

**Entwicklung eines implantierbaren HCC-Modells in  
immunkompetenten Mäusen & Ratten und Optimierung  
einer neuen Viro-Immuntherapie**

**von Nicola Gisela Nina Smutny**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**Entwicklung eines implantierbaren HCC-Modells in  
immunkompetenten Mäusen & Ratten und Optimierung  
einer neuen Viro-Immuntherapie**

**von Nicola Gisela Nina Smutny**

**aus München**

**München 2020**

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Lehrstuhl für Physiologie**

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:**

**Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel**

**Angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München**

**Mentorin: Dr. Jennifer Altomonte**

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Tag der Promotion: 25. Juli 2020**

**Für meine Familie**



## **INHALTSVERZEICHNIS**

**INHALTSVERZEICHNIS ..... VII**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... XI**

**I. Einleitung ..... 1**

**II. Literaturübersicht ..... 3**

**1. Hepatozelluläres Karzinom des Menschen ..... 3**

**1.1. Ätiologie und Pathogenese ..... 3**

**1.2. Diagnostik ..... 4**

1.2.1. Serologie ..... 4

1.2.2. Bildgebung ..... 5

1.2.3. Leberbiopsie ..... 6

**1.3. Therapie ..... 6**

1.3.1. Kurative Verfahren ..... 6

1.3.2. Nicht-chirurgische Therapieansätze ..... 7

**2. Hepatozelluläres Karzinom bei Haustieren ..... 7**

**3. Onkolytische Viren in der Krebstherapie ..... 8**

**4. Immunreaktion viraler Infektionen ..... 9**

**5. Komplexes Milieu der Leber und dessen Auswirkung auf die onkolytische Virustherapie ..... 11**

**6. Elternviren und pseudotypisiertes VSV-NDV ..... 12**

**6.1. Newcastle Disease Virus (NDV) ..... 12**

**6.2. Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) ..... 16**

**6.3. Rekombinantes VSV-NDV-Virus (rVSV-NDV) ..... 18**

**III. Material und Methoden ..... 23**

**1. *In-vitro* Experimente ..... 23**

**1.1. Zellkultur und Zelllinien ..... 23**

1.1.1. Charakterisierung unterschiedlicher HCC-Zelllinien ..... 25

1.1.2. LDH-Aktivitätsbestimmung ..... 25

1.1.3.	Tissue Culture Infection Dose 50 <i>in-vitro</i> .....	26
<b>2.</b>	<b><i>In-vivo</i> Experimente.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.</b>	<b>Versuchstierhaltung .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.</b>	<b>HCC-Mausmodelle .....</b>	<b>30</b>
2.3.1.	Präparation der RIL-175 Zellen für die subkutane Tumorimplantation ....	30
2.3.2.	Subkutane Tumorimplantation .....	31
2.3.3.	Überlebenszeitstudie bei einseitiger Tumorimplantation .....	31
2.3.4.	Überlebenszeitstudie bei beidseitiger Tumorimplantation .....	32
2.3.5.	Kinetikstudie.....	33
2.3.6.	Tumoranalyse .....	34
2.3.6.1.	Histologie.....	34
2.3.6.2.	Durchflusszytometrie (FACS) und TCID 50.....	35
<b>2.4.</b>	<b>HCC-Rattenmodell .....</b>	<b>38</b>
2.4.1.	Präparation der McA-RH7777 Zellen für die intrahepatische Tumor- implantation .....	38
2.4.2.	Unifokale intrahepatische Tumorimplantation .....	39
2.4.3.	Bildgebung.....	40
2.4.4.	Intravenöse Injektion in die Schwanzvene .....	42
<b>3.</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>42</b>
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b><i>In-vitro</i> Charakterisierung verschiedener HCC-Zelllinien.....</b>	<b>43</b>
<b>1.1.</b>	<b>Virusbedingte LDH-Freisetzung .....</b>	<b>47</b>
<b>1.2.</b>	<b>Bestimmung der viralen Replikationskinetik <i>in-vitro</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>2.</b>	<b><i>In-vivo</i> Analyse .....</b>	<b>57</b>
<b>2.1.</b>	<b>Überlebenszeitanalysen im Mausmodell.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2.</b>	<b>Beurteilung des Kinetikexperiments.....</b>	<b>67</b>
2.2.1.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	68
2.2.2.	Analyse der intratumoralen Virustiter .....	80
2.2.3.	Histologie.....	81
<b>2.3.</b>	<b>Ratten-Überlebenszeitanalyse .....</b>	<b>86</b>



<b>V.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>VII.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>101</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>IX.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>X.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>XII.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>119</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
AFP-L3	Lektin reaktives Alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
APMV-1	Aviäres Paramyxovirus Serotyp 1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Az.	Aktenzeichen
BHK	Baby Hamster Kidney
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CE	Contrast-Enhanced
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptoren
CPE	Cytopathic Effects
CT	Computertomographie
DAMPS	Danger-Associated Molecular Patterns
DENA	Diethylnitrosamin
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dest.	destilliert
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FNA	Feinnadelaspiration
F-Protein	Fusionsprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Hours
HCC	Hepatozelluläres Karzinom

HE	Hämatoxylin-Eosin
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HSP	Hitzeschockprotein
ICD	Immunogenic Cell Death
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.h.	intrahepatisch
i.t.	intratumoral
kb	Kilo-Basenpaar
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
max.	maximal
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
MOI	Multiplicity of Infection
MRT	Magnetresonanztomographie
MTD	Maximal tolerierbare Dosis
NaCl	Natriumchlorid
NDV	Newcastle Disease Virus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
nm	Nanometer
NLRs	NOD-Like Receptors
OD	Optische Dichte
OVs	Onkolytische Viren

PAMPS	Pathogen-Associated-Molecular-Patterns
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death-Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RLR	Retinoic Acid-Inducible Gene (RIG)-I-Like Receptors
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Revolutions per Minute
r	rekombinant
s	Sekunden
s.c.	subkutan
SEM	Standard Error of Mean
SPF	spezifisch pathogenfrei
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TCID	Tissue Culture Infection Dose
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
US	Ultraschall
VN	VSV-NDV
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus



## I. EINLEITUNG

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache weltweit. 2018 starben rund 9,6 Millionen Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Männer leiden vor allem unter Lungen-, Prostata-, Kolorektal-, Magen- und Leberkrebs, wohingegen bei Frauen Brust-, Kolorektal-, Lungen-, Zervix- und Schilddrüsenkrebs die häufigsten Krebsformen sind. 2018 starben ca. 782.000 Menschen weltweit an Leberkrebs [1].

Die höchste Inzidenz an Leberkrebskrankungen findet sich in Ost- und Südostasien, sowie in Mittel- und Westafrika. Im Gegensatz zu Nord- und Osteuropa treten in Südeuropa maligne Neoplasien des Leberparenchyms häufiger auf [2].

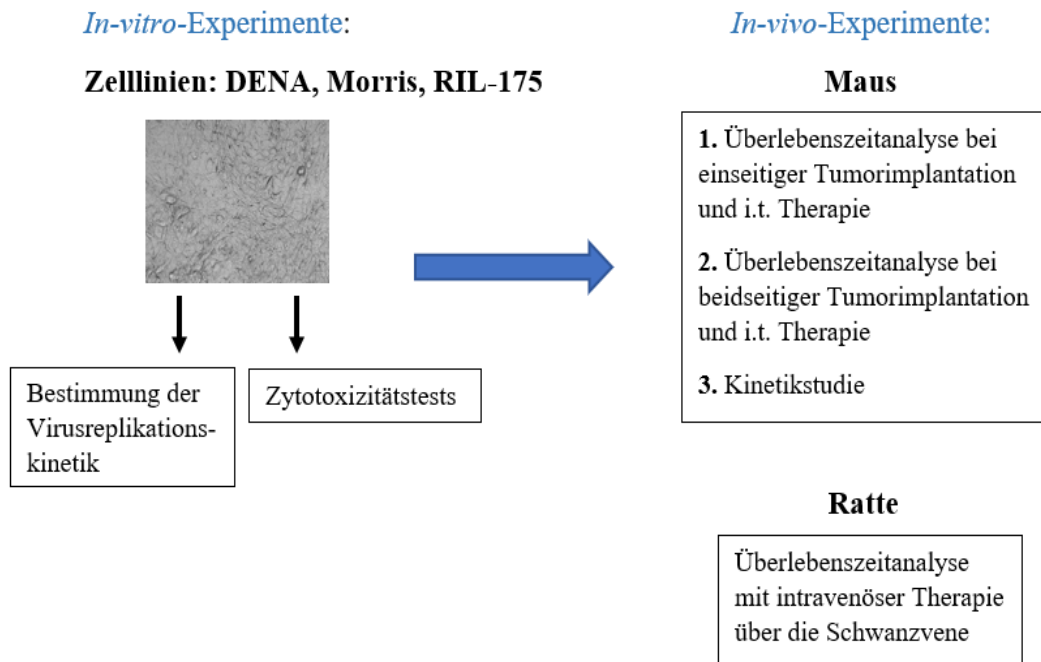
Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist dabei in 75-85 % der Fälle die häufigste Form der primären Lebertumoren. 10–15 % der intrahepatischen Neoplasien stellen sich als Cholangiokarzinome dar [3]. Eine spezielle Form der Krebstherapie, die sich in den letzten Jahren stark entwickelt und etabliert hat, ist die Immuntherapie mittels onkolytischer Viren. Onkolytische Viren replizieren sich in Tumorzellen und zerstören diese selektiv [4].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines implantierbaren HCC-Modells in Nagetieren und die Optimierung der darauffolgenden Viro-Immuntherapie. Der Versuchsablauf lässt sich in zwei Abschnitte gliedern (siehe Abb. 1).

Im ersten Teil wurden verschiedene HCC-Zelllinien sowohl von der Ratte als auch von der Maus *in vitro* charakterisiert, um einen besseren Therapieeffekt zu erzielen.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden diese syngenen Zelllinien anschließend *in vivo* an immunkompetenten Mäusen und Ratten untersucht. Bei den Mäusen wurde ein subkutanes und bei den Ratten ein intrahepatisches Tumormodell angewandt. Die Behandlung der HCC-Tumore mittels onkolytischer Viren erfolgte im Mausmodell intratumoral und im Rattenmodell intravenös über die Schwanzvene.

Eine klinische Translation der erhaltenen Ergebnisse kann zum Fortschritt einer neuen Therapieentwicklung für das hepatozelluläre Karzinom beitragen.



**Abb. 1: Schematischer Versuchsaufbau; (i.t. = intratumoral)**



## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Hepatozelluläres Karzinom des Menschen**

#### **1.1. Ätiologie und Pathogenese**

Die bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) sind chronische Lebererkrankungen (insbesondere die Leberzirrhose), die durch virale Hepatitiden oder exzessiven Alkoholkonsum verursacht werden [5].

In der südafrikanischen Bevölkerung treten hepatozelluläre Karzinome vor allem durch die Aufnahme von Aflatoxin B<sub>1</sub>, ein Mykotoxin (produziert von *Aspergillus* Spezies), auf. Die Lebertumore sind größer, weniger differenziert und das umliegende Lebergewebe ist gesünder als bei einer zirrhotisch bedingten Leberveränderung [6].

Hepatitis B und C lösen weltweit die meisten chronischen Leberentzündungen aus [5]. Die Übertragung des Hepatitis B Virus (HBV) erfolgt hauptsächlich bei der Geburt von der Mutter auf das Kind, sowie über Blut und Körperflüssigkeiten [7]. Das Hepatitis C Virus (HCV) wird in erster Linie über das Blut übertragen, z.B. durch infizierte Kanülen bei Drogenmissbrauch oder nicht getestete Blutprodukte [8].

Ein starker Alkoholmissbrauch über mehrere Jahre ist die Ursache von rund 40–50 % aller HCC-Fälle in Europa. Ein regelmäßiger und starker Konsum führt zu progressiver Leberfibrose, Leberzirrhose und letzten Endes zum Leberversagen [9].

Diabetes mellitus spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms, da die Leber einen wesentlichen Teil des Glukosemetabolismus übernimmt [10]. 60 % aller Patienten, die an Diabetes mellitus oder Fettleibigkeit leiden und über 50 Jahre alt sind, weisen das Krankheitsbild einer Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) mit fortgeschrittener Fibrose auf. Daraus folgt, dass die Häufigkeit eines Nonalcoholic fatty liver disease bedingten hepatozellulären Karzinoms stetig zunimmt [11].

Fettleibigkeit erhöht das Risiko eines HCCs um das 1,5- bis 4-fache. Übergewichtige Patienten haben ein 17 % höheres Risiko (im Vergleich zu normalgewichtigen Menschen) an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken. Bei fettleibigen

Patienten liegt das relative Risiko an einem Leberkarzinom zu erkranken um 89 % höher [12].

Einen weiteren Risikofaktor stellt die Geschlechtsprädisposition dar. Leberkrebs ist die fünfthäufigste Krebsform des Mannes. Bei der Frau steht sie erst an siebter Stelle. Das Geschlechtsverhältnis von Männern zu Frauen liegt bei 2,4 [2].

85 % der Leberkrebserkrankungen treten vor allem bei Männern in den Entwicklungsländern auf [2].

## **1.2. Diagnostik**

Studien haben herausgefunden, dass das frühzeitige Screening von hepatozellulären Karzinomen die Überlebenszeit der betroffenen Patienten wesentlich verlängert [13]. Die meisten hepatozellulären Karzinome werden jedoch erst in späten Krankheitsstadien diagnostiziert, in denen die Behandlungsmöglichkeiten sehr begrenzt sind [14].

### **1.2.1. Serologie**

Alpha-Fetoprotein (AFP) ist ein Serumglykoprotein, das vor mehr als 40 Jahren als Tumormarker für die Detektion präklinischer hepatozellulärer Karzinome entdeckt wurde. Während der Schwangerschaft produziert der Dottersack des Fötus und die fetale Leber große Mengen an AFP. Nach der Geburt geht der Wert dann innerhalb von 300 Tagen auf <10 ng/dl zurück [15].

Ein großer Nachteil ist jedoch, dass das Alpha-Fetoprotein sowohl bei chronischer Hepatitis als auch bei Leberfibrose und -zirrhose im Blut erhöht sein kann (>20 ng/ml) [16]. AFP-Werte von >400–500 ng/ml werden als diagnostisch für das HCC angesehen [17].

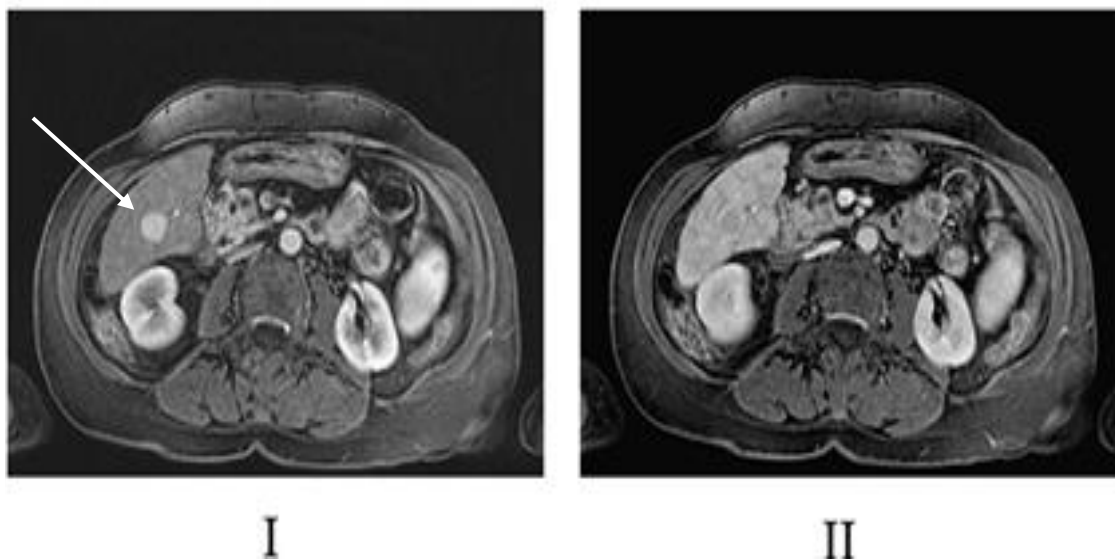
Zur weiteren Diagnostik wird das Lektin-reaktive Alpha-Fetoprotein (AFP-L3) herangezogen. Es stellt eine spezifische HCC-Isoform des in der Leber gebildeten AFP-Glykoproteins dar. AFP-L3 erweist sich als nützlicher klinischer Serummarker für die Differenzierung zwischen einem hepatozellulären Karzinom und einer chronischen Lebererkrankung [18]. In einer Studie von Taketa et al. konnte ein

signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen dem AFP-L3-Prozentsatz bei HCC-Patienten ( $40,40 \pm 25,90 \%$ ) und bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ( $6,5 \pm 2,7 \%$ ) nachgewiesen werden [19].

Des-gamma-carboxy prothombin (DCP), auch PIVKA II (protein induced by vitamin K absence) genannt, wird ebenfalls in Kombination mit AFP zur HCC-Diagnostik herangezogen [20].

