wistar-Ratten konnte eine Konzentration von H-1PV im Tumorgebiet nachgewiesen werden (Abbildung 24).

Alle Ergebnisse zur Anwendung von H-1PV *in vivo* im Rattenmodell deuten darauf hin, dass das Virus für eine sichere und einfach durchzuführende onkolytische Virotherapie beim Menschen geeignet ist. Bis zum Start einer antiviralen Immunantwort kann das Virus höchst wahrscheinlich im Tumor vermehrt werden und die restliche Tumormasse infizieren. Danach könnte das Immunsystem durch die vom Virus lysierten Tumorzellen die restlichen Tumorzellen als „fremd“ erkennen und effektiv bekämpfen. Des Weiteren könnte sich eine Art Immungedächtnis gegen wiederkehrende Tumorzellen dieser Art bilden, was die Entstehung eines neuen Tumors aus den Vorläuferzellen verhindern könnte, selbst, wenn die Stammzellpopulation nicht vollständig permeabel für H-1PV wäre. Wobei erste Versuche mit H-1PV in Glioblastom- und Neuroblastom-Stammzellen jedoch zeigten, dass diese zumindest permissiv für H-1PV sind. Hier wurde jedoch eher ein zytostatischer als ein zytotoxischer Effekt vermutet (Kern, 2010).

4.2 Effizienzsteigerung von H-1PV *in vivo*

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Versuche zur Effizienzsteigerung von H-1PV durchgeführt. Hierbei war die Verbesserung der Replikationsfähigkeit in humanen Glioblastomzelllinien das Ziel. H-1PV wurde über 22 Passagen an die humane Glioblastomzelllinie NCH149 adaptiert. Dieser Anpassungsschritt ging mit einer vermehrten Replikation im Vergleich mit dem Wildtyp in dieser Zelllinie einher (J. P. F. Nüesch, unveröffentlichte Daten). Nach 21 Passagen wurden bereits einige Experimente mit der adaptierten Virussuspension durchgeführt. Mittels Western Blot-Analyse konnte eine große Heterogenität bei der Detektion des NS-1-Proteins gezeigt werden. Weiterhin konnten bereits ein verändertes Phosphorylierungsmuster und eine erhöhte Replikationsfähigkeit in den Zelllinien NCH37, NCH82 und NCH89 festgestellt werden (J. P. F. Nüesch, persönliche Mitteilung). Aus dem Virusstock nach Passage 22 wurden daraufhin mittels Plaque Selektion 14 Einzelplaques zufällig ausgewählt, neue Virenstocks auf NCH149 produziert und diese anschließend charakterisiert. Hierbei konnten nur aus 9 Plaques infektiöse Viren produziert

werden, bei den anderen fünf verlief die Infektion abortiv. Bei der Charakterisierung der neun adaptierten Klone konnte nachgewiesen werden, dass alle effizienter humane Glioblastomzellen lysierten und darin stärker propagiert wurden. Diese verbesserten Eigenschaften waren nicht mit einer erhöhten Toxizität für nicht transformierte Zelllinien verbunden. Einzig bei den kindlichen Astrozyten konnte eine erhöhte Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Vergleich mit der Kontrolle gezeigt werden, was damit zusammenhängen könnte, dass diese Zellen mit Wachstumsfaktoren (AGS) stimuliert wurden und somit eine erhöhte Teilungsrate aufwiesen, was die Zellen für eine lytische Infektion mit H-1PV sensitiviert haben könnte.

Beim Vergleich der Klone untereinander, waren alle Klone in ihren Eigenschaften unterschiedlich ausgeprägt. Es gab deutliche Unterschiede zwischen der Replikation und der Zytotoxizität. Zum Beispiel zeigten die Klone 5, 8, 10 und 13 für die Zelllinie U87 die stärkste Zytotoxizität, während die DNA-Replikation in dieser Zelllinie bei den Klonen 3, 8, 10 und 13 am schnellsten und am stärksten war. Die Zytotoxizität der getesteten Virusklone war jedoch im Vergleich mit dem Wildtyp bei allen humanen Glioblastomzelllinien größer. Ebenso wurden die adaptierten Virusklone von den humanen Zelllinien 2,2 – 1000-fach besser als H-1PV vermehrt. Die Adaptierung führte jedoch wie erwartet bei allen Klonen dazu, dass sie weniger effizient die Ratten-Gliomzelllinie RG2 töteten und dort repliziert wurden (vgl. Abbildung 37, Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41). Dies deutet darauf hin, dass durch den Anpassungsprozess genetische Veränderungen aufgetreten sind, die bei der Untersuchung der DNA-Sequenzen der adaptierten Einzelklone im Vergleich mit der Sequenz des H-1PV-Wildtyp-Genoms gezeigt werden konnten (Abbildung 42).

Eine Deletion von 27 AS trat bei acht der adaptierten Einzelklone im kodierenden Bereich für die NS-Proteine auf. Bei der mehrfachen Sequenzierung von Klon 13 traten zwei andere Deletionsvarianten von 35 und 129 nt im gleichen Genombereich auf. Die variablen Deletionen in diesem Bereich könnten im Zusammenhang mit der erhöhten Replikationsfähigkeit der Klone in humanen Glioblastomzellen stehen, allerdings zeigte die von S. Faisst entdeckte Variante mit einer Deletion in der gleichen Region keine verbesserten Eigenschaften im Vergleich mit dem Wildtyp auf NBE-Zellen (Faisst et al, 1995). Dies kann jedoch durch den nicht vorhandenen Selektionsdruck für H-1PV in NBE bzw. NBK-Zellen erklärt werden, da das Wildtyp H-1PV schon seit Jahrzehnten in dieser Zelllinie produziert wird und daher an diese unbewusst adaptiert wurde. In dieser Arbeit konnte dann auch gezeigt werden, dass die adaptierten Virusklone und das Wildtypvirus in NBK-Zellen gleich effizient zur Zelllyse geführt haben (Tabelle 18, Abbildung 41). Weitere Untersuchungen der

Deletionsvariante von S. Faisst zeigten jedoch eine verbesserte Infektiosität in verschiedenen anderen humanen transformierten Zelllinien wie HeLa und Pankreaskarzinomzellen (Weiß, 2010). Da alle hier analysierten adaptierten Klone eine Deletion in dieser Region hatten, scheinen dort bevorzugt Mutationen/Deletionen aufzutreten. Dabei scheint es jedoch keine Rolle zu spielen, wo genau die Deletion liegt bzw. wie groß diese ist, da auch Klon 13 mit einer anderen Deletion im gleichen Bereich eine verbesserte Replikation und Zytotoxizität in den humanen Glioblastomzellen zeigte. Des Weiteren könnten diese Deletionen einen Einfluss auf die Stimulation des p38-Promotors haben, da sie im gleichen Bereich liegen, wie die Transaktivierungsdomäne von NS1. Andere Veränderungen wurden im Kapsidbereich nachgewiesen, die mit einer verbesserten Infektiosität und einem Wirtswechsel in Zusammenhang stehen könnten (Agbandje-McKenna, 2006). Tatsächlich zeigte sich eine verbesserte Infektionseffizienz vor allem bei den Klonen 3, 5 und 13 im Vergleich mit dem Wildtyp bei U87-Zellen (Tabelle 22). Alle diese Klone zeigten Mutationen im Kapsidbereich, wobei Klon 8, der bei der Infektionseffizienz schwächer als die anderen Klone war, hier die gleichen Veränderungen zeigte wie Klon 13. Weitere Veränderungen konnten im nicht-kodierenden Bereich des Genoms nachgewiesen werden. Über die Bereiche der *hairpin*-Strukturen kann hier keine Aussage gemacht werden, da im Rahmen dieser Arbeit das Genom nur von 120 – 5000 nt sequenziert wurde. Über den Einfluss der gezeigten genetischen Veränderungen auf die Funktion der Proteine, bzw. die Funktion des ganzen Virus kann nur spekuliert werden, da nicht untersucht wurde, ob die Mutationen eine Änderung auf RNA- oder Proteinebene verursachen.

Bei der Untersuchung der Geschwindigkeit des Anpassungsprozesses konnte gezeigt werden, dass die Mutationen alle erst zu einem späten Zeitpunkt des Adaptierungsprozesses auftraten. Erst ab Passage 20 nahm die Häufigkeit der aufgetretenen Veränderungen stark zu, während in den früheren untersuchten Passagen gar keine Veränderungen im Vergleich mit dem Wildtypgenom auftraten. Dies bedeutet, dass die Mutationsrate von H-1PV offenbar nicht sehr hoch ist. Auffällig ist hier jedoch, dass alle adaptierten Virusklone die beschriebenen Deletionen im NS-Genombereich zeigten, was bei der langsamen Mutationsgeschwindigkeit und der mittels qRT-PCR ermittelten großen Menge an Wildtypgenomen in den einzelnen Passagen bis zum Ende des Adaptierungsprozesses (Abbildung 44), nicht zu erwarten war. Hier liegt die Vermutung nahe, dass bei der Plaque-Selektion auf NBK-Zellen von 14 Plaques nur die neun ausgewählt wurden, die sich anschließend in NCH149 Zellen vermehren konnten. Die anderen fünf Infektionen führten auf diesen Zellen zu keinem CPE und wurden daher nicht analysiert. Hierbei könnte es sich um Wildtyp H-1PV Viren gehandelt haben, die

in NBK-Zellen Plaques verursache, aber nicht in NCH149 Zellen repliziert werden. Somit trugen von 14 adaptierten Klonen tatsächlich nur 65 % und nicht 100 % die Deletion (und eventuell die anderen Mutationen) und setzten sich vermutlich damit durch. Die große Menge an Wildtyp H-1PV in Passage 22 des Anpassungsprozesses könnte auch erklären, warum bei ersten Versuchen in Glioblastom- und Neuroblastom-Stammzellen gegenüber dem Wildtyp keine verbesserte Effizienz mit dieser Virussuspension gezeigt werden konnte (S. Kern, 2010). Eine Wiederholung dieser Experimente mit den adaptierten Einzelklonen könnte hier möglicherweise auch eine verbesserte Effizienz der adaptierten Klone zeigen.

Ein Problem bei der Untersuchung der adaptierten Virusklone ist, dass alle *in vitro* oder *in vivo* produzierten Virussuspensionen aus Mischungen viraler Einzelklone bestehen (Gottschalk et al 1991, 1994; Gao et al, 2003). Hierbei ist nicht klar wie und mit welcher Geschwindigkeit die Variationen auftreten. Gerade die Einzelstrang-DNA Viren haben auf Grund ihrer Genomorganisation keine „Sicherungskopie“ ihres Genoms und sind daher prädestiniert zur Anhäufung und Weitergabe von genetischen Veränderungen. Des Weiteren treten bei der Propagierung von Viren inter- und intramolekulare Rekombination (Pseudotypen) auf. Diese werden nur toleriert, wenn sie zu einer stillen Mutation führen (AS-Sequenz bleibt erhalten) oder wenn sie einen Vorteil bei der Vermehrung des Virus mit sich bringen (Kerr et al, 2006). Die Kombination unterschiedlicher Virusgenome mit verschiedenen Kapsidsubtypen kann zum einen dazu führen, dass verschiedene genetische Alterationen auftauchen und wieder verschwinden, und zum anderen, dass nach der Infektion der selben Zelle mit mehreren viralen Partikeln neue Kombinationen von Mutationen im Genom entstehen, bis sich am Ende einige erfolgreiche Mutationen durchsetzen.

Manche Laborvirusstämme sind durch die Produktion in Zelllinien über Jahre an diese angepasst worden, was auch bei dem hier verwendeten Virus H-1PV auf NBK-Zellen der Fall sein dürfte. (Hier wäre es interessant die genetische Sequenz von H-1PV gegen alte Isolate aus den 60er Jahren abzugleichen) Eine hohe Variation ist jedoch immer an einen bestimmten Selektionsdruck und eine hohe Replikationsrate gekoppelt (Studien über CPV (Badgett et al, 2002)). Wie hier gezeigt, nahm die virale Replikation gegen Ende des Anpassungsprozesses von H-1PV an die humane Glioblastom-Zelllinie NCH149 stark zu, was dann zum vermehrten Auftreten von Mutationen im Genom geführt haben könnte (Tabelle 21). Somit könnte auch bei der Produktion der neun Virusklonsuspensionen aus der Plaque-Selektionierung von Passage 22 eine Virusmischsuspension entstanden sein, wodurch nicht sicher ist, dass die hier produzierten einmal plaque-selektierten Klone tatsächlich genetisch homogen waren.

Um genauer zu charakterisieren, welche spontan aufgetretenen genetischen Veränderungen für die größere Effizienz der Viren in humanen Glioblastomzelllinien verantwortlich waren, und um homogene Virusstocks zu erhalten ist es notwendig, infektiöse Klone mit unterschiedlichen Einzelmutationen und Kombinationen der aufgetretenen Veränderungen durch Klonierung zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Experimente mit einem rekombinanten Klon 3 durchgeführt werden. Dieser rekombinante Klon enthielt die Deletion im NS-Bereich und 3 der Veränderungen in der Kapsidregion (Mutationen 14, 15 & 16). Dieser Klon verhielt sich bei der *in vitro*-Testung ähnlich wie der ursprüngliche Klon 3, womit gezeigt werden konnte, dass die Mutationen im kodierenden Bereich ausreichend waren, um den neuen Phänotyp hervorzurufen. Weitere Versuche mit rekombinanten Viren, die nur einzelne oder verschiedene Kombinationen der aufgetretenen Mutationen enthalten, sind geplant und sollen Aufschluss darüber geben, welche Veränderungen genau verantwortlich für die verbesserte Effizienz der Klone sind.

Zusätzlich konnte die Effizienz zweier Klone *in vivo* untersucht werden. Hierbei stellte sich heraus, dass Klon 3 das Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen stark verlangsamte sowie die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere signifikant verlängerte im Vergleich mit dem Wildtyp. Im Gegensatz dazu konnte mit Klon 8 keine Verbesserung erzielt werden, was dadurch zu erklären ist, dass die Produktion dieses Klons, wie durch Sequenzierung gezeigt (vgl. 3.2.2.4), nur unvollständige Viren hervorgebracht hat. Interessanterweise unterschied sich auch der für die Tierversuche produzierte Klon 3 vom ursprünglich sequenzierten Klon 3, der mehrere genomische Veränderungen zeigte. Dies verdeutlicht erneut, dass bei der Virusproduktion eine genetische Vielfalt entstehen kann (s.o.). Jedoch konnte dadurch näher eingegrenzt werden, welche Veränderungen notwendig für die bessere Effizienz der Klone waren. Der im Tierversuch verwendete Virusklon hatte nur die Deletion im NS-Bereich und eine Insertion von 19 AS bei Nukleotid 4828. Diese Insertion liegt jedoch im nicht-kodierenden Bereich des Genoms von H-1PV und ist daher wahrscheinlich nicht für den neuen Phänotyp entscheidend, was durch die Versuche mit dem rekombinanten Klon 3 gezeigt werden konnte. Somit ist es wahrscheinlich, dass die verbesserte Zytotoxizität der adaptierten Klone mit der Deletion im NS-Bereich zusammenhängt, was aber durch die Analyse der Proteine und ihrer Eigenschaften noch genauer untersucht werden muss.