### 1.2.2. Bildgebung

Grundsätzlich stehen zur Diagnostik des HCCs der kontrastmittelverstärkte Ultraschall (CE-US), die kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CE-CT) und die kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (CE-MRT) zur Verfügung. Bei der Bildgebung spricht die typische Vaskularisierung für ein hepatozelluläres Karzinom. HCCs stellen sich in der Kontrastmittel-Bildgebung klassischerweise durch eine Hypervaskularisation in der arteriellen Phase, gefolgt von einer portalen/venösen Wash-out-Phase, dar (siehe Abb. 2) [21].



**Abb. 2: CE-MRT-Bilder I) Arterielle Hypervaskularisation des hepatozellulären Karzinoms; II) Wash-out in der portalen/venösen Phase; HCC mit Pfeil markiert; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

Quelle: [21]

CE-US sollte jedoch nicht als die alleinige diagnostische Maßnahme angewandt werden. Bei dieser Technik lassen sich das hepatozelluläre Karzinom und das intrahepatische Cholangiokarzinom oft nicht voneinander differenzieren, sodass die Sensitivität abnimmt [22]. Weltweit stellt die Kontrastmittel-MRT das Mittel der Wahl in der Bildgebungsdiagnostik des HCCs dar [14].

### **1.2.3. Leberbiopsie**

Eine Leberbiopsie ist dann angeraten, wenn im CE-MRT kein typisches Vaskularisationsmuster zur Differenzierung einer malignen Neoplasie des Leberparenchyms festgestellt werden kann [22].

Zytologische und histologische Proben werden mittels ultraschall- oder CT-gestützter perkutaner Feinnadelaspiration (FNA) und/oder Stanzbiopsie entnommen. Die simultane Anwendung beider Techniken liefert dabei eine gefestigtere Aussage. Leberbiopsien sind mit 95 % spezifischer als alle anderen diagnostischen Untersuchungen [23].

## **1.3. Therapie**

Das Staging des hepatozellulären Karzinoms wird anhand der weltweit anerkannten Barcelona-Clinic-Liver-Cancer-(BCLC-)Klassifikation durchgeführt und im Anschluss die entsprechenden Therapieoptionen ermittelt [24].

### **1.3.1. Kurative Verfahren**

Grundsätzlich stehen drei kurative Therapieverfahren zur Verfügung. Dabei handelt es sich um die chirurgische Resektion, die orthotope Lebertransplantation und die Tumorablation [25].

Für Patienten ohne Leberzirrhose ist die chirurgische Resektion des hepatozellulären Karzinoms das Verfahren der Wahl. Die Remissionsrate liegt bei einer 41–74 %igen Überlebenszeit von fünf Jahren [26]. Patienten, die an zirrhotisch bedingten Leberveränderungen und einem HCC leiden, sollten eine Lebertransplantation

erhalten. Durch eine Transplantation wird sowohl die Neoplasie als auch die zugrunde liegende Zirrhose therapiert. Eine perkutane Radiofrequenzablation (RFA) wird vor allem bei Patienten durchgeführt, die für eine offene Tumorresektion aufgrund des zu hohen Operationsrisikos nicht infrage kommen [25].

Das häufig weit fortgeschrittene Krankheitsstadium sowie die eingeschränkte Verfügbarkeit einer transplantierbaren Leber führen dazu, dass nur ein geringer Prozentsatz der betroffenen Patienten für die kurative Therapie infrage kommt [25]. Aufgrund dieser Tatsache ist die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien unabdingbar.

### **1.3.2. Nicht-chirurgische Therapieansätze**

Bei Patienten, die an einem nicht-resezierbaren HCC leiden und für eine Lebertransplantation vorgesehen sind, stellt die lange Wartezeit ein hohes Risiko dar. Die am häufigsten angewandte Behandlungsmethode zur Überbrückung der Wartezeit bzw. zum Downstaging der Tumorklasse ist die transarterielle Chemoembolisation (TACE) [27]. Das Konzept der TACE besteht darin, Chemotherapeutika in die den Tumor versorgende hepatische Arterie einzubringen und diese im Anschluss zu embolisieren. Die Embolisation löst eine selektive Ischämie aus und führt zur Tumornekrose [28].

Laut einer Studie von 2008 verlängert die systemische Verabreichung von Sorafenib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, die mittlere Überlebenszeit der betroffenen Patienten um drei Monate. In dieser Studie erhielten Patienten mit fortgeschrittenem HCC zweimal täglich Sorafenib. Als Nebenwirkungen traten vor allem Diarrhoe, Gewichtsverlust, Hautreaktionen und eine Hypophosphatämie auf [29].

## **2. Hepatozelluläres Karzinom bei Haustieren**

Primäre Neoplasien des Leberparenchyms zählen bei Hunden zu 0,6–1,5 % und bei Katzen zu 1,0–2,9 % aller Tumorerkrankungen [30].

Das hepatozelluläre Karzinom stellt bei Hunden den häufigsten primären Lebertumor dar [31]. Bei Katzen steht das HCC nach Adenomen an zweiter Stelle [30].

Laut einer Studie treten hepatozelluläre Karzinome bei Hunden durchschnittlich in einem Alter von elf Jahren auf und betreffen vor allem Rüden. Die typischen Symptome sind Anorexie, Aszites, Lethargie, Vomitus, Ikterus, Gewichtsverlust und Hepatomegalie [32].

Die beste Therapieoption ist die frühzeitige chirurgische Resektion [31]. Aufgrund des meist hohen Alters der Tiere und der damit verbundenen Risiken wäre eine weniger invasive Behandlungsmethode wünschenswert.

### **3. Onkolytische Viren in der Krebstherapie**

Eine Form der Krebstherapie, die in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden ist, ist die Viro-Immuntherapie mittels onkolytischer Viren. Onkolytische Viren besitzen einen intrinsischen oder so modifizierten Mechanismus, um sich selektiv in Tumorzellen zu replizieren und diese anschließend zu lysieren [33].

Viele Wildtyp-Viren infizieren vor allem Zellen, die sich im aktiven Stadium befinden. Folglich kommt es zu einer Hochregulierung der zellulären Replikationsmechanismen. Solche mutierten oder genetisch veränderten Viren sind nicht in der Lage inaktive oder normale Zellen zu befallen. Sie replizieren sich nur in sich aktiv teilenden Zellen, wie z.B. in Tumorzellen [4], hauptsächlich aufgrund von Defekten in der antiviralen Interferon-Signalübertragung, die während der malignen Tumorzell-Transformation auftreten [34].

Die einzigartigen Fähigkeiten der onkolytischen Viren weckten das Interesse der Forscher, eine Behandlung zu entwickeln, die lokal und gleichzeitig auch systemisch wirksam ist. Zu den onkolytischen Viren zählen Rhabdoviren, Herpes-Simplex-Viren, Adenoviren, Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Pockenviren, Picornaviren, Reoviren und viele mehr [4].

Die Krebsimmuntherapie stellt eine vielversprechende neue Behandlungsmethode dar. Das Ziel besteht darin, durch Aktivierung des Immunsystems des Patienten den Tumor zu zerstören. Im Idealfall aktiviert eine effektive Immuntherapie den Krebs-Immunitäts-Zyklus. Der Zyklus beginnt mit der Zerstörung der Tumorzellen und der Aktivierung des Immunsystems. Als Folge wird eine umfassende antitumorale Immunantwort ausgelöst. Daraufhin wird eine zweite Phase der Tumorzellzerstörung

eingeleitet, in der die endogenen Immunzellen des Patienten aktiviert werden. Die endogenen Immunzellen richten sich gezielt gegen tumorspezifische Antigene, verbliebene Tumorzellen und Metastasen. Idealerweise wird dadurch ein Tumorrezidiv verhindert [35].

Onkolytische Viren zerstören direkt infizierte Tumorzellen und lösen indirekt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems aus. Das erworbene Immunsystem richtet sich gegen den Tumor selbst und führt zur Zerstörung der nicht infizierten tumorösen Nachbarzellen [33]. Idealerweise richtet sich diese Immunantwort auch gegen Metastasen im ganzen Körper [36].

Einige Viren haben sich die Verschmelzung der viralen Hülle mit der Wirtsmembran (während der Infektion) zunutze gemacht. Die virale Zellfusion wird durch ein oder mehrere virale Oberflächen-Glykoproteine ausgelöst, die mit unterschiedlichen Rezeptoren der Ziellmembran interagieren. Auf diese Weise wird dem Virus der Eintritt in die Wirtszelle ermöglicht [37]. Virale Glykoproteine, die auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden, lösen unter anderem auch Zell-Zell-Fusionen zu benachbarten nicht infizierten Zellen aus. Diese sogenannte Synzytienbildung fördert die Virusausbreitung und gleichzeitig dessen Virulenz [38]. Des Weiteren erweist sich der durch eine virale Synzytienbildung ausgelöste Zelltod immunogener als der klassische zytopathische Effekt [39].

#### **4. Immunreaktion viraler Infektionen**

Das Immunsystem der Säugetiere setzt sich aus einem angeborenen und einem erworbenen Immunsystem zusammen. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere für das Eindringen von Pathogenen dar und besteht unter anderem aus Phagozyten wie Makrophagen und dendritischen Zellen. In der späten Phase der Infektion kommt das erworbene Immunsystem zum Einsatz. Lymphozyten beseitigen die Pathogene und generieren ein immunologisches Gedächtnis gegen spezifische Antigene [40].

Das Eindringen von Pathogenen wird zuerst von „Pattern recognition receptors (PRRs)“ erkannt. Diese Rezeptoren kommen vor allem auf angeborenen Immunzellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, sowie auf

erworbenen Immunzellen (B- und T-Lymphozyten) und anderen Körperzellen (epitheliale und endotheliale Zellen, Fibroblasten) vor [41].

Zu den „Pattern recognition receptors (PRRs)“ gehören transmembrane Proteine wie die Toll-like-Rezeptoren (TLR) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR) sowie die zytoplasmatischen Proteine Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLR) und NOD-like receptors (NLRs). PRRs erkennen spezifische Oberflächenstrukturen viraler Pathogene, die sogenannten „Pathogen-associated molecular patterns (PAMPS)“, und aktivieren die proinflammatorische Ausschüttung von Zytokinen, Typ-1-Interferonen (IFNs) und Chemokinen [42].

Das Interferonsystem fungiert als erste Verteidigung gegen virale Infektionen. Interferone richten sich dabei gegen die Virusreplikation und dessen Ausbreitung im Körper [43]. Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL)-1 und Interleukin-6 (IL)-6 regulieren die endotheliale Gefäßpermeabilität, den Zelltod von entzündetem Gewebe, rekrutieren Blutzellen und induzieren die Bildung von Akute-Phase-Proteinen [42].

Sobald das Virus in die Zelle eingedrungen ist, erkennen MHC-I-Moleküle virale Peptide und transportieren diese zur Zelloberfläche. Der Komplex aus viralen Proteinen und MHC-I-Molekülen wird an der Zelloberfläche präsentiert und von T-Zell- und NK-Zellen-Rezeptoren erkannt [44]. Natürliche Killerzellen und aktivierte T-Zellen schütten zytotoxische Faktoren aus und lösen die Apoptose infizierter Zellen aus [45].

CD8 ist ein Co-Rezeptor des MHC-I-Moleküls und kommt auf T-Zellen und NK-Zellen vor. T-Zellen mit dem CD8-Rezeptor erkennen an MHC-I-gebundene virale Peptide und wandeln sich zu zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen um. Infizierte Zellen werden anschließend abgetötet und die virale Replikation durch IFN- $\gamma$ -Freisetzung unterdrückt. Viruspeptide, die an MHC-II-Moleküle gebunden sind, werden von Antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) präsentiert und von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt. CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen aktivieren daraufhin Zellen des adaptiven Immunsystems [46].

Kanzerogene Zellen, die durch eine virale Infektion zugrunde gehen, setzen Tumorantigene und sogenannte „Danger-associated molecular patterns (DAMPS)“



frei. Infolgedessen kommt es zu einer Ausschüttung von Zytokinen und zur Aktivierung einer antitumoralen Immunantwort [47].

Zu den DAMPS zählen unter anderem Adenosintriphosphat (ATP), Calreticulin (ecto-CRT), Hitzeschockproteine wie HSP70 und HSP90, das High-Mobility-Group-Box-1-Protein (HMGB1) und Harnsäure, die von absterbenden Zellen freigesetzt wird [48].

Sobald naive B-Lymphozyten Kontakt zu einem Fremdartigen haben (präsentiert von CD4+-T-Helferzellen) differenzieren sich die B-Zellen zu Gedächtniszellen und Antikörper-produzierenden-Effektorzellen. Effektor-B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran und sekretieren kontinuierlich rund 2000 Antikörper-Moleküle pro Sekunde [49]. Antikörper inaktivieren virale Pathogene entweder über direkte Neutralisation oder indirekt durch die Aktivierung des Komplementsystems [50].

## **5. Komplexes Milieu der Leber und dessen Auswirkung auf die onkolytische Virustherapie**

Die Leber ist eines der regenerationsfähigsten Organe des Körpers. Sie spielt eine wesentliche Rolle für die Entgiftung, den Metabolismus, die Nährstoffaufnahme und die Immunmodulation. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen besteht die Leber-Mikroumgebung aus einem komplexen Netzwerk an Hepatozyten, Stromazellen, inflammatorischen Zellen und einer extrazellulären Matrix (EZM). Auch wenn dieses System für die Leberfunktion entscheidend ist, stellt es eine grundlegende Barriere für die Infektion und Replikation von onkolytischen Viren dar [51].

Hepatozyten machen 80 % des Lebervolumens aus. Sie werden von Nicht-Parenchymzellen in den Lebersinusoiden geschützt. Die sinusoidalen Hauptkomponenten setzen sich aus Kupfferschen Sternzellen, sinusoidalen Endothelzellen, hepatischen Sternzellen und natürlichen Killerzellen zusammen. Fenestrierte sinusoidale Endothelzellen fungieren als Filtrationssystem für Pathogene, Abfallprodukte und zirkulierende Tumorzellen. Kupffersche Zellen, die Makrophagen der Leber, spielen eine große Rolle bei der Beseitigung von portal zirkulierendem Fremdmaterial [52]. Natürliche Killerzellen, Kupffersche Sternzellen und dendritische Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und stellen die erste Barriere für eingedrungene Pathogene wie Bakterien oder Viren dar [53].

Die Schwierigkeit einer onkolytischen Virustherapie zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms zeigte eine Studie von 2005. Manickan et al. führten den Nachweis, dass intravenös injizierte Adenoviren rasch von den Kupfferschen Zellen aufgenommen werden, bevor sie zu den tumorösen Zielzellen gelangen [54].

Aktivierte Kupffer Zellen sind unter anderem auch potente Produzenten von Stickoxiden und Zytokinen wie Interferon (IFN), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 und IL-10 [52]. Zytokine haben anti-virale Eigenschaften [55] und erschweren dadurch zusätzlich die Replikation von onkolytischen Viren [51].

Natürliche Killerzellen gehören zur Gruppe der zytotoxischen Lymphozyten und spielen eine große Rolle bei der frühzeitigen Verteidigung gegen eingedrungene Viren [56]. In einer Studie von 2008 konnte eine signifikante Akkumulation von NK- und NKT-Zellen in orthotopen, syngen HCCs in immunkompetenten Ratten festgestellt werden. Der Nachweis erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach der Behandlung mit dem onkolytischen Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Es konnte gezeigt werden, dass natürliche Killerzellen im Wesentlichen an der Beseitigung des Virus beteiligt waren [57].

Man geht davon aus, dass die in der Leber residierenden NK- und NKT-Zellen jederzeit VSV-infizierte Bereiche infiltrieren können, um eine Virusreplikation und einen therapeutischen Effekt zu verhindern [51].

Das vorherrschende Zellsystem der Leber spiegelt somit die Komplexität der onkolytischen Viro-Immuntherapie wider.

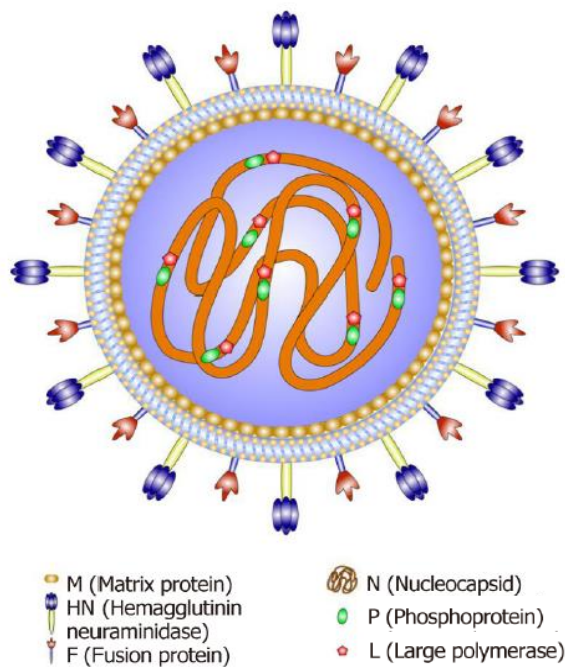
## **6. Elternviren und pseudotypisiertes VSV-NDV**

### **6.1. Newcastle Disease Virus (NDV)**

Newcastle Disease wird durch das aviäre Paramyxovirus Serotyp 1 (APMV-1) ausgelöst. APMV-1 gehören zur Familie *Paramyxoviridae*, der Ordnung *Mononegavirales* [58]. Entsprechend dem Genus *Avulavirus* sind Vögel der natürliche Wirt. Erste Ausbrüche der virulenten Form des Virus wurden 1926 in Java (Indonesien) und Newcastle (England) bei Geflügel festgestellt [59].

Newcastle Disease ist eine epidemische Krankheit und führt vor allem bei intensiver Geflügelhaltung zu hohen wirtschaftlichen Verlusten. Der Hauptübertragungsweg erfolgt fäkal-oral und über den Respirationstrakt [60]. Die Inkubationszeit liegt zwischen 2 und 15 Tagen [59]. Erste symptomatische Anzeichen sind dünnschalige bis schalenlose Eier, ein drastischer Rückgang der Legeleistung und dünnflüssiger, grüngelblicher Kot mit Blutbeimengungen. Des Weiteren treten Apathie, Atemnot, geschwollene Augenlider, bläulich verfärbte Kämmen und Inappetenz auf [61]. NDV lässt sich in drei Pathotypen einteilen: lentogen (avirulent), mesogen (intermediär) und velogen (virulent) [62]. Akute lethale Infektionen kommen besonders bei Hühnern mit respiratorischen und neurologischen Symptomen vor. Humane Infektionen äußern sich durch Konjunktivitis, Augenlidödeme, Lakrimation und in seltenen Fällen Fieber [63].

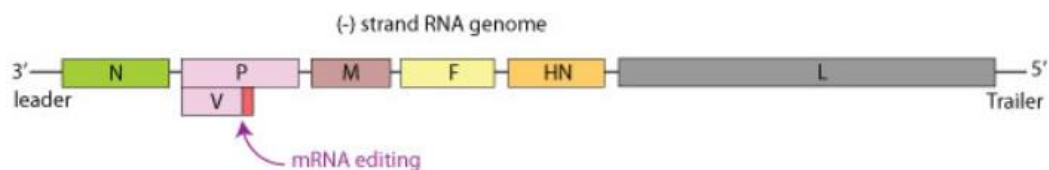
NDV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit negativer Polarität. Das Genom ist ca. 15,2 Kilo-Basenpaare lang und codiert für sechs Proteine das Nukleoprotein (NP), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Fusionsprotein (F), die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) (siehe Abb. 3) [64]. Das V-Protein wird durch RNA-Editierung des Phosphoproteins (P) erzeugt [65].



**Abb. 3: Aufbau eines Newcastle Disease Virions; M: Matrixprotein; HN: Hämagglutinin-Neuraminidase; F: Fusionsprotein; N: Nucleokapsid; P: Phosphoprotein; L: RNA-Polymerase; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

**Quelle: [66]**

V-Proteine der Newcastle Disease Viren sind für die Unterdrückung der IFN- $\alpha$ -Produktion zuständig. Pathogenitätsstudien zeigten, dass die Interferon-Unterdrückung (IFN stellen die erste antivirale Immunantwort des Wirts dar) zur Virulenz des NDV beiträgt (siehe Abb. 4) [65].



**Abb. 4: Genom des Newcastle Disease Virus; N: Nucleoprotein; P: Phosphoprotein; V: V-Protein; M: Matrixprotein; F: Fusionsprotein; HN: Hämagglutinin-Neuraminidase; L: RNA-Polymerase; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

**Quelle: [67]**

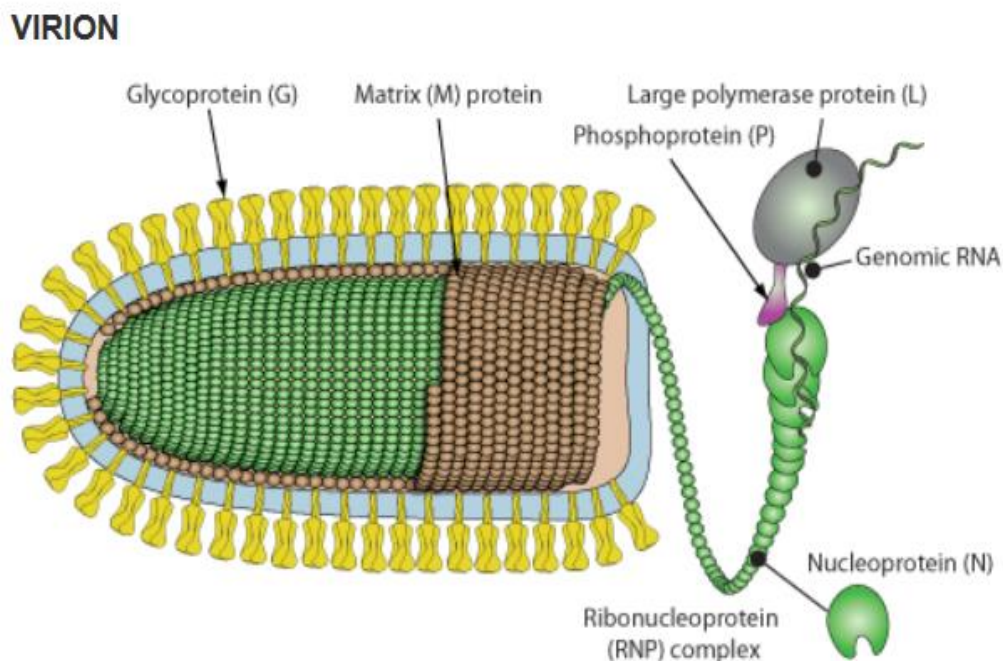
Der Eintritt des NDV in die Wirtszelle erfolgt über die Fusion des Virus mit der Zellmembran, die durch das Attachment-Protein HN und das Fusionsprotein F vermittelt wird [68]. HN bindet sich an Sialoglyko-Konjugate auf der Zelloberfläche und besitzt eine rezeptorspaltende (Sialidase) Aktivität [69]. Alle bisher entdeckten Paramyxoviren exprimieren ein homotrimeres Typ 1 Fusionsprotein. F-Proteine sind charakterisiert durch ein hydrophobes Fusionspeptid (FP), zwei Wiederholungsregionen (heptad repeat regions: HRA und HRB), eine Transmembrandomaine (TM) und enthalten ein c-terminales zytoplasmatisches Ende. Sie werden als inaktive F0-Vorstufen synthetisiert und werden anschließend in die aktive, metastabile F1- und F2-Form gespalten [68].

Rekombinante Newcastle Disease Viren der Linie Hitchner B1 (NDV/B1) zeigten eine effiziente Tumorzellzerstörung durch die Bildung von mehrkernigen Zellen, den sogenannten Synzytien. Das Fusionsprotein wurde dabei genetisch so modifiziert, dass es eine multibasische Spaltungs- und Aktivierungsstelle aufwies (rNDV/F3aa) [70]. Altomonte et al. generierten ein rekombinantes Newcastle Disease Virus, das eine L289A-Mutation im Fusionsprotein (rNDV/F3aa(L289A)) enthielt. Diese Mutation führte zu einer verstärkten Synzytienbildung zwischen hepatozellulären Karzinomzellen [71]. In dem L289A-modifizierten F-Protein wurde die Aminosäure Alanin (AS 289) durch die Aminosäure Leucin ersetzt [72].

NDV ist ein tumorspezifisches Virus, das sich in mehreren klinischen Studien als ein sicheres und effektives Therapeutikum für die Krebsbehandlung erwiesen hat. Newcastle Disease Viren replizieren sich selektiv in Tumorzellen und zerstören diese [71]. Gesunde infizierte Zellen lösen jedoch eine antivirale Immunreaktion aus, um eine Virusreplikation und den darauffolgenden Zellschaden zu verhindern. Der defekte Interferon-Signalweg in Krebszellen stellt eine optimale Angriffsfläche für das Virus dar. Newcastle Disease Viren weisen eine hohe Sensitivität für Interferone (IFN) auf und können sich vermehrt in neoplastischem Gewebe replizieren [65]. Laut einer Studie von 2006 lösen rekombinante NDV eine direkte onkolytische Apoptose durch multiple Caspasen-abhängige Wege aus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Virus die intrinsische Aktivität des mitochondrialen Zelltods fördert und dadurch den programmierten Zelltod initiiert [73].

## 6.2. Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)

Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) gehört zur Gattung *Vesiculovirus* der Familie *Rhabdoviridae*. Das Virusgenom setzt sich aus einer linearen, einzelsträngigen, negativ orientierten RNA zusammen. Eine Eigenschaft der viralen Produkte ist das Herunterregulieren der Genexpression infizierter Zellen. Die mutationsanfällige Genomreplikation führt zu einer hohen Variabilität der Tochtergenerationen und dadurch zu einer schnellen Anpassungsfähigkeit [74]. Das behüllte Virus ist charakterisiert durch ein kugelförmiges Profil und hat eine Größe von 70 x 200 nm [75]. (siehe Abb. 5)



**Abb. 5: Aufbau eines Vesikulären Stomatitis Virions; G: Glykoprotein; M: Matrixprotein; P: Phosphoprotein; L: RNA-Polymerase; N: Nucleoprotein; RNP: Ribonucleoprotein-Komplex; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

**Quelle: [67]**

Das virale Genom besteht aus ca. 11.000 bis 12.000 Nukleotiden und kodiert für fünf virale Proteine [76]: die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L), das Phosphoprotein (P), das Nucleoprotein (N), das Glykoprotein (G) und das Matrixprotein (M) [77]. Die

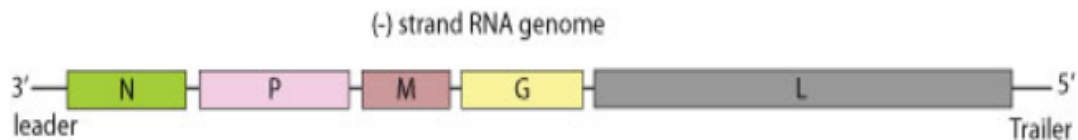
virale RNA wird von rund 1.200 Nukleoprotein-Molekülen umgeben und schließt sich mit der RNA-Polymerase und den Phosphoproteinen zum Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) zusammen (siehe Abb. 6) [77].

Grundsätzlich wurden zwei Serotypen, das Vesikuläre Stomatitis New Jersey Virus (VSVJV) und das Vesikuläre Stomatitis Indiana Virus (VSIV) beschrieben [78]. Die Vesikulärstomatitis betrifft vor allem Huftiere, die in erster Linie über Arthropoden infiziert werden. Das klinische Bild äußert sich durch eine starke Bläschenbildung bzw. Ulzerationen auf der Zunge, an den Zitzen, an den Klauen/Hufen und in der Maulhöhle. Bei Rindern und Schweinen lässt sich die Krankheit klinisch nicht von der Maul- und Klauenseuche unterscheiden [74].

Die Vesikuläre Stomatitis verursacht insbesondere in Teilen Zentral- und Südamerikas hohe wirtschaftliche Verluste. Die Inkubationszeit beträgt ca. ein bis drei Tage und die Virusverbreitung erfolgt über infektiösen Speichel. Bei Menschen kann die Infektion zu grippeähnlichen Symptomen führen; selten treten herpesähnliche Blasen an der Lippe auf [79].

VSV ist charakterisiert durch seine pantropische Infektiosität, die durch das Oberflächen-Glykoprotein G vermittelt wird. Finkelshtein et al. beschrieb die wichtige Bedeutung der Low density lipoprotein Rezeptoren (LDL-Rezeptoren) als Haupteintrittsquelle für Vesikuläre Stomatitis Viren in humane Zellen und in Mauszellen. Das Hinzufügen von löslichen LDL-Rezeptoren vor oder gleichzeitig mit dem VSV blockierte den zytopathischen Viruseffekt komplett. Die weitverbreitete Expression von LDL-Rezeptoren auf der Wirtszelle erklärt somit den Pantropismus von VSV [80].

Der Eintritt von VSV in die Wirtszelle erfolgt durch das Glykoprotein G, das sich an Rezeptoren der Wirtsoberfläche anheftet und zur Fusion mit der zellulären Membran führt [77]. Vesikuläre Stomatitis Viren infizieren ihre Wirtszellen über pH-abhängige [81] Clathrin-vermittelte Endozytose; jedoch sind einige Mechanismen bisher immer noch unklar [82].



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Vesikulären Stomatitis Genoms; N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; M: Matrixprotein; G: Glykoprotein; L: RNA-Polymerase; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

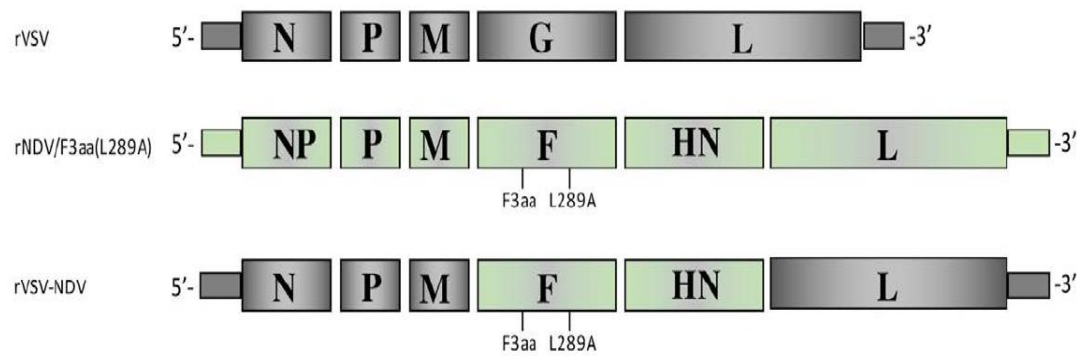
**Quelle: [67]**

Wildtyp-VSV oder genetisch veränderte VSV zeigten sich in mehreren präklinischen Studien als vielversprechende Therapeutika zur Behandlung von malignen Gliomen, Melanomen, hepatozellulären Karzinomen, Brust-Adenokarzinomen, Prostatatumoren oder Osteosarkomen [83-87]. Trotz der Erfolg versprechenden präklinischen Daten kann das Vesikuläre Stomatitis Virus durch die viralbedingte Neuro- und Hepatotoxizität klinisch nicht bedenkenlos eingesetzt werden [88-90]. Bei einem dreijährigen Jungen wurde von einer VSV-induzierten Encephalitis berichtet [91].

### **6.3. Rekombinantes VSV-NDV-Virus (rVSV-NDV)**

Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Jennifer Altomonte erzeugte ein chimäres VSV-NDV-Virus, das die positiven Effekte beider Elternviren beinhaltet und gleichzeitig die viralen Risikofaktoren reduziert. rVSV-NDV wurde aus dem sich schnell replizierenden VSV-Vektor generiert. Hierbei wurde das Glykoprotein G von dem VSV durch ein modifiziertes Fusionsprotein (F3aa(L289A)) und die Hämagglutinin-Neuraminidase von dem NDV ersetzt (siehe Abb. 7) [92].





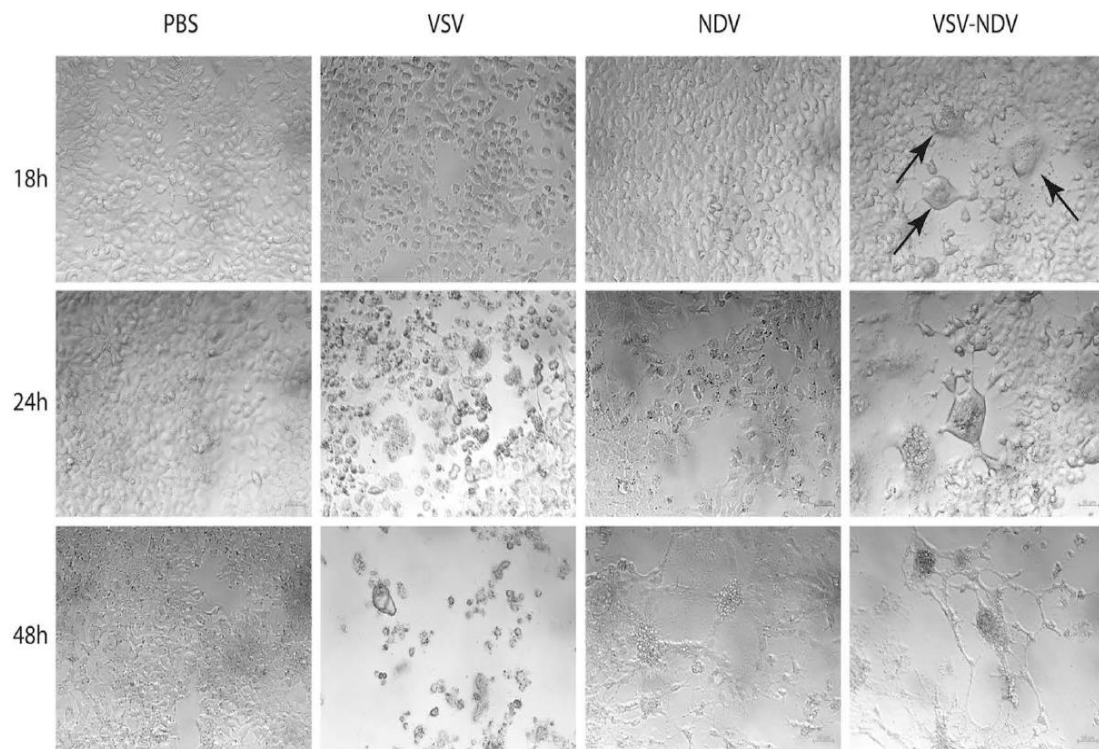
**Abb. 7: Konstruktion des rekombinanten VSV-NDV.** Das endogene Glykoprotein **G** von dem **rVSV** wurde durch das modifizierte Fusionsprotein (**NDV/F3aa(L289A)**) und das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (**NDV/HN**) von dem **rNDV** ersetzt. Die Abbildung zeigt das **rVSV**-, **rNDV/F3aa(L289A)**- und das **rVSV-NDV**-Genom. Gedruckt mit Genehmigung des Verlags.