Diese Ergebnisse zeigen, dass H-1PV in der Lage ist, sich effektiv an andere Wirtszellen anzupassen, ohne eine erhöhte Zytotoxizität für nicht transformierte Zellen zu entwickeln. Dies eröffnet die Möglichkeit weiterer Anpassungsexperimente mit anderen Krebsentitäten. Die gesteigerte Effizienz in humanen Glioblastomzellen, vor allem *in vivo*, sollte zunächst jedoch in einem orthotopen Tiermodell erneut untersucht werden. Solche Versuche können allerdings, auf Grund des humanen Tumormodells, nicht im immunkompetenten Tier durchgeführt werden; somit fehlt dort möglicherweise der bei der Tumorregression unterstützende Effekt des Immunsystems. Dies könnte jedoch durch eine erhöhte Effizienz der adaptierten Viren ausgeglichen werden.

Die bisher erhaltenen Daten zeigen jedoch, dass eine Anwendung in klinischen Studien mit gezielt adaptierten Parvoviren (H-1PV) vielversprechend sein könnte und dadurch eine größere onkolytische Aktivität erreichbar ist.

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen eindrucksvoll die Möglichkeiten, die H-1PV in der Tumorthherapie beim Menschen haben könnte. H-1PV kann einfach und sicher verabreicht werden und scheint genetisch relativ stabil zu sein. Es kann aber trotzdem gezielt effizient adaptiert werden, ohne seine Onkoselektivität zu verlieren.

Im Zuge der klinischen Studie Phase I/IIa mit H-1PV sollten die Replikation und die Ausscheidung von H-1PV im Menschen analysiert werden. Hierfür konnten die gezeigten Ergebnisse aus dem Tiermodell erste Anhaltspunkte liefern. Weiterhin ist die Untersuchung des natürlichen primären Replikations-Reservoir für H-1PV in der Ratte interessant, da dieses Reservoir eventuell auch im Menschen für die Virusproduktion vorhanden sein könnte.

Die Adaptierungsversuche zeigen, dass H-1PV gezielt verändert werden kann, um eine verbesserte Replikation und größere Zytotoxizität in transformierten Zellen zu erreichen. Im Zuge dieser Arbeit konnten nur erste *in vivo* Versuche mit den adaptierten Virusklonen im Tiermodell durchgeführt werden. Die erhaltenen Hinweise für eine verbesserte Behandlungseffizienz mit den adaptierten Virusklonen sollten wiederholt bestätigt werden. Hierbei empfiehlt sich die Anwendung eines orthotopen Glioblastommodells, welches eine große Ähnlichkeit mit den beim Menschen auftretenden Glioblastomen zeigt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben würde sich hierfür das Hundemodell hervorragend eignen.

Bei den hier adaptierten Virusklonen sollte, wie bereits erwähnt, genauer analysiert werden, welche genetischen Veränderungen zu der beobachteten Effizienzsteigerung geführt haben. Die Analyse der Proteine mittels Western Blot könnte hier weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen der genetischen Veränderungen geben. Weiterhin erscheint es lohnend die Anpassungsversuche auch auf andere Krebsentitäten auszuweiten, um deren Behandlung zu optimieren, bzw. diese erst zugänglich für die onkolytische Virotherapie mit H-1PV zu machen.

5 Literatur

- Abu-Diab, M. Azzeh, R. Ghneim, R. Ghneim, M. Zoughbi, S Turkuman, N. Rishmawi, A-El-R Issa, I. Siriani, R Dauodi, R. Kattan, M.Y. Hindiyeh (2008), Comparison between pernasal flocked swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children, *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 2414-2417
- P. S. Adusumilli, B. M. Stiles, M-K Chan, T-C Chou, R. J. Wong, V. W. Rusch, Y. Fong (2005), Radiation Therapy Potentiates Effective Oncolytic Viral Therapy in the Treatment of Lung Cancer, *The Annals of Thoracic Surgery*, 80: 409-417
- M. Agbandje-McKenna , A. L. Llamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall, M. G. Rossmann (1998), Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice, *Structure*, 6: 1369-1381
- M. Agbandje-McKenna & M. S. Chapman (2006), Correlating structure with function in the viral capsid, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London
- M. Aghi, R. L. Martuza (2005), Oncolytic viral therapies – the clinical experience, *Oncogene*, 24: 7802-7816
- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2008), *Molecular Biology of the cell*, 5th edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York
- M. Alkassar, B. Gärtner, K. Roemer, I. Haeckel, J. Rommelaere, P. Lipp, N. Graf (2011), The combined effects of oncolytic reovirus *plus* Newcastle-Disease virus and reovirus *plus* parvovirus on glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Neurooncology*, Epub ahead of print
- A. L. Angelova, M. Aprahamian, G. Balboni, H. J. Delecluse, R. Feederle, I. Kiprianova, S. P. Grekova, A. S. Galabov, M. Witzens-Harig, A. D. Ho, J. Rommelaere, Z. Raykov (2009a), Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: In vitro and in vivo studies, *Molekular Therapy*, 17: 1164-1172.
- A. L. Angelova, M. Aprahamian M, S. P. Grekova, A. Hajri, B. Leuchs, N. A. Giese, C. Dinsart, A. Herrmann, G. Balboni, J. Rommelaere, Z. Raykov (2009b), Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV, *Clinical Cancer Research*, 15: 511-519
- F. Anouja, R. Wattiez, S. Mousset, P. Caillet-Fauquet (1997), The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins, *Journal of Virology*, 71: 4671-4678
- M. R. Badgett, A. Auer, L. E. Carmichael, C. R. Parrish, J. J. Bull (2002), Evolutionary dynamics of viral attenuation, *Journal of Virology*, 76: 10524-10529
- S. Bär, L. Daeffler, J. Rommelaere, J. P. F. Nuesch (2008), Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning, *Public Library of Science Pathogens*, 4: 1-11
- L. J. Ball-Goodrich, F. X. Paturzo, E. A. Johnson, K. Steger, R. O. Jacoby (2002), Immune responses to the major capsid protein during Parvovirus infection of rats, *Journal of Virology*, 76: 10044–10049
- C. Barcia Jr, A. Gómez, J. M. Gallego-Sanchez, A. Perez-Vallés, M. G. Castro, P. R. Lowenstein, C. Barcia Sr, M.-T. Herrero (2009), Infiltrating CTLs in human Glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells, *The American Journal of Pathology*, 175: 786-798
- R. F. Barth (1998), Rat brain tumor models in experimental neuro-ocology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas, *Journal of Neuro-Oncology*, 36: 91-102