**Quelle:** [92]

Mehrere Studien zeigen, dass die Inkorporation des hochfusogenen Fusionsproteins (F3aa(L289)) des NDV in das onkolytische Genom des VSV die intratumorale Virusausbreitung begünstigt. Außerdem konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit in orthotopen Ratten-HCC-Modellen nachgewiesen werden [93, 94].

Ein großer Vorteil des NDV ist die Funktion der Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und des Fusionsproteins (F). Sie vermitteln die Fusion infizierter Tumorzellen mit nicht infizierten Nachbarzellen und führen zur Bildung von mehrkernigen Synzytien. Der Mechanismus des synzytienbedingten Zelltodes wurde ausführlich untersucht und als immunogener Zelltod (Immunogenic cell death = ICD) beschrieben [95]. Die transgene Expression des NDV-F hatte ausschließlich die Funktion, eine Fusion mit benachbarten Zellen zu ermöglichen [94].

Abdullahi et al. zeigten, dass das chimäre rVSV-NDV eine schnelle und effiziente Synzytienbildung in humanen HCC-Zelllinien (Huh7 and HepG2) erzeugt (siehe Abb. 8). Des Weiteren konnten Abdullahi et al. eine signifikant reduzierte Zytotoxizität in gesunden Hepatozyten und Neuronen feststellen [92].



**Abb. 8: Infektion der humanen Zelllinie Huh7 mit rVSV, rNDV und rVSV-NDV mit einer MOI von 0.01; PBS diente hierbei als nicht infizierte Kontrolle; lichtmikroskopische Aufnahmen wurden nach 18, 24 und 48 Stunden angefertigt; gedruckt mit Genehmigung des Verlags**

**Quelle: [92]**

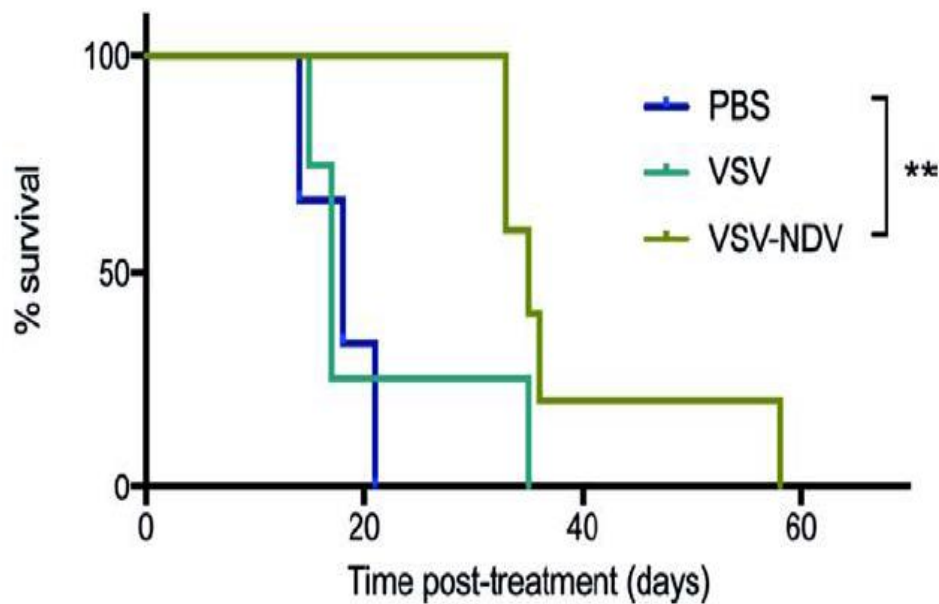
Um die Pathogenität in aviären Spezies untersuchen zu können, wurden spezifisch pathogenfreie (SPF), embryonierte Hühnereier mit rNDV-GFP und im Vergleich dazu mit rVSV-NDV beimpft. Im Gegensatz zu den rNDV-GFP beimpften Hühnereiern konnte in den rVSV-NDV-GFP infizierten Eiern keine Pathogenität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das chimäre VSV-NDV als lentogen und somit als nicht virulent für aviäre Spezies einzustufen ist [92].

Eine Überlebenszeitstudie in immunkompetenten AST Mäusen zeigte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Versuchsgruppe rVSV-NDV (siehe Abb. 9). Transgene AST Mäuse tragen ein Konstrukt, das aus einem leberspezifischen Albuminpromotor, einer loxP-flankierten Stoppkassette und dem Simian Virus 40 (SV-40) T-Antigen (Onkogen) besteht [96]. Orthotope HCC-Tumore wurden durch die

intravenöse Injektion von einem rekombinanten Adenovirus, das für die Cre-Rekombinase kodiert, induziert [92].

Die virale Therapie der AST Mäuse erfolgte durch systemische Injektionen in die Schwanzvene. Die mittlere Überlebenszeit von mit rVSV-NDV behandelten Mäusen lag bei 35 Tagen; bei der Kontrollgruppe PBS hingegen nur bei 17 Tagen. Die Versuchsgruppe mit dem parentalen rVSV-GFP zeigte keinen wesentlichen Effekt auf die Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die meisten onkolytischen Viren sind bei systemischer Verabreichung ineffizient. Aus diesem Grund war das rVSV-GFP in diesem Experiment nicht wirksam [92].

In dieser Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass das chimäre rVSV-NDV-GFP auch systemisch wirksam war und sich als ein effektives Therapeutikum für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms erwies [92].



**Abb. 9:** Die Schwanzveneninjektion von rVSV-NDV führte zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit in orthotopen, multifokalen HCC-Tumoren in AST Mäusen; Kontrollgruppe: PBS; Versuchsgruppen: rVSV-GFP, rVSV-NDV; % survival = prozentuales Überleben; Time post-treatment (days) = Zeit nach Behandlung (in Tagen); \*\* signifikanter Unterschied zwischen PBS und der Versuchsgruppe rVSV-NDV ( $p = 0.0042$ ); gedruckt mit Genehmigung des Verlags

Quelle: [92]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung einer Viro-Immuntherapie zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms. In den folgenden Versuchen wurden unterschiedliche Tiermodelle untersucht und das parentale VSV-GFP mit dem chimären VSV-NDV-GFP verglichen.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. *In-vitro* Experimente**

##### **1.1. Zellkultur und Zelllinien**

Die *in-vitro* Versuche wurden sowohl in einer Maus- als auch in unterschiedlichen Ratten-HCC-Zelllinien durchgeführt.

Bei der Maus-HCC-Zelllinie handelt es sich um RIL-175 Zellen, die von Tim Greten (National Institutes of Health) bezogen wurden. Die RIL-175 Zellen wurden in DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®) – mit 1 % Penicillin-Streptomycin (PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland) und 10 % FBS Superior (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) kultiviert.

Die *in-vitro* Ratten-HCC-Experimente wurden in DENA-Zellen (isoliert aus Diethylnitrosamin-induzierten HCC-Läsionen in Wistar-Ratten) und McA-RH7777 (Morris) Zellen durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene DENA-Zellklone (HCC-EB-2, HCC-EB-3, HCC-EB-6), die von Elisabeth Bliemsrieder (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) generiert wurden, analysiert.

Die DENA-Zellklone wurden in DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®) – in Kultur gehalten. Dem Medium wurde zusätzlich 10 % FBS Superior, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % HyClone™ Non Essential Amino Acids (NEAA) 100X Solution (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) hinzugefügt.

Die McA-RH7777 Zellen wurden in DMEM High Glucose (ATCC®) Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert.

Um den viralen Titer von VSV-NDV-GPF bestimmen zu können, wurden AGE1.CR.pIX Zellen in DMEM/F12 (1:1) – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®) – mit 5 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin in Kultur gehalten.

BHK-21 Zellen wurden in G-MEM BHK-21 – Glasgow Minimum Essential Medium (Gibco®) – kultiviert, um den Virustiter von VSV-GFP bestimmen zu können. Dem

### III. Material und Methoden

---

Medium wurde zusätzlich 10 % FBS, 2 % Tryptose Phosphate Broth Solution und 1 % Penicillin-Streptomycin hinzugefügt.

Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt.

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS	PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-Glutamine	PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland
Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tryptose Phosphate Broth Solution	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HyClone™ Non Essential Amino Acids (NEAA) 100X Solution	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Accutase	PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland
DMEM High Glucose	ATCC®
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco®
G-MEM BHK-21 – Glasgow Minimum Essential Medium	Gibco®
DMEM/F12 (1:1) – Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco®
OptiPRO™ SFM	Gibco®
RPMI 1640 Medium	Gibco®
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 1: Für die Versuche verwendete Reagenzien**

### **1.1.1. Charakterisierung unterschiedlicher HCC-Zelllinien**

Für die *in-vitro* Bestimmung der viralen Replikationskinetik und Zytotoxizität wurden die HCC-Zellen 72 Stunden vor der Virusinfektion auf 24-Well-Platten ausgesät. Die Zellkonzentration entsprach  $2 \times 10^5$  Zellen/Well zum Zeitpunkt der Infektion.

Die Infektion erfolgte mit VSV-NDV-GFP und im Vergleich dazu mit VSV-GFP. Es wurde mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 1 und .01 infiziert.

Das Zellmedium wurde abgesaugt und 100  $\mu$ l Virus/Well hinzugegeben. Dabei erhielten die nicht infizierten Kontroll-Well 100  $\mu$ l DPBS. Dann wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert, dreimal mit DPBS gewaschen und 1 ml Opti-MEM™ Medium (Gibco®) hinzugefügt. Für TCID 50s wurden 150  $\mu$ l Proben nach 0, 18, 24 und 48 Stunden genommen und bei -80 °C eingefroren. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden mit einem Carl Zeiss™ Mikroskop Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) Fotos gefertigt, um die Reaktion der infizierten Zellen zu dokumentieren.

Um die maximale LDH-(Laktatdehydrogenase-)Freisetzung bestimmen zu können, wurde nach 18, 24 und 48 Stunden 100  $\mu$ l Lysis Solution (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) pro nicht infiziertem Well dazu pipettiert. Anschließend wurden die Zellplatten 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, Proben genommen und bei -80 °C eingefroren.

Die Versuchsreihen wurden als Triplikate getestet. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt, damit eine Reproduzierbarkeit gewährleistet war. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

### **1.1.2. LDH-Aktivitätsbestimmung**

Um die Enzymaktivität der Zellen bestimmen zu können, wurden die zuvor genommenen Proben aufgetaut und davon jeweils 50  $\mu$ l in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 50  $\mu$ l CytoTox 96® Reagent (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) hinzugefügt und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 50  $\mu$ l Stop Solution (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) in jedes

Well pipettiert, Luftblasen mit einer 30-G-Kanüle zerstoehen und die Absorption bei 490 nm mit einem Sunrise™ Microplate-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen.

Von den ermittelten Probenwerten wurde der Durchschnittswert des Kulturmedium-Hintergrunds subtrahiert und die korrigierten Werte mit folgender Formel (nach den Herstellerangaben von Promega) berechnet:

$$\text{Prozentuale Zytotoxizität (\%)} = 100 \times \frac{\text{Experimentelle LDH-Freisetzung (OD490)}}{\text{Maximale LDH-Freisetzung (OD490)}}$$

*OD = Optische Dichte*

*Maximale LDH-Freisetzung = Mittelwert der genommenen Proben für die max. LDH-Freisetzung (siehe Kapitel III. 1.1.1.)*

#### **1.1.3. Tissue Culture Infection Dose 50 *in-vitro***

Infektiöse virale Titer wurden mittels Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID 50) bestimmt. Für VSV-GFP Proben wurden 10<sup>6</sup> BHK-21 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Es wurden 10-fache Verdünnungsstufen der entsprechenden Proben angelegt und in Quadruplikaten auf die Zellen pipettiert. 48 Stunden später wurden die virusspezifischen zytopathischen Effekte (CPE) unter einem Mikroskop ausgelesen.

Für die Bestimmung des VSV-NDV-GFP-Titers in den Proben wurden 2 x 10<sup>6</sup> AGE1.CR.pIX Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Wie bereits beschrieben wurden 10-fache Verdünnungsstufen angelegt und die Platten nach 72 Stunden ausgewertet.

Die viralen Titer wurden anschließend mittels der Spearman-Kärber-Methode kalkuliert.



### III. Material und Methoden

<b>Materialien/Geräte</b>	<b>Firma</b>
75-cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
175-cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
150-cm <sup>2</sup> -Zellkulturplatten	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
96-Well-Platte	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
12-Well-Platte	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
24-Well-Platte	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
100 - 1000 µl Pipette, Research plus <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
20 - 200 µl Pipette, Research plus <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2 - 20 µl Pipette, Research plus <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0,5 - 10 µl Pipette, Research plus <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tip One RPT, Pipettenspitze 10 µl RNase-, DNase-, DNA- und Pyrogen-frei	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
RPT Filterpipettenspitzen, 20 µl	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
Universal Fit Pipet Tips, 200 µl	Corning Inc., Corning, USA
ClearLine <sup>®</sup> Filterpipettenspitzen, 1000 µl	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Stripettor <sup>™</sup> Ultra pipet controller	Corning Inc., Corning, USA
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 2 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikroskop: OPTECH <sup>®</sup> Optical Technology	Exacta+Optech GmbH, München, Deutschland
Carl Zeiss <sup>™</sup> Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen,

### III. Material und Methoden

---

	Deutschland
Sunrise™ Microplate – Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HERAsafe, Scientific Biological Safety Cabinet	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
HERAcell Heraeus, CO <sub>2</sub> -Incubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reax top Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland

**Tabelle 2: Für die Versuche verwendete Materialien und Geräte, die in den einzelnen Kapiteln nicht explizit aufgeführt sind**

## **2. In-vivo Experimente**

### **2.1. Versuchstiere**

Die Versuche wurden im Rahmen der von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsanträge (Az.: 55.2-1-54-2532-16-2015 und 55.2-2532.Vet\_02-18-122) durchgeführt.

Für die Mausstudien wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, die über Charles River bezogen wurden.

Sowohl die Mäuse als auch die Ratten waren männliche Tiere in einem Alter von 6-8 Wochen (zum Zeitpunkt des Studienbeginns).

Im Rattenmodell handelte es sich um Buffalo Ratten (BUF/CrCrI), die von Charles River (Calco) gezüchtet wurden.

### **2.2. Versuchstierhaltung**

Die Haltung der Tiere erfolgte im TranslaTUM (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 2010/63 festgelegten Bedingungen.

Die Versuchstiere wurden in speziellen einzelbelüfteten Käfigen (Tecniplast-IVC) gehalten. Die Rattenkäfige (H: 20 cm; B: 22 cm; T: 37 cm) waren mit maximal zwei Ratten besetzt. Die maximale Besatzdichte in einem Mäusekäfig (Typ- I Superlong; Grundfläche 16 x 37 cm) richtete sich gemäß der EU-Richtlinie 2010/63 nach dem Gewicht der Tiere.

Der Hygienestatus der Versuchstiere entsprach SPF-Niveau.

Futter (autoklaviertes Futter Ratte/Maus, 10 mm Vierkant, pelletiert, Haltungsfutter No. 1324, Fa. Altromin) und Wasser (Trinkwasserwechsel zweimal pro Woche) erhielten die Tiere *ad libitum*.

Neben dem normalen Holzgranulateinstreu (Select Fine, Ssniff) standen den Tieren Zellstoff als Nestbaumaterial, sowie Kriechtunnel aus rotem Polycarbonat und Papphäuser (Fa. Bioscape) zur Verfügung.

Die Tierräume sind so konzipiert, dass ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden (mit Dämmerungsphase und ohne Ultraschall-Emissionen) und eine Luftfeuchte von 45–60 % gewährleistet ist. In den Haltungsräumen herrscht Überdruck und eine Temperatur von 20–24 °C.

Die Versuchstiere wurden von der den Versuch durchführenden Person kontrolliert und täglich von ausgebildetem Pflegepersonal in Augenschein genommen.

## **2.3. HCC-Mausmodelle**

Die folgenden Mausstudien wurden an immunkompetenten C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Es wurden zwei Überlebenszeitstudien und eine Kinetikstudie durchgeführt.

### **2.3.1. Präparation der RIL-175 Zellen für die subkutane Tumorimplantation**

Für die subkutane Tumorimplantation wurden die RIL-175 Zellen (syngene Zellen der C57BL/6 Mäuse) wie bereits in Kapitel III. 1.1. beschrieben in Kultur gehalten. 48 Stunden vor der Implantation wurden die Zellen in 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät.

Das Medium (Gibco® DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – mit 10 % FBS und 5 ml Penicillin/Streptomycin) wurde abgesaugt und die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen. Um die RIL-175 Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen, wurde 2 ml Accutase (PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland) hinzugefügt.

Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und erneut bei 500 g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und die Zellen daraufhin mit einem Zellzähler (LUNA-FL™, Logos Biosystems) gezählt.

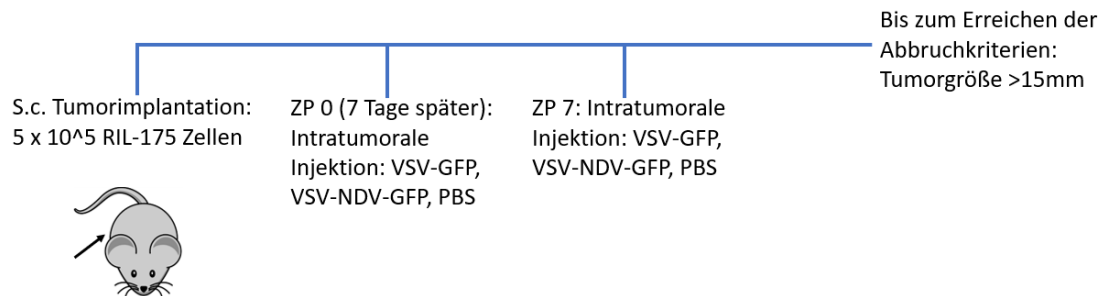
Die Zellkonzentration wurde so berechnet, dass eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  RIL-175 Zellen/100 µl PBS zustande kam.

### 2.3.2. Subkutane Tumorimplantation

Einen Tag vor der Tumorimplantation wurden die Mäuse an der entsprechenden Injektionsstelle rasiert, um eine exakte subkutane Injektion sicherstellen zu können.

Die Mäuse wurden mit einer Hand fixiert und die RIL-175 Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l PBS) mit einer 29-G-Insulinspritze (BD Plastipak™ 1 ml Sub-Q-Spritze) in die ventrale Flanke appliziert.

### 2.3.3. Überlebenszeitstudie bei einseitiger Tumorimplantation



**Abb. 10: Versuchsaufbau: Einseitige Tumorimplantation und intratumorale Therapie; ZP: Zeitpunkt (in Tagen)**

Den Mäusen wurden einseitig RIL-175 Tumorzellen subkutan implantiert. Sieben Tage später, zum Zeitpunkt 0, erfolgte die erste intratumorale Injektion (siehe Abb. 10). Den Versuchsgruppen wurde der virale Vektor VSV-GPF oder VSV-NDV-GFP mit einer 29-G-Insulinspritze (BD Plastipak™ 1 ml Sub-Q Spritze) injiziert. Das Applikationsvolumen betrug 50  $\mu$ l mit einer Virusmenge von  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> (suspendiert in PBS). Die Kontrollgruppe erhielt dementsprechend 50  $\mu$ l PBS.

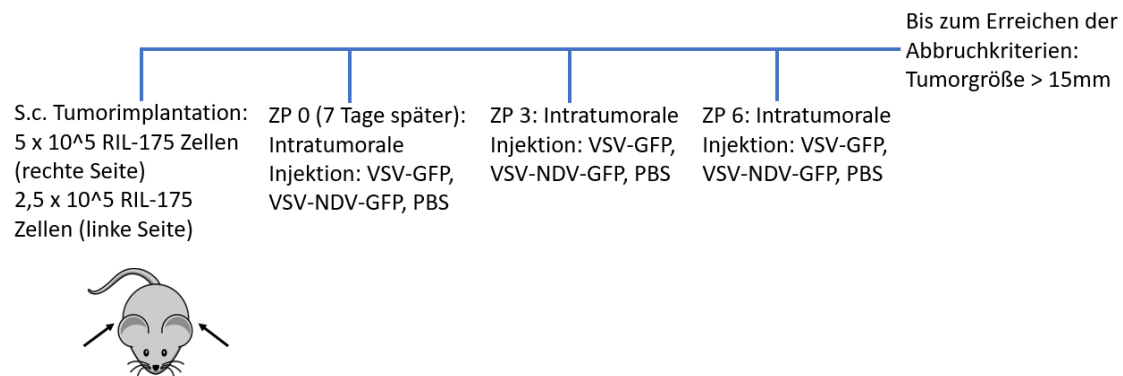
Es folgte eine zweite intratumorale Injektion nach sieben Tagen. Ab dem Zeitpunkt 0 wurden die Mäuse täglich kontrolliert, die Tumorgröße mit einem Messschieber (Horex Digitaler Messschieber IP67, Hoffmann GmbH, München, Deutschland) ermittelt und das Tumolvolumen mit folgender Formel berechnet:

Formel:  $V = a \times (b)^2 / 2$

Quelle: [97]

Bei Erreichen der Abbruchkriterien (Tumorgroße > 15 mm, Tumorrupatur) wurden die Tiere in Vollnarkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation euthanasiert. Die Überlebenszeit der einzelnen Versuchsgruppen wurde mit der Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve dargestellt.

### 2.3.4. Überlebenszeitstudie bei beidseitiger Tumorimplantation



**Abb. 11: Versuchsaufbau: Beidseitige Tumorimplantation und intratumorale Therapie; ZP: Zeitpunkt (in Tagen)**

Die Tumorimplantation erfolgte beidseits, wobei auf der rechten Seite eine Zellkonzentration von  $5 \times 10^5$  RIL-175 Zellen injiziert wurde und auf der linken Seite eine Zellkonzentration von  $2,5 \times 10^5$  RIL-175 Zellen (siehe Abb. 11). Eine Woche später (zum Zeitpunkt 0) wurden die Mäuse entsprechend der Überlebenszeitstudie bei einseitiger Tumorimplantation (Kapitel III. 2.3.3.) therapiert. Hierbei wurde nur der Tumor auf der rechten Seite injiziert, um eine Immunreaktion auf der Gegenseite erkennen bzw. nachweisen zu können.

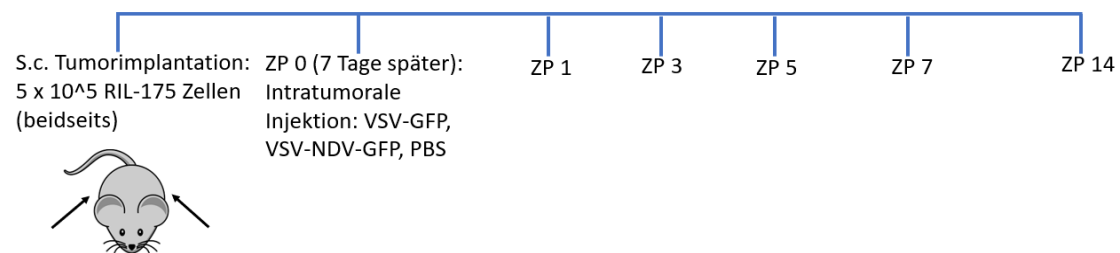
Es folgten zwei weitere intratumorale Injektionen auf der rechten Seite im Abstand von jeweils drei Tagen. Die Mäuse wurden bis zum Erreichen der Abbruchkriterien täglich kontrolliert und die Tumorgröße mit einem Messschieber (Horex Digitaler Messschieber IP67, Hoffmann GmbH, München, Deutschland) ausgemessen.

Das Tumolvolumen wurde mit folgender Formel (übernommen von der Arbeitsgruppe Poeck, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) berechnet:

$$\text{Formel: } V = \frac{4}{3} * PI() * ((L+W) / 4)^3$$

$L = \text{Length (Länge)}$ ;  $W = \text{Width (Breite)}$

#### 2.3.5. Kinetikstudie



**Abb. 12: Versuchsaufbau: Kinetikstudie; ZP: Zeitpunkt (in Tagen)**

Für die Kinetikstudie wurde den Mäusen beidseits subkutan 5 x 10<sup>5</sup> RIL-175 Tumorzellen implantiert. Sieben Tage nach der Implantation wurde der rechte Tumor intratumoral therapiert. Die Versuchsgruppen VSV-GPF und VSV-NDV-GFP erhielten eine Virusmenge von 1 x 10<sup>7</sup> TCID 50 (suspendiert in 50 µl); die Kontrollgruppe dementsprechend 50 µl PBS.

Anschließend wurden 6 Versuchstiere pro Zeitpunkt (1, 3, 5, 7 und 14 Tage nach der intratumoralen Therapie) und pro Gruppe euthanasiert, um die Kinetik der Virusreplikation sowie die Kinetik der induzierten Immunantwort überprüfen zu können.

### 2.3.6. Tumoranalyse

Nach der Euthanasie der Mäuse (siehe Abb. 12) wurden die HCC-Tumore freipräpariert und entnommen. Die Tumore wurden anschließend mit einem Einmalskalpell (Einmalskalpell Nr. 22, Feather) halbiert. Die eine Hälfte wurde histologisch untersucht. Die andere Hälfte war für die Bestimmung der TCID<sub>50</sub> und der Durchflusszytometrie (FACS) vorgesehen.

#### 2.3.6.1. Histologie

Die Tumorthälften für die Histologie wurden in 12-Well-Platten (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 2 ml PFA 4%ig (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)/Well fixiert. Nach 48 Stunden wurde das 4%ige PFA abgesaugt und durch 70%iges Ethanol ersetzt. Weitere 24–48 Stunden später wurden die Tumorproben über ein automatisch ablaufendes Programm in einer aufsteigenden Alkohol-/Xylolreihe entwässert (Entwässerungsmaschine Leica ASP300, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Einbettung in Paraffin (70 °C, beheizbare Paraffinausgießstation mit Mikroprozessorsteuerung Leica EG1150 H; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) erfolgte manuell.

Nach dem Aushärten konnten die Paraffinblöcke in der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der TU München geschnitten und anschließend unterschiedlichen Färbungen unterzogen werden. Für die Histologie wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach dem folgenden standardisierten Protokoll (siehe Tabelle 3) angefertigt

<b>Färbeschritt</b>	<b>Verwendete Substanz</b>	<b>Zeit</b>
1	Aqua dest.	25 s
2	HTX-Mayer	8 min
3	Fließendes Leitungswasser	10 min
4	Eosin alkoholisch 1 %	4 min



5	Alkohol 96 %	30 s
6	Alkohol 100 %	25 s
7	Alkohol 100 %	25 s
8	Xylol	1,5 min
9	Xylol	1,5 min

**Tabelle 3: Standardisiertes Protokoll der HE-Färbung mit verwendeten Substanzen und Zeitangabe**

Im Anschluss an die histologische Färbung wurden die einzelnen Proben auf das Vorkommen von Zellnekrosen und einer Immunzellinfiltration untersucht.

#### **2.3.6.2. Durchflusszytometrie (FACS) und TCID 50**

Die Tumorproben für die Durchflusszytometrie und TCID 50s wurden gewogen (Analysenwaage, KERN AGB) und in 12-Well-Platten (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 1 ml Medium (RPMI 1640 Medium, Gibco®, ohne FBS, mit 5 ml Penicillin/Streptomycin)/Well transferiert.

Das Tumorgewebe wurde mit einem Einmalskalpell (Einmalskalpell Nr. 22, Feather) zerkleinert. Dem tumorösen Gewebe wurde 20 µg/ml Liberase (Roche Deutschland Holding GmbH) hinzugefügt, um den Tumor zu mazerieren und eine einheitliche Zellsuspension zu erhalten.

Anschließend wurden die Proben bei 37 °C 30 Minuten im Inkubator (HERAcell Heraeus, CO<sub>2</sub>-Incubator, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert und alle 5 Minuten bewegt.

Im weiteren Verlauf wurden die Tumorproben durch einen 100 µm Filter (EASYstrainer™, Greiner Bio-One) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert und mit 10 ml Medium (RPMI 1640 Medium, Gibco®, mit FBS und 1 % Penicillin-

Streptomycin) gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 500 g 15 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das entstandene Zellpellet wurde in 500 µl Medium (RPMI 1640 Medium, Gibco®, mit FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin) resuspendiert und 50 µl davon für TCID 50s bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die verbliebenen Proben zuerst mit Medium (RPMI 1640 Medium, Gibco®, mit FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin) gewaschen, 10 Minuten bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mit PBS wiederholt.

Für die Durchflusszytometrie (FACS) wurde die restliche Zellsuspension in eine 96-Well-Platte (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Die Platte wurde (bei 450 rpm, 2 min) abzentrifugiert, 100 µl FCR Block (FCR Blocking Reagent mouse, Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland)/Well (PBS + FCR Block (1:200)) hinzugegeben und bei 4 °C 25 Minuten im Dunkeln (aufgrund der lichtempfindlichen Fluorophore) inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 100 µl PBS + 10 % FCS pro Well in die Platte pipettiert und der Überstand anschließend abzentrifugiert (bei 450 rpm, 2 min).

Die Proben wurden nach Hinzufügen von 50 µl Antikörper-Mix (siehe Tabelle 4) 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes folgte ein Waschschrift mit 150 µl PBS, bevor sie nochmals abzentrifugiert (bei 450 rpm, 2 min) wurden. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die entstandenen Zellpellets in 200 µl PBS resuspendiert.

Die Tumorproben wurden in FACS Tubes (Micronic, Lelystad, Niederlande) pipettiert und daraufhin mit dem Durchflusszytometer (Gallios™ Durchflusszytometer von Beckman Coulter) gemessen. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit der FlowJo™ Software (Becton Dickinson GmbH) ausgewertet.

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CD3e-Vioblue mouse	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD8a-APC-Vio770 mouse	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD279(PD1) -PE mouse	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD274(PD-L1) -APC	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

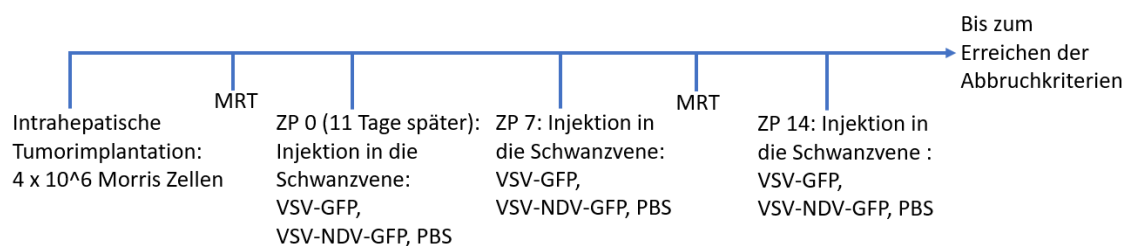
**Tabelle 4: Zusammensetzung Antikörper-Mix (AK: 1:100); die Verdünnung erfolgte in PBS**

Die Proben für die TCID 50s wurden aufgetaut und mit Triton X .001 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) 30 Minuten auf Eis inkubiert, um das Virus aus den Zellen freizusetzen. Als Nächstes wurden die Tumorproben 1 Minute lang gevortext, anschließend bei maximaler Geschwindigkeit über 1 Minute abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die verbliebenen Zellreste verworfen.

Die TCID 50s wurden wie bereits in Kapitel III. 1.1.3. beschrieben durchgeführt. Zur Vermeidung einer bakteriellen bzw. mykotischen Kontamination wurden dem Medium für die Verdünnungsstufen zusätzlich noch Antibiotika und Antimykotika (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 500 µl pro 50 ml Medium) hinzugefügt.

## 2.4. HCC-Rattenmodell

Für die Überlebenszeitstudie im Rattenmodell wurden den Buffalo (BUF/CrCrl) Ratten Morris-Tumorzellen intrahepatisch implantiert (siehe Abb. 13). Um eine Aussage über das Tumorstadium treffen zu können, wurden die Tiere zweimal (im Abstand von zwei Wochen) mittels Magnetresonanztomographie gescannt. An Tag 11 *post implantationem* erfolgte die erste therapeutische Behandlung über die Schwanzvene. Im Abstand von sieben Tagen folgten dann zwei weitere intravenöse Injektionen.



**Abb. 13: Versuchsaufbau: Überlebenszeitstudie im Rattenmodell; MRT: Magnetresonanztomographie; ZP: Zeitpunkt (in Tagen)**

### 2.4.1. Präparation der McA-RH7777 Zellen für die intrahepatische Tumorimplantation

Die McA-RH7777 Zellen (syngene Zellen der Buffalo Ratten) wurden wie bereits in Kapitel III. 1.1. beschrieben kultiviert. Für die unifokale intrahepatische Tumorimplantation wurden die Zellen 72 Stunden zuvor auf 150-cm<sup>2</sup>-Zellkulturplatten ausgesät.

Das vorhandene Medium (20 ml ATCC DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin) wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS (20 ml) gewaschen und anschließend trypsiniert (3 ml Trypsin/EDTA). Nachdem sich die Zellen von den Zellkulturplatten gelöst hatten, wurde die Trypsin-Aktivität mit 3 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen transferiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert, mit einem Zellzähler (LUNA-FL™, Logos Biosystems) gezählt und nochmals bei 1500 rpm über 5 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit ATCC DMEM Medium (ohne FBS und Penicillin-Streptomycin) so suspendiert, dass eine Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/20µl zustande kam.