- T. Bashir, R. Horlein, J. Rommelaere, K. Willwand (2000), Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 5522-5527
- L. R. Bass & F. M. Hetrick (1978), Human lymphoblastoid cells as hosts for parvoviruses H-1 and rat virus, *Journal of Virology*, 25: 486-490
- K. Beal, L. E. Abrey, P. H. Gutin (2011), Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: analysis of single-agent and combined modality approaches, *Radiation Oncology*, 6: 1-15
- B. Becher, I. Bechmann, M. Greter (2006), Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain, *Journal of Molecular Medicine*, 84: 532-543
- K. I. Berns (1990), Parvovirus Replication, *Microbiological Reviews*, 54: 316-329
- H. R. Bierman, D. M. Crile, K. H. Kelly, N. L. Petrakis, L. P. White, M. B. Shimkin (1953), Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia, *Cancer*, 6: 591-605
- O. Bonin (1973), *Quantitativ-virologische Methodik – Eine Einführung*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- A. Bostanci (2002), Gene therapy. Blood test flags agent in death of Penn subject, *Science*, 295: 604-605
- A. Brandenburger, D. Legendre, B. Avalosse, J. Rommelaere (1990), NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp, *Virology*, 174:576-584.
- B. W. Bridle, S. Hanson, B. D. Lichty (2010), Combining oncolytic virotherapy and tumor vaccination, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: 143-148
- K. Brockhaus, S Plaza, D. J. Pintel, J. Rommelaere, N. Salome (1996), Nonstructural proteins NS2 of Minute Virus of Mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members, *Journal of Virology*, 70: 7527-7534
- E. C. Burton, M. D. Prados (2000), Malignant Gliomas, *Current Treatment Options in Oncology*, 1: 459-468
- P. Caillet Fauquet, M. Perros, A. Brandenburger, P. Spegelaere, J. Rommelaere (1990), Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins, *EMBO Journal*, 9: 2989-2995
- M. Candolfi, J. F. Curtin, W. S. Nichols, AKM. G. Muhammad, G D. King, G. E. Pluhar, E. A. McNiel, J. R. Ohlfest, A. B. Freese, P. F. Moore, J. Lerner, P. R. Lowenstein, M. G. Castro (2007), Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression, *Journal of Neurooncology*, 85: 133-148
- CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States, 2007-2008, Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report Supplement 2004
- A. Cetin, S. Komai, M. Eliava, P. H. Seeburg, P. Osten (2006), Stereotaxic gene delivery in the rodent brain, *Nature Protocols*, 1: 3166-3173
- Y. Q. Chen, F. De Foresta, J. Hertoghs, B. L. Avalosse, J. J. Cornelis, J. Rommelaere (1986), Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1, *Cancer Research*, 46: 3574-3579
- E. A. Chiocca (2002), Oncolytic viruses, *Nature Reviews*, 2: 938-951
- J. Christensen, S. F. Cotmore, P. Tattersall (2001), Minute Virus of Mice initiator protein NS1 and a host KDWK family transcription factor must form a precise ternary complex with origin DNA for nicking to occur, *JOURNAL OF VIROLOGY*, 75: 7009-7017

- J. Christensen, P. Tattersall (2002), Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system, *Journal of Virology*, 76: 6518–6531
- G. Cichon, S. Boeckh-Herwig, H. H. Schmidt, E. Wehnes, T. Müller, P. Pring-Akerblom, R. Burger (2001), Complement activation by recombinant adenoviruses, *Gene Therapy*, 8: 1794-1800
- A. Claes, A. J. Idema, P. Wesseling (2007), Diffuse glioma growth: a guerrilla war, *Acta Neuropathologica*, 114: 443-458
- R. Corbau, V. Duverger, J. Rommelaere, J. P. F. Nüesch (2000), Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects, *Virology*, 278: 151-167
- J. J. Cornelis, Y. Q. Chen, N. Spruyt, N. Duponchel, S. F. Cotmore, P. Tattersall, J. Rommelaere (1990), Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription, *Journal of virology*, 64: 2537-2544
- J. J. Cornelis, L. Deleu, U. Koch, J. Rommelaere (2006), Parvovirus oncosuppression, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (1986), The NS-1 polypeptide of autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein, *Virus Research*, 4: 243-250
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (1989), A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles, *Journal of Virology*, 63: 3902-3911
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (1994), An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication, *The EMBO Journal*, 13: 4145-4152
- S. F. Cotmore, J. Christensen, J. P. Nüesch, P. Tattersall (1995), The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃, *Journal of Virology*, 69: 1652-1660
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (2005), Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes, *Virology*, 336: 100-112
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (2006), Structure and organization of the viral genome, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London
- S. F. Cotmore, P. Tattersall (2007), Parvoviral host range and cell entry mechanisms, *Advanced Virus Research*, 70: 183-232
- C. Cziepluch, S. Lampel, A. Grewenig, C. Grund, P. Lichter, J. Rommelaere (2000), H-1 Parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure, *Journal of Virology*, 74: 4807-4815
- L. Daeffler, R. Hörlein, J. Rommelaere, J. P. F. Nüesch (2003), Modulation of Minute Virus of Mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region, *Journal of Virology*, 77: 12466–12478
- A. Daga, C. Bottino, R. Castriconi, R. Gangemi, S. Ferrini (2011), New Perspectives in Glioma Immunotherapy, *Current Pharmaceutical Design*, [Epub ahead of print]
- R. Dahl, N. Mygind (1998), Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29: 3-12
- L. Deleu, F. Fuks, D. Spitkovsky, R. Hörlein, S. Faisst, J. Rommelaere (1998), Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells, *Molecular Cell Biology*, 18: 409-419

- L. Deleu, A. Pujol, S. Faisst, J. Rommelaere (1999), Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice at early S phase s required for productive infection, *Journal of Virology*, 73: 3877–3885
- V. De Noble, D. Robbins, M. Caplan (2007), Brief Communication, A technique for facilitating visualization of skull sutures in the rat, *Physiology and Behavior*, 11: 739-742
- N. De Silva, H. Atkins, D. H. Kim, J. C. Bell, C. J. Breitbach (2010), Double trouble for tumours: exploiting the tumor microenvironment to enhance anticancer effect of oncolytic viruses, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: 135-141
- M. Di Piazza, C. Mader, K. Geletneky, M. Herrero Y Calle, E. Weber, J. Schlehofer, L. Deleu, J. Rommelaere (2007), Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells, *Journal of Virology*, 81: 4186-4198
- M. Dobbstein (2003), Viruses in therapy – royal road or dead end?, *Virus Research*, 92: 219-221
- T. Dupressoir, J-M Vanacker, J. J. Cornelis, N. Duponchel, J. Rommelaere (1989), Inhibition by Parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies *in vitro* by transformed human mammary epithelial cells, *Cancer Research*, 49: 3203-3208
- G. P. Dunn, I. F. Dunn, W. T. Curry (2007), Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma, *Cancer Immunity*, 7: 12-23
- D. Ebert (2008), Experimental Evolution of Parasites, *Science*, 282: 1432-1435
- V. Eichwald, L. Daeffler, M. Klein, J. Rommelaere, N. Salome (2002), The NS2 proteins of parvovirus Minute Virus of Mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells, *Journal of Virology*, 76: 10307–10319
- M. Enderlin, E. V. Kleinmann, S. Struyf, C. Buracchi, A. Vecchi, R. Kinscherf, F. Kiessling, S. Paschek, S. Sozzani, J. Rommelaere, J. J. Cornelis, J. van Damme, C. Dinsart (2009), TNF- α and the IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma, *Cancer Gene Therapy*, 16: 149-160
- B. Everts, H. G. van der Poel (2005), Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer, *Cancer Gene Therapy*, 12: 141–161
- P. Fagiolino, M. Vázquez, R. Eiraldi, C. Maldonado, A. Scaramelli (2011), Influence of efflux transporters on drug metabolism Theoretical approach for bioavailability and clearance prediction, *Clinical Pharmacokinetics*, 50: 75-80
- S. Faisst, J. R. Schlehofer, H. zur Hausen (1989), Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation, *Journal of Virology*, 63: 2152-2158
- S. Faisst, S. Bartnitzke, J. R. Schlehofer, H. zur Hausen (1990), Persistence of parvovirus H-1 DNA in human B- and T-lymphoma cells, *Virus Research*, 16: 211-224
- S. Faisst, S. R. Faisst, T. Dupressoir, S. Plaza, A. Pujol, J-C. Jauniaux, S. L. Rhode, J. Rommelaere (1995), Isolation of fully infectious variant of Parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells, *Journal of Virology*, 69: 4538-4543
- S. Faisst, D. Guittard, A. Benner, J. Y. Cesbron, J. R. Schlehofer, J. Rommelaere, T. Dupressoir, (1998), Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection, *International Journal of Cancer*, 75: 584-589
- E. I. Fomchenko, E. C. Holland (2006), Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials, *Clinical Cancer Research*, 12: 5288-5293
- D. J. Gaertner, A. L. Smith, R. O. Jacoby (1996), Efficient induction of persistent and prenatal parvovirus infection in rats , *Virus Research*, 44: 67-78

- G. Gao M. R. Alvira, S. Somanathan, Y. Lu, L. H. Vandenberghe, J. J. Rux, R. Calcedo, J. Sanmiguel, Z. Abbas, J. M. Wilson (2003), Adenoassociated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100: 6081-6086
- K. Geletneky, A. D. Hartkopf, R. Krempien, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer (2010), Improved killing of human high-grade glioma cells by combining ionizing radiation with oncolytic Parvovirus H-1 infection, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2010: 1-9
- K. Geletneky, I Kiprianova, A. Ayache, R. Koch, M Herrero y Calle, L. Deleu, C. Sommer, N. Thomas, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer (2010), Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic Parvovirus H-1 in rat models, *Neuro Oncology*,
- A. Giese, M. Westphal (2001), Treatment of malignant glioma: a problem beyond the margins of resection, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127: 217-225
- L. M. Gil-Carcedo, L. A. Vallejo, E. Gil-Carcedo (2000), Structure of the principal olfactory tract, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 122:129-38
- E. Gottschalk, S. Alexandersen, A. Cohn, L. A. Poulsen, M. E. Bloom, B. Aasted (1991), Nucleotide sequence analysis of Aleutian mink disease parvovirus shows that multiple virus types are present in infected mink, *Journal of Virology*, 65: 4378-4386
- E. Gottschalk, S. Alexandersen, T. Storgaard, M. E. Bloom, B. Aasted (1994), Sequence comparison of the non-structural genes of four different types of Aleutian mink disease parvovirus indicates an unusual degree of variability, *Archives of Virology* 138: 213-231
- J. J. Graber, S. Dhib-Jalbut (2009), Protective autoimmunity in the nervous system, *Pharmacology & Therapeutics*, 121: 147-159
- S. Grekova, M. Aprahamian, N. Giese, S. Schmitt, T. Giese, C. S. Falk, L. Daeffler, C. Cziepluch, J. Rommelaere, Z. Raykov (2011), Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent, *Cancer Biology & Therapy*, 10: 1280-1289
- S. A. Grossman, X. Ye, S. Piantadosi, S. Desideri, L. B. Nabors, M. Rosenfeld, J. Fisher (2010), Survival of Patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and Temozolomide on research studies in the United States, *Clinical Cancer Research*, 15: 2443-2449
- E. Guetta, Y. Graziani, J. Tal (1986), Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice, *Journal of the National Cancer Institute*, 76: 1177-1180
- S. Guglielmino, G. Tempera, G. Pappalardo, A. Castro (1978), H-1 and X14 parvovirus antibodies in women with abortions or still-births, *Acta Virology*, 22: 426-428.
- A. Haag, P. Menten, J van Damme, C. Dinsart, J. Rommelaere, J. J. Cornelis (2000), Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice, *Human Gene Therapy*, 11: 597-609
- A. Haag, K. Wayss, J. Rommelaere, J. J. Cornelis (2000), Experimentally induced infection with autonomous parvoviruses, Minute Virus of Mice and H-1, in the African multimammate mouse (*Mastomys coucha*), *Comparativen Medicine*, 50: 613-621
- C. Hallauer, G. Siegl, G. Kronauer (1972), Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines – III. Biological properties of the isolated viruses, *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 38: 366-382

- A. Hartkopf (2007), Onkolytische H-1 Parvoviren in Kombination mit ionisierender Strahlung: Untersuchung zytotoxischer Effekte in Zellkulturen humaner Glioblastome, Inauguraldissertation der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- A. Haseley, C. Alvarez-Breckenridge, A. R. Chaudhury, B. Kaur (2009), Advances in oncolytic virus therapy for glioma, *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 4: 1-13
- J. Hatina, W. A. Schulz, J. Fischer, J. Wahl, K.-M. Debatin, C. Beltinger (2007), Tumorstammzellen – ein neues Konzept in der Tumorbilogie, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132: 1629-1632
- T. W. Hermiston, I. Kuhn (2002), Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes, *Cancer Gene Therapy*, 9: 1022-1035
- M. Herrero Y Calle, J. J. Cornelis, C. Herold-Mende, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer, K. Geletneky (2004), Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing, *International Journal of Cancer*, 109: 76-84
- G. Hristov, M. Krämer, J. Li, N. El-Andaloussi, R. Mora, L. Daeffler, H. Zentgraf, J. Rommelaere, A. Marchini (2010), Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species, *Journal of Virology*, 84: 5909-5922
- K. Hueffer, U. Truyen U, C. R. Parrish (2004), Evolution and host variation of the canine parvovirus: molecular basis for the development of a new virus, *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift*, 117: 130-135
- J. A. King, R. Dubielzig, D. Grimm, J. A. Kleinschmidt (2001), DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into performed capsids
- G. Iacob, E. B. Dinca (2009), Current data and strategy in glioblastoma multiforme, *Journal of Medicine and Life*, 2: 386-393.
- R. O. Jacoby, L. J. Ball-Goodrich, D. G. Besselsen, M. D. McKisic, L. K. Riley, A. L. Smith (1996), Rodent parvovirus infections, *American Association for Laboratory Animal Science*, 46: 370-380
- R. O. Jacoby, E. A. Johnson, F. X. Paturzo, L. Ball-Goodrich (2000), Persistent Rat Virus infection in smooth muscle of euthymic and athymic rats, *Journal of Virology*, 74: 11841-11848
- R. O. Jacoby, L. Ball-Goodrich, F. X. Paturzo, E. A. Johnson (2001), Prevalence of Rat Virus infection in progeny of acutely or persistently infected pregnant rats, *Comparative Medicine*, 51: 38-42
- L. M. Janus, M. Mähler, W. Köhl, A. Smoczek, H. J. Hedrich, A. Bleich (2008), Minute virus of mice: antibody response, viral shedding, and persistence of viral DNA in multiple strains of mice, *Comparative Medicine*, 58: 360-368
- Jindal HK, Yong CB, Wilson GM, Tam P, Astell CR (1994), Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions, *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 3283-3289
- E. Kelly, S. J. Russel (2007), History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering, *Molecular Therapy*, 15: 651–659
- S. Kern (2010), Evaluation of the oncolytic effects of parvovirus H-1 on tumor-iniciating cells, Masterthesis, Masterprogram of Molecular Medicine, Faculty of medicine of Ulm University
- J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, C. R. Parrish (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, member oft he Hodder Headline Group, London
- I. Kiprianova, N. Thomas, A. Ayache, M. Fischer, B. Leuchs, M. Klein, J. Rommelaere, J.R. Schlehofer (2011), Regression of glioma in rat models by intra nasal application of Parvovirus H-1, *Clinical Cancer Research*,