#### **2.4.2. Unifokale intrahepatische Tumorimplantation**

Zwanzig Minuten vor dem geplanten Eingriff erhielten die Ratten eine präoperative Analgesie mit Buprenorphin (0,05 mg/kg). Für die intrahepatische Tumorimplantation wurden die Ratten in Inhalationsnarkose mit Isofluran und Sauerstoff (als Trägergas) gelegt.

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Induktionskammer (Induction chamber rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Schweiz) mit 4 % Isofluran und einem Sauerstoffdurchfluss von 2 Litern pro Minute. Die narkotisierten Tiere wurden anschließend an eine Maske umgelagert und die Isoflurandosis auf eine Erhaltungsdosis von 2,5 % reduziert. Zur Aufrechterhaltung der Atemfrequenz wurde die Isoflurandosis individuell angepasst.

Während der Narkose waren die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert, um eine Auskühlung zu verhindern. Zum Schutz der Cornea erfolgte eine Applikation mit Augensalbe (Bepanthen®).

Die Ratten wurden rasiert und die Haut mit 80 % Ethanol und Braunol® desinfiziert. Anschließend wurde die Bauchhöhle ventral eröffnet (max. Inzision von 2 cm) und die Morris-Tumorzellen ( $4 \times 10^6$  Zellen/20µl) unter einem Dissektionsmikroskop intrahepatisch in den *Lobus hepatis sinister lateralis* unter die Leberkapsel injiziert. Für die Injektion wurde eine Hamilton Syringe mit einer 27-G-Kanüle benutzt. Die Einstichstelle wurde sofort kauterisiert, um ein Austreten der Zellen zu verhindern. Der Verschluss der Operationsstelle erfolgte durch eine muskuläre und kutane Naht (4-0 PROLENE®).

Postoperativ erhielten die Ratten eine analgetische Abdeckung durch eine einmalige Gabe von Metamizol (Novalgin®; 50 mg/kg per os) und weitere Buprenorphin–

injektionen (0,05 mg/kg) im Acht-Stunden-Intervall für 36 Stunden. Einer Dehydrierung wurde durch die subkutane Gabe von NaCl 0,9 % (5 ml) vorgebeugt.

Die Tiere wurden regelmäßig auf ihre Gewichtsentwicklung und den Allgemeinzustand kontrolliert. Bei Erreichen der Abbruchkriterien erfolgte die Euthanasie durch intracardiale Entblutung in Vollnarkose. Zu den Abbruchkriterien (festgelegt im Tierversuchsantrag Az. 55.2-2532.Vet\_02-18-122) zählten unter anderem: ein Gewichtsverlust von mehr als 15 % des präoperativen Körpergewichts; ein Allgemeinzustand, der auf eine erhebliche Belastung hinwies, wie z.B. Apathie, gekrümmte Haltung, blutiger Kot oder Blut an Körperöffnungen; Verhaltensänderungen, die auf eine erhebliche Belastung hinwiesen, wie z.B. Isolation oder Autoaggression; klinische Befunde, die keine Besserung erwarten ließen, wie z.B. Pumpatmung, Ikterus oder Aszites.

<b>Operationsbesteck</b>	<b>Firma</b>
Chirurgische Scheren (scharf, stumpf, gerade), 17 cm	FST
Alm Retractor (gebogen), 7 cm	FST
Pinzetten (chirurgisch, anatomisch), 7 cm, 12 cm	FST
Einmalskalpell Nr. 22	Feather
PROLENE 4-0	Ethicon
Hamilton® Syringe 50 µl	Sigma-Aldrich
Bovio Cauterizer Kit	FST

**Tabelle 5: Für die intrahepatische Tumorimplantation benötigte Instrumente**

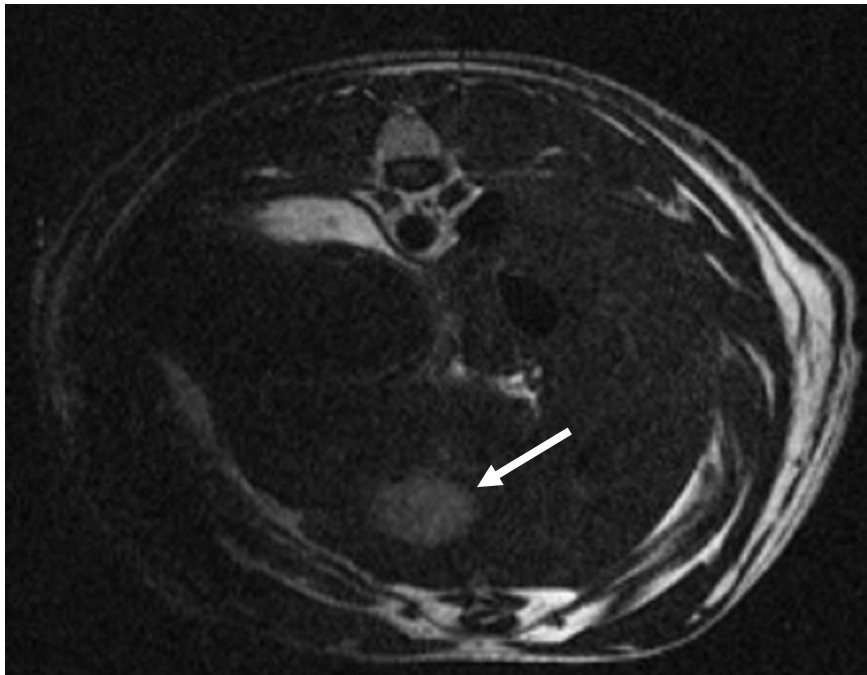
#### **2.4.3. Bildgebung**

Für die Magnetresonanztomografie (MRT) wurden die Ratten in Inhalationsnarkose mit Isofluran und Sauerstoff (Trägergas) gelegt. Die Einleitung erfolgte in einer Induktionskammer (Induction chamber rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Schweiz) mit 4 % Isofluran und einem Sauerstoffdurchfluss von 2 Litern pro Minute. Die narkotisierten Tiere wurden anschließend an eine Kopfkammer im MRT-Gerät

umgelagert und die Isoflurandosis auf eine Erhaltungsdosis von 2,5 % reduziert. Nach Bedarf wurde die Isoflurandosis individuell angepasst, um die Atemfrequenz aufrechtzuerhalten. Um einer Austrocknung der Hornhaut vorzubeugen wurde eine Augensalbe (Bepanthen®) appliziert.

Die Ratten wurden in einem Kleintier-Magnetresonanztomographen im TranslaTUM (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) gescannt. Bei dem MRT-Gerät handelt es sich um ein nanoScan®-Gerät mit einer Multicell™-Bildgebungskammer für Versuchstiere (Mediso GmbH – Medical Imaging Systems, Münster, Deutschland).

Abb. 14 zeigt ein hepatozelluläres Karzinom zehn Tage nach intrahepatischer McA-RH7777 (Morris) Implantation. Zu diesem Zeitpunkt lag der Durchmesser der HCC-Tumore in einem Bereich von 5 bis 10 Millimetern und entsprach dem Kriterium für die systemische Therapie.



**Abb. 14: Hepatozelluläres Karzinom 10 Tage nach intrahepatischer McA-RH7777 Implantation ( mit Pfeil markiert)**

#### **2.4.4. Intravenöse Injektion in die Schwanzvene**

Elf Tage nach der intrahepatischen Tumorimplantation erfolgte die Therapie über eine systemische Injektion in die Schwanzvene. Die Ratten wurden dreimal im Abstand von einer Woche intravenös injiziert.

Für die Injektion wurden die Tiere in einem Tail-first-Restrainer (Broome Rodent Restainers, Harvard Apparatus) fixiert. Der Schwanz wurde gezielt durch die Bestrahlung mit einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine Vasodilatation zu erreichen. Zur Desinfektion der Haut wurde Alkohol (Ethanol 80 %) aufgetragen und der virale Vektor durch eine 27-G-Kanüle injiziert. Die Versuchsgruppen erhielten dabei VSV-GFP oder VSV-NDV-GFP. Das Applikationsvolumen pro Injektion betrug 200 µl mit einer Virusmenge von  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> (suspendiert in PBS). Die Kontrollgruppe erhielt analog 200 µl PBS.

Die Ratten wurden täglich kontrolliert und bei Erreichen der entsprechenden Abbruchkriterien euthanasiert (siehe Kapitel III. 2.4.2.). Des Weiteren waren noch virusspezifische neurologische Symptome, wie Kopfschiefhaltung, Circling oder Paresen jeglicher Form, ein Abbruchkriterium, das zur Euthanasie führte.

Die Überlebenszeit nach der Behandlung wurde als Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt.

### **3. Statistische Analyse**

Alle statistischen Analysen wurden mit *Prism* Version 7 (GraphPad Software) durchgeführt. Hierbei wurde von einem Konfidenzintervall von 95 % ausgegangen. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant eingestuft.

Ein Asterisk \* bedeutet, dass der p-Wert unter 0,05 ist. Bei zwei Asterisken \*\* liegt der p-Wert unter 0,01 und bei drei Asterisken \*\*\* unter 0,001.

Die Überlebenszeiten der Versuchstiere wurden mit der Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve dargestellt und mit dem Log-rank Test analysiert. Einzelne Datenpunkte der Experimente wurden mit dem Two-sided Student's t-test auf ihre statistische Signifikanz untersucht.



## **IV. ERGEBNISSE**

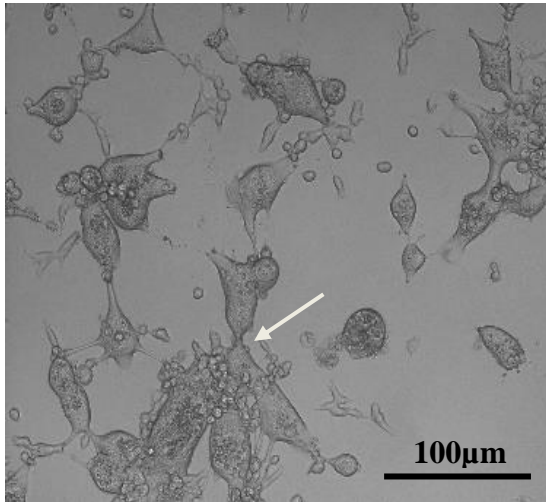
### **1. *In-vitro* Charakterisierung verschiedener HCC-Zelllinien**

*In-vitro* Versuche wurden für die Bestimmung der relativen Suszeptibilität unterschiedlicher rodenter HCC-Zellen für die Infektion mit VSV-NDV-GFP durchgeführt. Im Vergleich zu dem rekombinanten Virus wurden die hepatozellulären Karzinomzellen mit dem parentalen VSV-GFP infiziert.

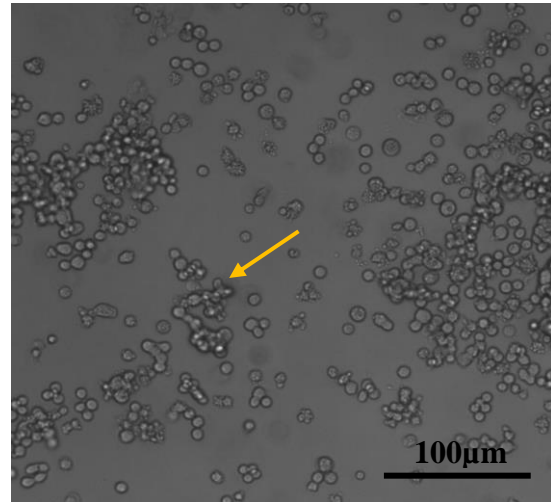
Die Experimente wurden in vier unterschiedlichen Rattenzelllinien und in einer Mauszelllinie durchgeführt. Virale Infektionen erfolgten jeweils mit einer MOI von .01 und 1.

Abb. 15 zeigt die lichtmikroskopische Morphologie von hepatozellulären Karzinomzellen 18 Stunden nach der Infektion mit VSV-NDV-GFP und mit VSV-GFP. Es konnte eine charakteristische Synzytienbildung zwischen benachbarten mit VSV-NDV-GFP infizierten HCC-Zellen nachgewiesen werden. Das parentale VSV-GFP führte hingegen zu einem schnellen Zelltod mit typischerweise abgerundeten Zellen.

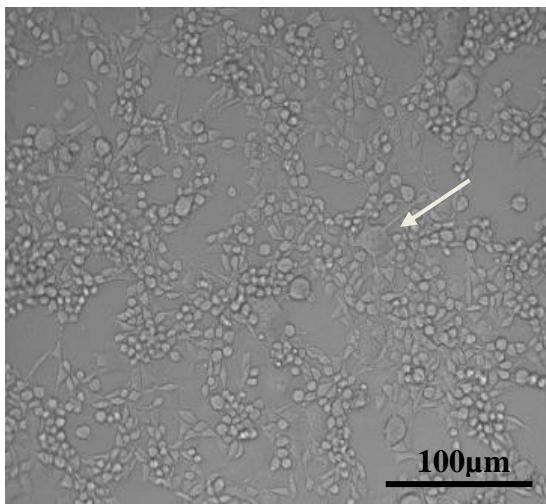
a) VSV-NDV-GFP



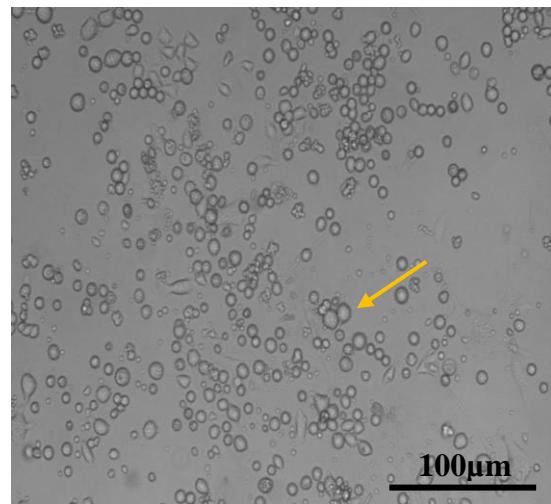
VSV-GFP



b) VSV-NDV-GFP



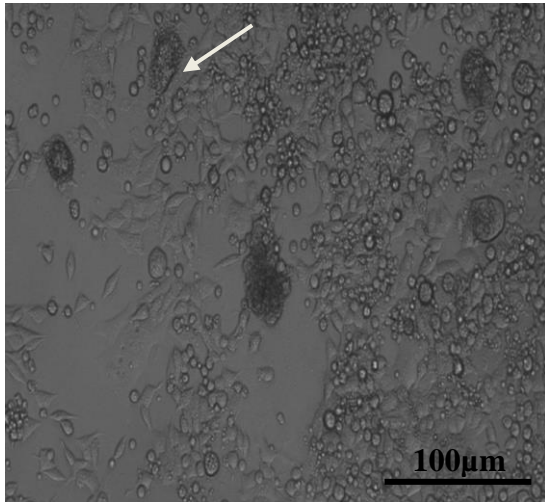
VSV-GFP



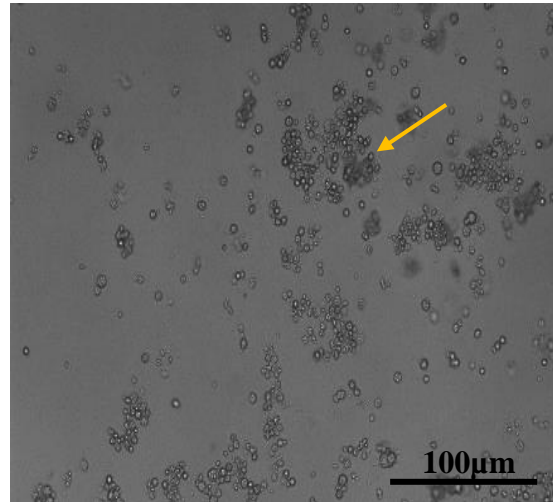
**Abb. 15: Lichtmikroskopische Morphologie infizierter HCC-Zellen (*in-vitro*); 18 Stunden nach VSV-NDV-GFP bzw. VSV-GFP Infektion (MOI 1); a) Morris Hepatoma Zellen (McA-RH7777); b) DENA Zellklon HCC-EB-2; charakteristische Synzytienbildung (mit weißem Pfeil markiert); typisch abgerundete Zellen (mit gelbem Pfeil markiert)**

Abb. 16 veranschaulicht charakteristische mehrkernige Synzytien von mit VSV-NDV-GFP infizierten Ratten-HCC-Zellen und im Vergleich dazu typisch abgerundete tote Zellen nach der Infektion mit VSV-GFP (48 Stunden *post infectionem*).