- P. Kleihues (2007), Klassifikation, Grading und genetisches Profil der Gliome, *Onkologie* 5 / 2007
- J. R. Kongsvik, J. F. Gierthy, S. L. Rhode, III (1974), Replication process of the parvovirus H-1, *Journal of Virology*, 14: 1660-1663
- H. Kostron, R. Bauer (2010), Management of recurrent malignant glioma – neurosurgical strategies, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 161: 20-21
- J. K. Krady, D. C. Ward (1995), Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1, *Molecular and Cellular Biology*, 15: 524–533
- K. M Kroeger , A. K. M. G. Muhammad, G. J. Baker, H. Assi, M. K. Wibowo, W. Xiong, K. Yagiz, M. Candolfi, P. R. Lowenstein, M. G Castro, (2010), Gene Therapy and Virotherapy: Novel therapeutic approaches for brain tumors, *Discovery Medicine*, 10: 293-304
- K. Kurozumi, J. Hardcastle, R. Thakur, J. Shroll, M. Nowicki, A. Otsuki, E. A. Chiocca, B. Kaur (2008), Oncolytic HSV-1 infection of tumors induces angiogenesis and upregulates CYR61, *Molecular Therapy*, 16: 1382-1391
- S. Lachmann, J. Rommelaere, J. P. F. Nüesch (2003), Novel PKC η is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of Minute Virus of Mice, *Journal of Virology*, 77: 8048–8060
- J. Lacroix, B. Leuchs, J. Li, G. Hristov, H. E. Deubzer, A. E. Kulozik, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer, O. Witt (2010), Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells, *International Journal of Cancer*, 127: 1230-1239
- A. Le Cesne, T. Dupressoir, N. Janin, M. Spielmann, T. Le Chevalier, H. Sancho-Garnier, C. Paoletti, J. Rommelaere, D. Stehelin, T. Tursz (1993), Intra-lesional administration of a live virus, parvovirus H-1 (PVH-1) in cancer patients: A feasibility study, *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*, 12: 297
- D. Legendre & J. Rommelaere (1992), Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition, *Journal of Virology*, 66: 5705-5713
- X. Li & S. L. Rhode, III (1991), Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells *in vivo* and *in vitro*, *Virology*, 184: 117-1130
- T. Lindl, G. Gstraunthaler (2008), *Zell- und Gewebekultur – Von den Grundlagen zur Laborbank*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, J. S. Yu (2006), Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma, *Molecular Cancer*, 5: 67-79
- T.-C. Liu, E. Galanis, D. Kirn (2007), Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 4: 101-117
- E. Lombardo, J. C. Ramírez, M. Agbandje-McKenna, J. M. Almendral (2000), A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus Minute Virus of Mice into the nucleus for viral assembly, *Journal of Virology*, 74: 3804-3814
- E. Lombardo, J. C. Ramírez, J. Garcia, J. M. Almendral (2002), Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus Minute Virus of Mice during assembly and onset of infection, *Journal of Virology*, 76: 7049-7059
- J. A. López-Guerrero, B. Rayet, M. Tuyen, J. Rommelaere, C. Dinsart (1997), Constitutive activation of U937 promonocytic cell clones selected for their resistance to Parvovirus H-1 infection, *Blood*, 89: 1642-1653

- D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Schelthauer, P. Kleihues (2007), *Acta Neuropathologica*, 114: 97-109
- X. Q. Lun, T. Alain, F. J. Zemp, H. Zhou, M. M. Rahman, M. G. Hamilton, G. McFadden, J. Bell, D. L. Senger, P. A. Forsyth (2010), Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin, *Cancer Research*, 70: 598-608
- M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker (2003), *Brock Biology of Microorganisms*, International Edition, Pearson Education Inc., London, Sydney, Hong Kong, Toronto, Tokyo, New Jersey, Seite 500 ff.
- B. Mani, C. Baltzer, N. Valle, J. M. Almendral, C. Kempf, C. Ros (2006), Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus Minute Virus of Mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome, *JOURNAL OF VIROLOGY*, 80: 1015–1024
- Y. Matsukado, C. S. Mac Carty, J. W. Kernohan (1961), The growth of glioblastoma multiforme in neurosurgical practice, *Journal of Neurosurgery*, 18: 636-644
- I. Melero; S. Hervas-Stubbs, M. Glennie, D. M. Pardoll, L. Chen (2007), Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 7: 95-106.
- M. H. Moehler, M. Zeidler, J. Schede, J. Rommelaere, P. R. Galle, J. J. Cornelis, M. Heike (2003), Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells, *Cancer Gene Therapy*, 10: 477-480
- M. H. Moehler, M. Zeidler, V. Wilsberg, J. J. Cornelis, T. Woelfel, J. Rommelaere, P. R. Galle, M. Heike (2005), Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response *in vitro* via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by Dendritic Cells, *Human Gene Therapy*, 16: 996-1005
- W. R. Morgan, D.C. Ward (1986), Three splicing patterns are used to exercise the small intron common to all minute virus of mice RNAs, *Journal of Virology*, 60: 1170-1174
- T. Mosmann (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- S. Mousset, Y. Ouadrhiri, P. Caillet-Fauquet, J. Rommelaere (1994), The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice non-structural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression, *Journal of Virology*, 68: 6446-6453
- J. Nemunaitis (1999), Oncolytic viruses, *Investigational New Drugs*, 17: 375-386
- T. L. Nguyen, H. Abdelbary, M. Arguello, C. Breitbach, S. Leveille, J. S. Diallo, A. Yasmeen, T. A. Bismar, D. Kirn, T. Falls, V. E. Snoultens, B. C. Vanderhyden, J. Werier, H. Atkins, M. J. Vähä-Koskela, D. F. Stojdl, J. C. Bell, J. Hiscott (2008), Chemical targeting of the innate antiviral response by histone deacetylase inhibitors renders refractory cancers sensitive to viral oncolysis, *Proceedings of the National Academie of Science USA*, 105: 14981-14986
- T. Nolan, R. E. Hands, W. Ogunkolade, S. A. Bustin (2006), SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations, *Analytical Biochemistry*, 351: 308-310
- J. P. F. Nüesch, R. Corbau, P. Tattersall, J. Rommelaere (1998), Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated *in vitro* by the phosphorylation state of the polypeptide, *Journal of Virology*, 72: 8002-8012
- J. P. F. Nüesch, S. Dettwiler, R. Corbau, J. Rommelaere (1998), Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated *in vitro* by phosphorylation through protein kinase C, *Journal of Virology*, 72: 9966-9977

- J. P. F. Nüesch, S. Lachmann, J. Rommelaere (2005), Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice, *Virology*, 331: 159-74
- J. P. F. Nüesch (2006), Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Arnold Hodder, London
- H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.-L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schüler, N. M. Probst-Hensch, P. Ce´sar Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. Gazi Yasargil, U. M. Lütolf, P. Kleihues (2004), Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study, *Cancer Research*, 64: 6892-6899
- T. Ohshima, M. Iwama, Y. Ueno, F. Sugiyama, T. Nakajima, A. Fukamizu, K. Yagami (1998), Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection, *Journal of General Virology*, 79: 3067-3071
- A. Op de Beeck, P. Caillet-Fauquet (1997), The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin?, *Journal of Virology*, 71: 5323-5329
- A. Op de Beeck, J. Sobczak-Thepot, H. Sirma, F. Bourgain, C. Brechot, P. Caillet-Fauquet (2001), NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1), *Journal of Virology*, 75: 11071-11080
- D. M. O´Toole & A. M. Golden (1991), Evaluating Cancer Patients for Rehabilitation Potential, *The Western Journal of medicine*, 155: 384-387
- C. R. Parrisch (2006), Autonomous parvovirus variation and evolution, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London
- W. M. Pardridge (2002), Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron*, 36: 555-558
- G. Pasquinucci (1971), Possible effect of measles on leukaemia, *Lancet*, 16: 136
- M. Perros, L. Deleu, J. M. Vanacker, Z. Kherrouche, N. Spruyt, S. Faisst, J. Rommelaere (1995), Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells, *Journal of Virology*, 69:5506-5515
- D. E. Post, F. R. Khuri, J. W. Simons, E. G. Van Meir (2003), Replicative oncolytic Adenoviruses in multimodal cancer regimens, *Human Gene Therapy*, 14: 933-946
- R. J. Prestwich, K. J. Harrington, H. S. Pandha, R. G. Vile, A. A. Melcher, F. Errington (2008), Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 8: 1581-1588
- R. J. Prestwich, F. Errington, R. M. Diaz, H. S. Pandha, K. J. Harrington, A. A. Melcher, R. G. Vile (2009), The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon, *Human Gene Therapy*, 20: 1119-1132
- J. Qiao, H. Wang, T. Kottke, C. White, K. Twigger, R. M. Diaz, J. Thompson, P. Selby, J. de Bono, A. Melcher, H. Pandha, M. Coffey, R. Vile, K. Harrington (2008), Cyclophosphamide facilitates antitumor efficacy against subcutaneous tumors following intravenous delivery of reovirus, *Clinical Cancer Research*, 14: 259-269
- Z. Ran, B. Rayet, J. Rommelaere, S. Faisst (1999), Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis, *Virus Research*, 65: 161-174
- B. Rayet, J. A. Lopez-Guerrero, J. Rommelaere, C. Dinsart (1998), Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway, *Journal of Virology*, 72: 8893-8903
- Z. Raykov, G. Balboni, M. Aprahamian, J. Rommelaere (2004), Carrier cell-mediated delivery of oncolytic Parvoviruses for targeting metastases, *International Journal of Cancer*, 109: 742-749