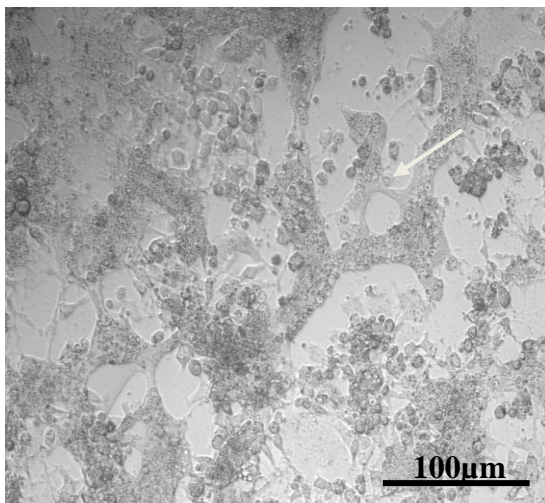
a) VSV-NDV-GFP



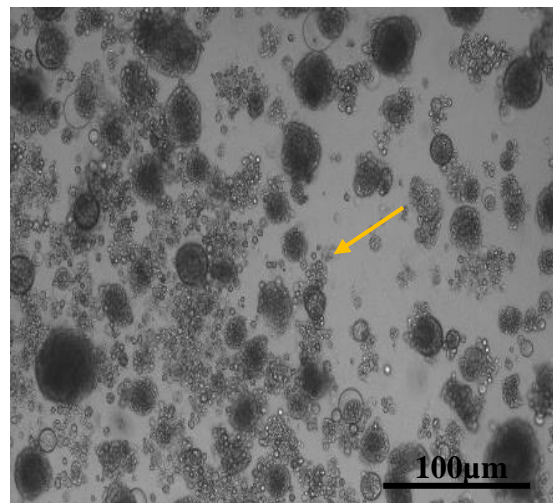
VSV-GFP



b) VSV-NDV-GFP



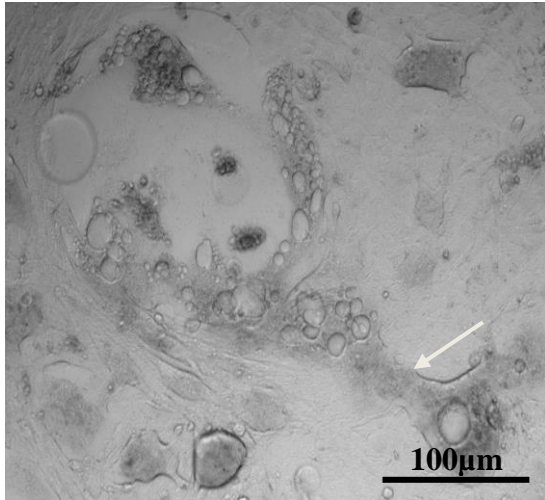
VSV-GFP



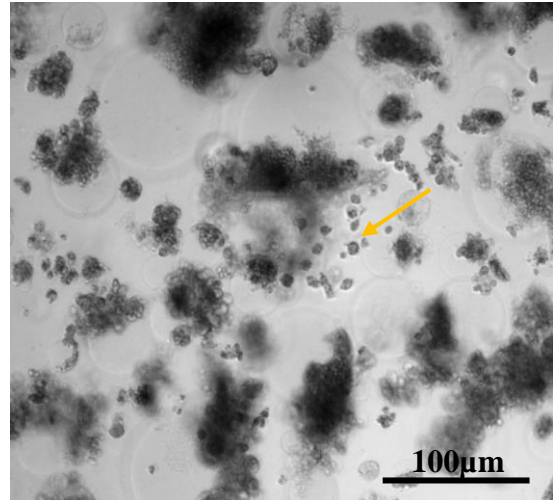
**Abb. 16: Lichtmikroskopische Morphologie infizierter HCC-Zellen (*in-vitro*); 48 Stunden nach VSV-NDV-GFP bzw. VSV-GFP Infektion (MOI .01); a) DENA Zellklon HCC-EB-3; b) DENA Zellklon HCC-EB-6; charakteristische Synzytienbildung (mit weißem Pfeil markiert); typisch abgerundete Zellen (mit gelbem Pfeil markiert)**

In Abb. 17 ist die *in-vitro* Infektion der murinen RIL-175 Zellen mit VSV-NDV-GFP und VSV-GFP dargestellt.

**a) VSV-NDV-GFP**



**b) VSV-GFP**



**Abb. 17: Lichtmikroskopische Morphologie der RIL-175 Zellen (*in-vitro*) 48 Stunden *post infectionem* (MOI 1); a) VSV-NDV-GFP Infektion; b) VSV-GFP Infektion; charakteristische Synzytienbildung (mit weißem Pfeil markiert); typisch abgerundete Zellen (mit gelbem Pfeil markiert)**

Sowohl die unterschiedlichen Ratten-HCC-Zellen (DENA Zellklon HCC-EB-2, HCC-EB-3, HCC-EB-6; Morris Hepatoma Zellen (McA-RH7777)), als auch die murinen RIL-175 Zellen ließen sich mit dem chimären VSV-NDV-GFP und mit dem parentalen VSV-GFP infizieren.

### 1.1. Virusbedingte LDH-Freisetzung

Zur Bestimmung der viralen Zytotoxizität mittels LDH-Assay wurden Proben 18, 24 und 48 Stunden *post infectionem* genommen.

Die Analyse der erhaltenen Daten zeigte, dass die Infektion der DENA Zelllinie HCC-EB-3, HCC-EB-6 und der murinen Zelllinie RIL-175 mit VSV-GFP im Vergleich zur Infektion mit VSV-NDV-GFP einen höheren Anstieg der Zytotoxizität in der Zeitspanne von 18 bis 24 Stunden aufwies (siehe Abb. 18 a – e)).

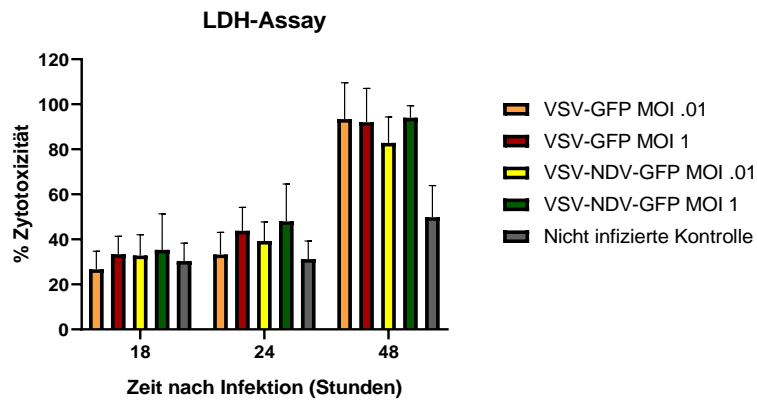
Die maximalen Zytotoxizitätswerte 48 Stunden nach der Infektion mit VSV-GFP in der DENA Zelllinie HCC-EB-6 lagen mit der MOI .01 bei 85,75 % und mit der MOI 1 bei 93,45 %. Nach der Infektion mit VSV-NDV-GFP betrugen die maximalen Werte (zum Zeitpunkt 48 Stunden) mit der MOI .01 86,04 % und mit der MOI 1 84,34 % (siehe Abb. 18 c)).

Wie in Abb. 18 a) ersichtlich zeigte die Infektion mit VSV-NDV-GFP in der DENA Zelllinie HCC-EB-2 eine höhere prozentuale Zytotoxizität (MOI 1; 94,04 % ; 48 Stunden *post infectionem*), als die virale Infektion mit dem parentalen VSV-GFP (MOI 1; 91,99 % ; 48 Stunden *post infectionem*).

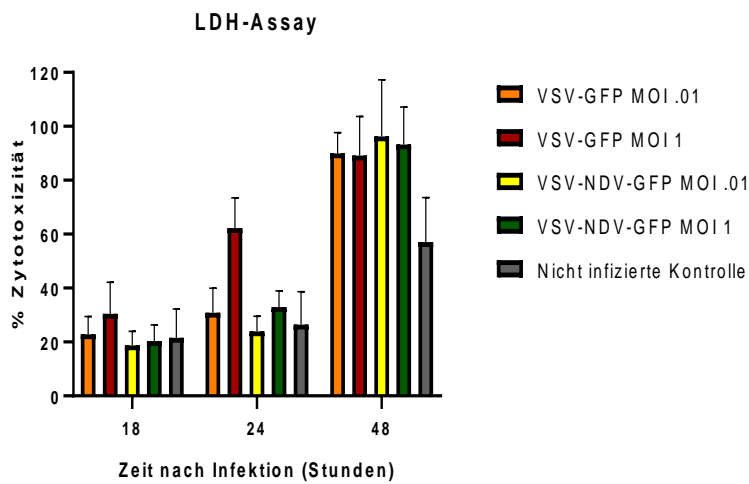
Abb. 18 b) zeigte, dass die mit VSV-NDV-GFP (MOI .01 und MOI 1) infizierten DENA HCC-EB-3 Zellen 48 Stunden nach der Infektion im Vergleich zur Infektion mit VSV-GFP höhere Zytotoxizitätswerte aufwiesen.

Sowohl in der Morris Hepatoma (McA-RH7777) Zelllinie als auch in den murinen RIL-175 Zelllinie zeigte die Infektion mit VSV-NDV-GFP mit einer MOI von 1 die höchste Zytotoxizität nach 48 Stunden (siehe Abb. 18 d) und e)).

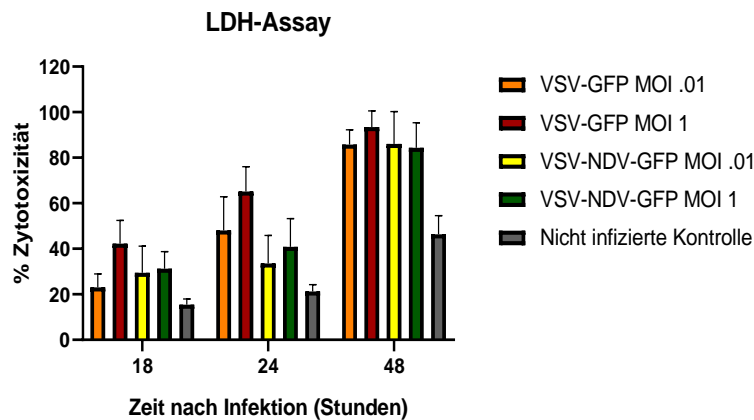
**a) DENA Zellklon HCC-EB-2**

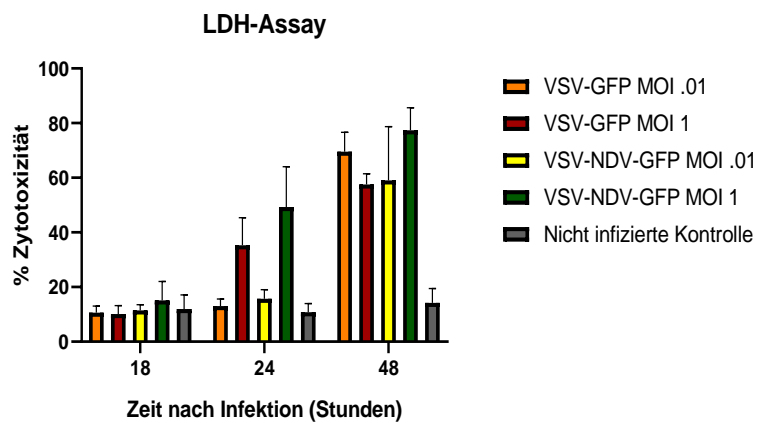
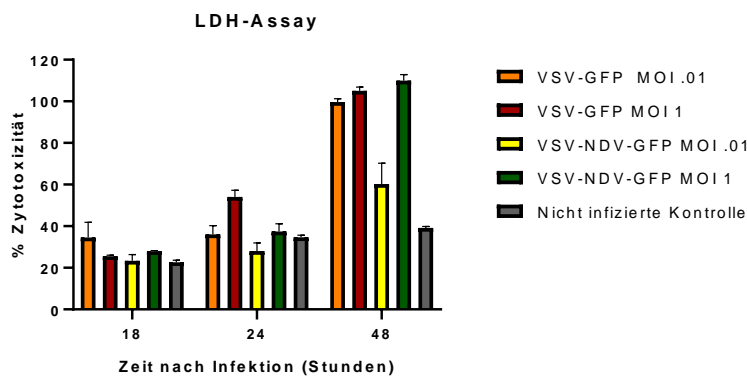


**b) DENA Zellklon HCC-EB-3**



**c) DENA Zellklon HCC-EB-6**



**d) Morris (McA-RH7777) Zellen****e) RIL-175 Zellen**

**Abb. 18 a) – e):** Laktatdehydrogenase-Freisetzung nach der Infektion mit dem parentalen VSV-GFP und dem rekombinanten VSV-NDV-GFP; dargestellt ist die prozentuale Zytotoxizität (%) in Abhängigkeit von Zeit nach der Infektion (in Stunden); die HCC-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen MOIs (.01 und 1) infiziert; die *in-vitro* Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt (n = 9 Proben); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

Die erhaltenen Daten zeigten trotz einiger Varianzen, dass sich alle Zelllinien sowohl mit dem parentalen VSV-GFP als auch mit dem rekombinanten VSV-NDV-GFP dosisabhängig infizieren ließen. In der DENA Zelllinie HCC-EB-3 und HCC-EB-6 verlief die Infektion mit dem VSV-NDV-GFP im Vergleich zur Infektion mit dem VSV-GFP langsamer; jedoch betrug die prozentuale Zytotoxizität nach 48 Stunden, unabhängig von dem infizierenden Virus oder der verwendeten MOI, ungefähr den gleichen Wert.

Die Infektion der DENA Zelllinie HCC-EB-2 verlief bei dem parentalen VSV-GFP und dem chimären VSV-NDV-GFP unabhängig von der MOI annähernd gleich. Morris Hepatoma Zellen ließen sich am besten mit dem rekombinanten VSV-NDV-GFP mit einer MOI von 1 infizieren.

Die Infektion der murinen HCC-Zelllinie RIL-175 mit dem VSV-GFP erreichte unabhängig von der verwendeten MOI 48 Stunden nach der Infektion eine prozentuale Zytotoxizität von annähernd 100 %. Die Infektion mit dem VSV-NDV-GFP zeigte mit der MOI 1 eine maximale Zytotoxizität nach 48 Stunden, die MOI von .01 führte hingegen nur zu einem Zytotoxizitätswert von circa 60 %.



## 1.2. Bestimmung der viralen Replikationskinetik *in-vitro*

Für die Bestimmung der viralen Replikationskinetik wurden Proben 0, 18, 24 und 48 Stunden nach der Infektion genommen und anschließend mit der Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID 50) analysiert.

Die viralen Titer von VSV-GFP mit einer MOI von .01 und 1 in der DENA Zelllinie HCC-EB-2 erreichten nach 24 und 48 Stunden einen annähernd gleichen Wert. Die maximale VSV-GFP TCID 50 mit der MOI 1 lag bei  $5,12 \times 10^8$  pro Milliliter zum Zeitpunkt 48 Stunden *post infectionem*. Wie in Abb. 19 a) ersichtlich stiegen die viralen Titer der VSV-NDV-GFP infizierten HCC-Zellen im Vergleich zum parentalen VSV-GFP langsamer an. Der maximale Wert wurde nach 48 Stunden erreicht und lag bei  $8,39 \times 10^5$  TCID 50/ml (MOI .01).

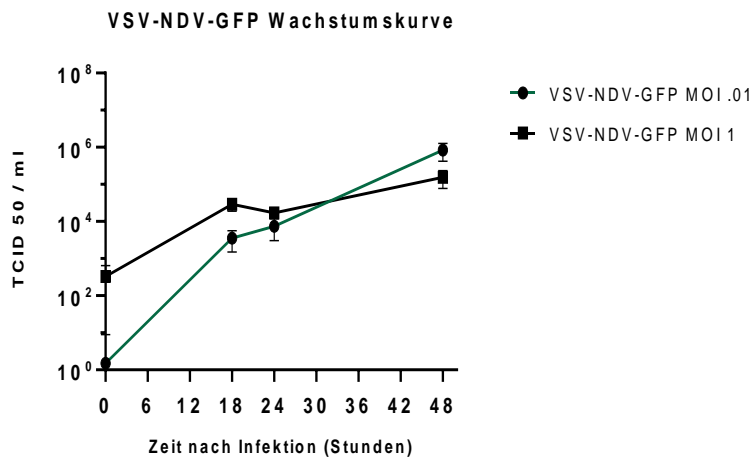
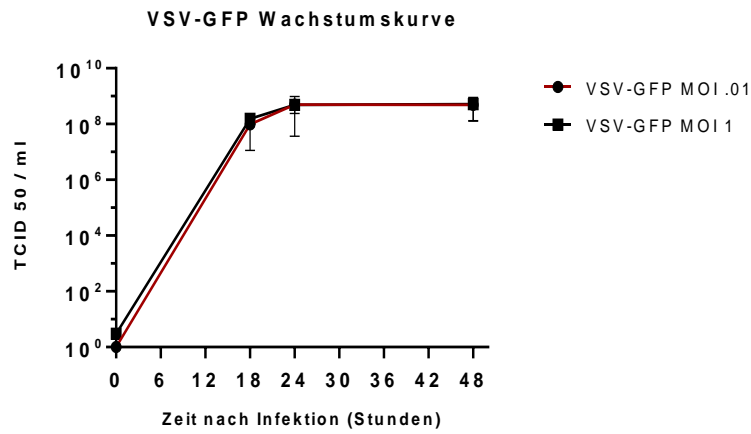
In der DENA Zelllinie HCC-EB-3 konnten die höchsten viralen VSV-GFP-Titer nach 24 Stunden festgestellt werden (VSV-GFP MOI .01:  $1,91 \times 10^8$  TCID 50/ml ; VSV-GFP MOI 1:  $1,08 \times 10^8$  TCID 50/ml). Der virale Titer der mit VSV-NDV-GFP MOI 1 infizierten Zellen stieg konstant an und erreichte nach 48 Stunden den maximalen Wert von  $8,52 \times 10^4$  TCID 50 pro Milliliter (siehe Abb. 19 b)).