- S. L. Rhode, III. (1985) *Trans*-activation of the parvovirus late promoter by the 76K noncapsid protein, *Journal of Virology*, 55: 886-889
- S. L. Rhode, III. (1989), Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein, *Journal of Virology*, 63: 4249-4256.
- S. L. Rhode, III, P. R. Paradiso (1989), Parvovirus replication in normal and transformed human cells correlates with nuclear translocation of the early protein NS1, *Journal of Virology*, 63: 349-355
- C. M. Rocha-Lima, H. P. Soares, L. E. Racz, R. Singal (2007), EGFR targeting of solid tumors, *Cancer Control*, 14: 295-304
- J. Rommelaere, J. J. Cornelis (1991), Antineoplastic activity of parvoviruses, *Journal of Virological Methods*, 33: 233-51.
- J. Rommelaere, N. Giese, C. Cziepluch, J. J. Cornelis (2005), Parvoviruses as anti-cancer agents, in Sinkovics & Horvath (2005), *Viral Therapy of Human Cancers*, Marcel Dekker, New York
- C. Ros, C. J. Burckhardt, C. Kempf (2002), Cytoplasmic trafficking of Minute Virus of Mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction, *JOURNAL OF VIROLOGY*, 76: 12634–12645
- M. Saini, M. Bellinzona, F. Meyer, G. Cali, M. Samii (1999), Morphometrical characterization of two glioma models in the brain of immunocompetent and immunodeficient rats, *Journal of Neuro-Oncology*, 42: 59–67
- S. Sathornsumetee, D. A. Reardon, A. Desjardins, J. A. Quinn, J. J. Vredenburgh, J. N. Rich (2007), Molecularly Targeted Therapy for Malignant Glioma, *Cancer*, 110: 13-24
- J. R. Schlehofer, L. Gissmann, B. Matz, H. zur Hausen (1983), Herpes simplex virus-induced amplification of SV40 sequences in transformed Chinese hamster embryo cells, *International Journal of Cancer*, 15: 99-103
- C. Schütt, B. Bröker (2009), *Grundwissen Immunologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- J. P. Sheehan, M. E. Shaffrey, B. Gupta, J. Larner, J. N. Rich, D. M. Park, (2010) Improving the radiosensitivity of radioresistant and hypoxic glioblastoma, *Future Oncology*, 6: 1591-1601
- H. K. Shu, M. M. Kim; P. Chen, F. Furman, C. M. Julin, M. A. Israel (1998), The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression, *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 95: 14453-14458.
- A. Sica (2010), Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation, *Experimental Oncology*, 32: 153-158.
- G. Siegel (1984), Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses, In Berns (1984) *The Parvoviruses*, Plenum Publishing Corp., New York
- P. Srivastava (2002), Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity, *National Review of Immunology*, 2: 185-194
- R. Stupp, M. E. Hegi, M. J. van den Bent, W. P. Mason, M. Weller, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross (2006), Changing paradigms — an update on the multidisciplinary management of malignant Glioma, *The Oncologist*, 11: 165-180
- C. Tang, C. L. M. Chua, B-T. Ang (2007), Insights into the cancer stem cell model of Glioma tumorigenesis, *Annals Academy of Medicine*, 36: 352-357
- P. Tattersall (2006), The evolution of parvovirus taxonomy, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London

- A. Telerman, M. Tuynder, T. Dupressoir, B. Robaye, F. Sigaux, E. Shaulian, M. Oren, J. Rommelaere, R. Amson (1993), A model for tumor suppression using H-1 parvovirus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 8702-8706
- The Cancer Genome Atlas Research Network (2008), Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature Articles*, 455: 1061-1068
- P. Tijssen, J. Szelei, Z. Zádori (2006), Phospholipase A₂ domains in structural proteins of parvoviruses, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Hodder Arnold, London
- H. W. Toolan, G. Dalldore, M. Barclay, S. Chandra, A. E. Moore (1960), An unidentified, filtrable agent isolated from transplanted human tumors, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 46: 1256-1258.
- H. W. Toolan, E. L. Saunders, C. M. Southam, A. E. Moore, A. G. Levin (1965), H-1 virus viremia in the human, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 119: 711-715
- H. W. Toolan, N. Ledinko (1968), Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters, *Virology*, 35: 475-478
- G. E. Tullis, L. R. Burger, D. J. Pintel (1993), The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus Minute Virus of Mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity, *Journal of Virology*, 67: 131-141
- G. Tullis, R. V. Schoborg, D. J. Pintel, (1994), Characterization of the temporal accumulation of minute virus of mice replicative intermediates, *Journal of General Virology*, 75: 1633-1646
- M. A. Tyler, A. M. Sonabend, I. V. Ulasov, M. S. Lesniak (2008), Vector therapies for malignant glioma: shifting the clinical paradigm, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5: 445-58.
- M. J. Vaha-Koskela, J. E. Heikkila, A. E. Hinkkanen (2007), Oncolytic viruses in cancer therapy, *Cancer Letters*, 254: 178-216
- N. Valle, L. Rioloobos, J. M. Almendral (2006), Synthesis, post-translational modification and trafficking of the parvovirus structural polypeptides, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Arnold Hodder, London
- J. M. Vanacker, V. Laudet, G. Adelmant, D. Stéhelin, J. Rommelaere (1993), Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions, *Journal of Virology* 67: 7668-7672
- C. Van Pachterbeke, M. Tuynder, J. P. Cosyn, L. Lespagnard, D. Larsimont, J. Rommelaere (1993), Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures, *International Journal of Cancer*, 55: 672-677
- C. Van Pachterbeke, M. Tuynder, A. Brandenburger, G. Leclercq, M. Borrás, J. Rommelaere (1997), Varying sensitivity of human mammary carcinoma cells to the toxic effect of parvovirus H-1, *European Journal of Cancer*, 33: 1648-1653
- M. Vihinen-Ranta, D. Wang, W. S. Weichert, C. R. Parrish (2002), The VP1 N-terminal sequence of Canine Parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection, *Journal of Virology*, 76: 1884-1891
- M. Vihinen-Ranta, S. Suikkanen, C. R. Parrish (2004), Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses, *Journal of Virology*, 78: 6709-6714
- M. Vihinen-Ranta, C. R. Parrish (2006), Cell infection process of autonomous parvoviruses, in Kerr et al (2006), *Parvoviruses*, Arnold Hodder, London
- R. Vile, D. Ando, D. Kirn (2002), The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: unique biological and biosafety points to consider, *Cancer Gene Therapy*, 9: 1062-1067
- P. Walsh, C. Lim Overmyer, K. Pham, S. Michaelson, L. Gofman, L. DeSalvia, T. Tran, D. Gonzalez, J. Pusavat, M. Feola, K. T. Iacono, E. Mordechai, M. E. Adelson (2008),

- comparison of respiratory virus detection rates for infants and toddlers by use of flocked swabs, saline aspirates, and saline aspirates mixed in universal transport medium for room temperature storage and shipping, *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 2374-2376
- N. Weiß (2010), Optimization of autonomous parvovirus-based cancer gene therapy: A deletion in the non-structural (NS)-protein sequence of parvovirus H-1PV stimulates infectivity and export of progeny virions, Dissertation des Fachbereichs Naturwissenschaft und Mathematik der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
 - M. M. Wen (2011), Olfactory targeting through intranasal delivery of biopharmaceutical drugs to the brain - current development, *Discovery Medicine*, 11: 497-503.
 - M Westphal & K. Lamszus (2009), Other experimental therapies for glioma, *Recent Results in Cancer Research*, 171:155-164
 - K. Wetzel, P. Menten, G. Opdénakker, J. van Damme, H. J. Gröne, N. Giese, A. Vecchi, S. Sozzani, J. J. Cornelis, J. Rommelaere, C. Dinsart, Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts, *The Journal of Gene Medicine*, 3: 326-337
 - T. Wieder, H. Braumüller, M. Kneilling, B. Pichler, M. Röcken (2008), T cell-mediated help against tumors, *Cell Cycle*, 19: 2974-2977
 - G. M. Wilson, H. K. Jindal, D. E. Yeung, W. Chen, C. R. Astell (1991), Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities, *Virology*, 185: 90-98.
 - M. Wisher (2002), Biosafety and product release testing issues relevant to replication-competent oncolytic viruses, *Cancer Gene Therapy*, 9: 1056-1061
 - P. Wizla, A. Begue, I. Loison, A. Richard, P. Caillet-Fauquet, D. Stéhelin (2010), Ectopic expression of H-1 parvovirus NS1 protein induces alterations in actin filaments and cell death in human normal MRC-5 and transformed MRC-5 SV2 cells, *Archives of Virology*, 155: 771-775
 - J. Wojton, B. Kaur (2010), Impact of the tumor microenvironment on oncolytic viral therapy, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: 127-134
 - G. Wollmann, P. Tattersall, A. N. van den Pol (2005), Targeting human Glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential, *Journal of Virology*, 79: 6005-6022
 - T. R. Wolter, R. Wong, S. A. Sarkar, D. Zipris (2009), DNA microarray analysis for the identification of innate immune pathways implicated in virus-induced autoimmune diabetes, *Clinical Immunology*, 132: 103-115
 - C. Wrzesinski, L. Tesfay, N. Salome´, J-C Jauniaux, J. Rommelaere, J. Cornelis, C. Dinsart (2003), Chimeric and pseudotyped Parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts Parvovirus H-1 in mouse cells, *Journal of Virology*, 77: 3851-3858
 - L. You, B. He, Z. Xu, F. McCormick, D. M. Jablons (2004), Future directions: oncolytic viruses, *Clinical Lung Cancer*, 5: 226-230
 - Z. Zádori, J. Szelei, M. C. Lacoste, Y. Li, S. Gariépy, P. Raymond, M. Allaire, I. R. Nabi, P. Tijssen (2001), A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity, *Developmental Cell*, (2): 291-302.
 - Z. Zádori, J. Szelei, P. Tijssen (2005), SAT: a late NS protein of porcine parvovirus, *Journal of Virology*, 79: 13129-13138.
 - F. J. Zemp, J. C. Corredor, X. Lun, D. A. Muruve, P. A. Forsyth (2010), Oncolytic viruses as experimental treatments for malignant gliomas: using a scourge to treat a devil, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21: 103-117

6 Anhang

6.1 Lebenslauf

NAME:	Nadja Thomas
Geburtsort:	Ludwigshafen am Rhein
SCHULBILDUNG & STUDIUM:	
07.2008-09.2011	Promotion am DKFZ in Heidelberg, Abteilung Tumorstudiologie Oncolytic virotherapy of glioblastoma multiforme with Parvovirus H-1 Helmholtz International Graduate School for Cancer Research
07.2007-04.2008	Diplomarbeit: Fachbereich Allgemeine Zoologie Thema: Neurobiologie, Elektrophysiologie (1,7)
10.2003-04.2008	Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern
08.1991-06.2000	Allgemeine Hochschulreife Heinrich Böll Gymnasium Ludwigshafen Abschluss: (2,6)
BERUFSTÄTIGKEIT:	
08.2003-10.2003	Chemielaborantin Abbott GmbH & Co KG Präparative Wirkstoffsynthese
08.2000-07.2003	Ausbildung zur Chemielaborantin Abbott GmbH & Co KG, Ludwigshafen, Abschluss: (2,7)
PRAKTIKA:	
07.2006-08.2006	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg Allgemeine Tumorstudiologie Projekt: Proteinexpression in Tumorzelllinien nach viraler Infektion
06.2006	Mitarbeit bei der FIFA WM 2006 Host Broadcast Services Logistik der Fernsehproduktion
09.2004 und 03.2005	Labormitarbeit Abbott GmbH & Co KG Mitarbeit in der Abteilung early ADME

AUßERUNIVERSITÄRE TÄTIGKEITEN:

11.2007	Fallstudienwettbewerb „The contest 2007“ AT Kearney
03.2007-01.2008	Studentische Mitarbeiterin Fachbereich Zoologie, TU Kaiserslautern Patch-Clamp-Technik am Kleinhirn der Ratte Praktikumsbetreuung der Bachelor-Studenten im Neurobiologischen Kurs
05.2006–10.2006	Studentische Mitarbeiterin Fachbereich Biotechnologie, TU Kaiserslautern Pflege der Pilzstammsammlung, Herstellung von Medien, Kultivierung von Basidiomyceten
07.2006-04.2008	Mentoring-Programm für Nachwuchs- wissenschaftlerinnen der TU-Kaiserslautern
04.2004-04.2008	Studentische Unternehmensberatung: aktive Mitgliedschaft ATM-Consultants der TU Kaiserslautern
07.1995-02.2008	Service – und Verkaufstätigkeit Lieser-Sports, Ludwigshafen
1988-1996 1996-2000	Mitgliedschaft im Deutschen Roten Kreuz (DRK) Mitgliedschaft im Technischen Hilfswerk (THW)
BESONDERE KENNTNISSE: Sprachen:	Englisch (sehr gut), Französisch / Italienisch (Grundkenntnisse)

Nadja Thomas Ludwigshafen, 13.09.2011

Nadja Thomas

6.2 Veröffentlichungen

Kongresse:

- 20-24.09.2009 ECCO15-ESMO34 Multidisciplinary Congress
Berlin, **Oral Presentation:** Replication and
Excretion of Parvovirus H-1 in a Rat Model on
Oncolytic Virotherapy of Glioma
- 07-10.04.2010 4th International Congress of Virology,
Como, Italien, **Poster presentation:** Replication and
Excretion of Parvovirus H-1 in vivo
- 26-29.06.2010 21st Meeting of European Association for Cancer
Research, Oslo, Norwegen, **Poster presentation:**
Participation of the immune system in glioma lysis
initiated by parvovirus H1
- 20-24.06.2010 XIII Parvovirus Workshop
Helsinki, Finnland, **Poster presentation:**
Generation of propagation competent H1-PV variants in
human glioblastoma cell lines

Paper:

K. Geletneky, I. Kiprianova, A. Ayache, R. Koch, M. Herrero y Calle, L. Deleu, C. Sommer, **N. Thomas**, J. Rommelaere, J.R. Schlehofer (2010), Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models, *Journal of Neuro-Oncology*, 12: 804-814

I. Kiprianova, **N. Thomas**, A. Ayache, M. fischer, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer (2011), Efficient regression of rat glioma by intranasal application of parvovirus H-1, *Clinical Cancer Research*, 17: 5333-5342

I. Kiprianova & N. Thomas contributed equally to the study,

Erfindungen

Europäisches Patent: Patent No. 10004897.4-2405
Modified rodent parvovirus capable of propagating and spreading through human gliomas

Europäisches Patent: Patent No. 10006082.1-2107
Parvovirus for treatment of tumours by intranasal application