Die virale Infektion der DENA Zelllinie HCC-EB-6 mit dem parentalen VSV-GFP zeigte nach 24 Stunden den höchsten Wert. Der Mittelwert von VSV-GFP MOI .01 lag zu diesem Zeitpunkt bei  $8,8 \times 10^8$  TCID 50 pro Milliliter. Die Infektion mit dem chimären VSV-NDV-GFP (MOI 1) erreichte hingegen erst nach 48 Stunden den maximalen Wert von  $8,78 \times 10^5$  TCID 50/ml (siehe Abb. 19 c)).

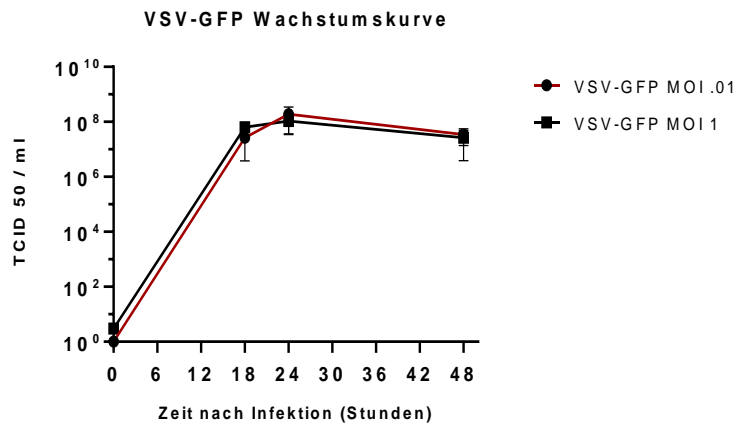
In der Morris (McA-RH7777) Zelllinie erreichten sowohl die viralen Titer von VSV-GFP als auch die viralen Titer von VSV-NDV-GFP maximale Werte 48 Stunden nach der Infektion (VSV-GFP MOI .01:  $2,26 \times 10^8$  TCID 50/ml ; VSV-NDV-GFP MOI 1:  $1,51 \times 10^6$  TCID 50/ml) (siehe Abb. 19 d)).

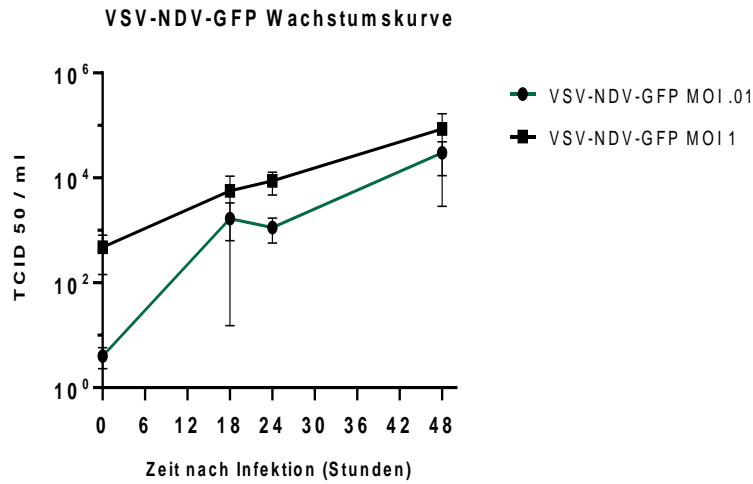
Der virale VSV-GFP-Titer in der murinen RIL-175 HCC-Zelllinie zeigte nach 24 Stunden den höchsten Wert von  $1,3 \times 10^9$  TCID 50 pro Milliliter bei einer MOI von 1. Die maximalen viralen Titer von VSV-NDV-GFP infizierten RIL-175 Zellen konnten bereits nach 24 Stunden dokumentiert werden (MOI .01:  $5,9 \times 10^3$  TCID 50/ml ; MOI 1:  $1,17 \times 10^5$  TCID 50/ml) (siehe Abb. 19 e)).

a) DENA Zellklon HCC-EB-2

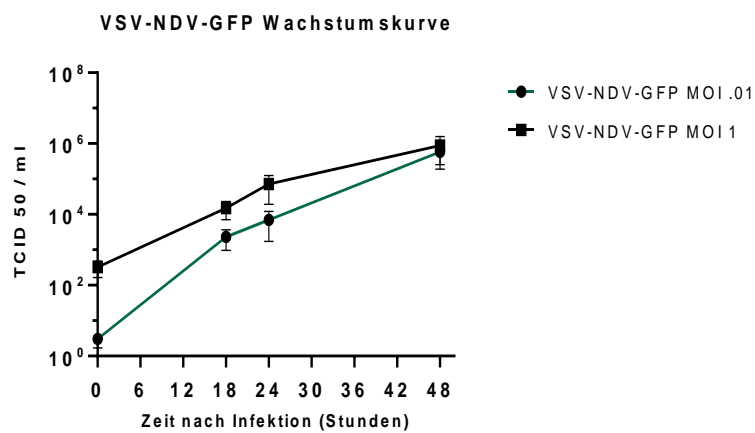
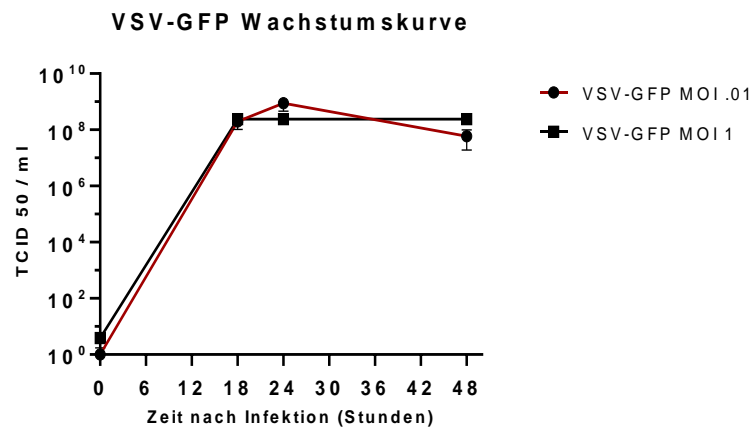


b) DENA Zellklon HCC-EB-3

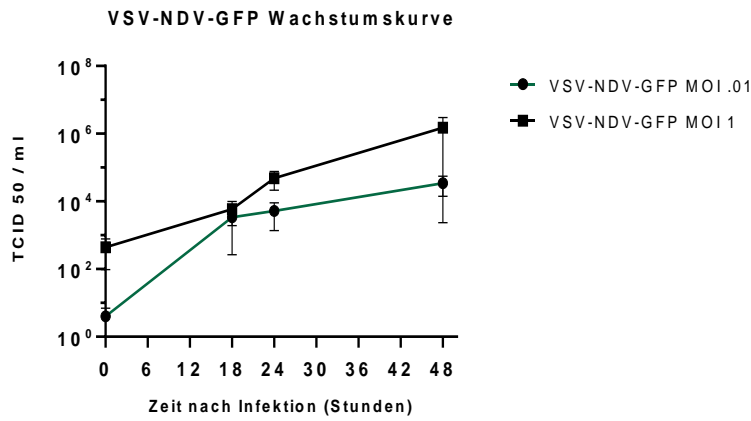
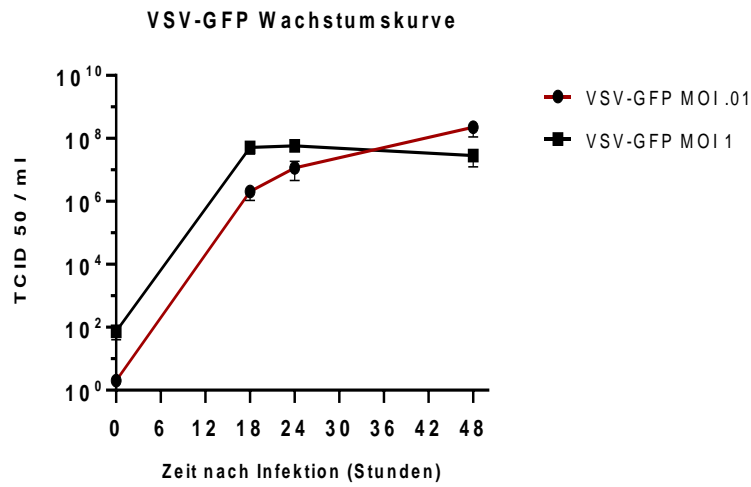




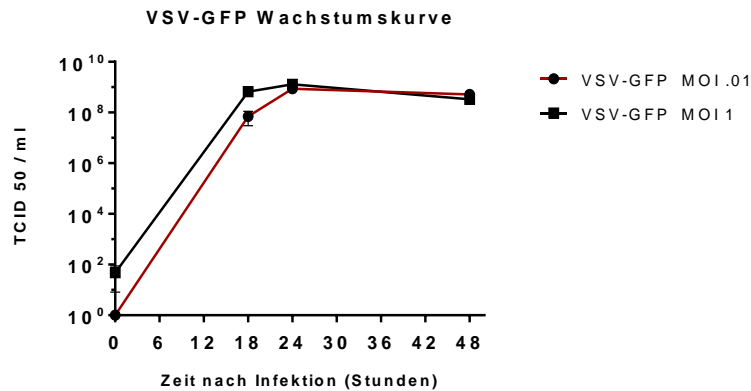
**c) DENA Zellklon HCC-EB-6**

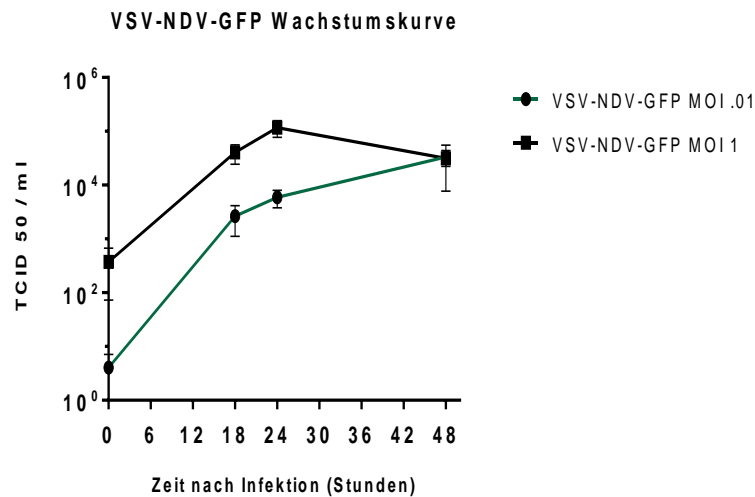


**d) Morris (McA-RH7777) Zellen**



**e) RIL-175 Zellen**





**Abb. 19 a) – e): Virale Titer infizierter HCC-Zelllinien; Viren: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; die HCC-Zellen wurden mit unterschiedlichen MOIs (.01 und 1) infiziert; dargestellt ist die TCID 50 pro ml in Abhängigkeit von der Zeit nach der Infektion (in Stunden); die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt (n = 9 Proben); angegeben mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM)**

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass sich das chimäre VSV-NDV-GFP mit niedrigeren Titern als das parentale VSV-GFP in den hepatozellulären Karzinomzellen replizierte; jedoch tötete das chimäre Virus die Zellen in ungefähr derselben Zeit wie das Vesikuläre Stomatitis Virus ( wie im vorherigen Kapitel IV. 1.2. dargestellt wurde).

Die Replikation von dem rekombinanten VSV-NDV-GFP verlief im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP langsamer. Ferner traten MOI-abhängige Unterschiede in den Wachstumskurven auf.

Das VSV-GFP replizierte sich schneller und nahezu MOI-unabhängig. 24 Stunden *post infectionem* zeigte sich ein Peak in den VSV-GFP-Wachstumskurven. Die viralen Titer nahmen anschließend bis 48 Stunden nach der Infektion wieder ab. Diese Tatsache ließ sich höchstwahrscheinlich durch ein Absterben der HCC-Zellen erklären. Als Folge dessen waren keine Wirtszellen mehr für die virale Replikation vorhanden.

In den folgenden *in-vivo* Experimenten wurden die Morris (McA-RH7777) Zellen im orthotopen Rattenmodell und die RIL-175 Zellen in den subkutanen Mausstudien implantiert.

Bei den DENA-Zellen handelte es sich um Zellklone, die im Klinikaustauschraum, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, generiert wurden und aufgrund eines anderen Hygieneniveaus nicht im TranslaTum (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) verwendet werden konnten.

## 2. *In-vivo* Analyse

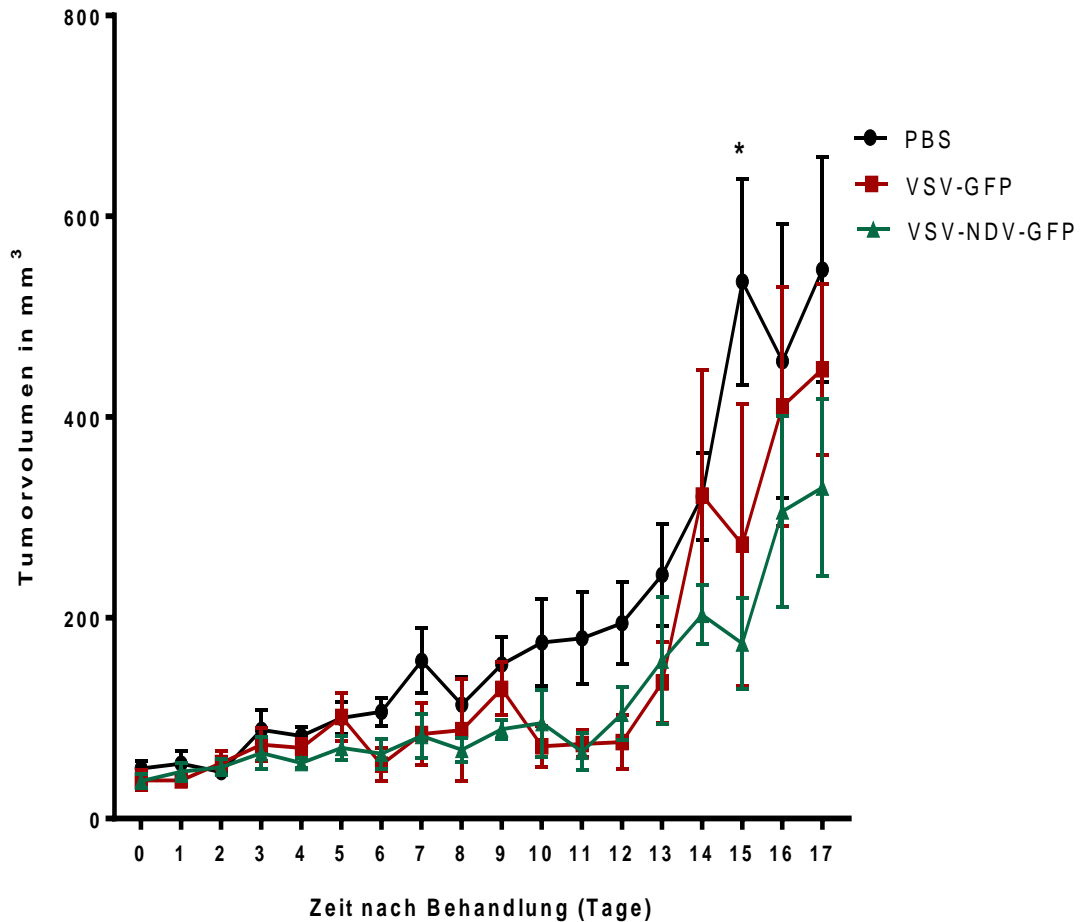
### 2.1. Überlebenszeitanalysen im Mausmodell

Die zuvor *in-vitro* charakterisierten murinen RIL-175 hepatozellulären Karzinomzellen wurden im weiteren Versuchsverlauf der syngenen Mauslinie C57BL/6 subkutan implantiert. Nach erfolgreicher Implantation erfolgte die intratumorale Therapie mit dem rekombinanten onkolytischen VSV-NDV-GFP. Entsprechend den *in-vitro* Versuchen sollte das parentale VSV-GFP im Vergleich zu dem chimären VSV-NDV-GFP untersucht werden. Im Mausmodell wurden zwei Überlebenszeitstudien durchgeführt, die sich in der Zellapplikation und dem darauffolgenden Behandlungsintervall unterschieden.

In der ersten Überlebenszeitstudie wurden den Mäusen einseitig RIL-175 Tumorzellen subkutan implantiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 10, Kapitel III. 2.3.3.). Für diesen Versuch wurden insgesamt zwölf männliche C57BL/6 Mäuse herangezogen.

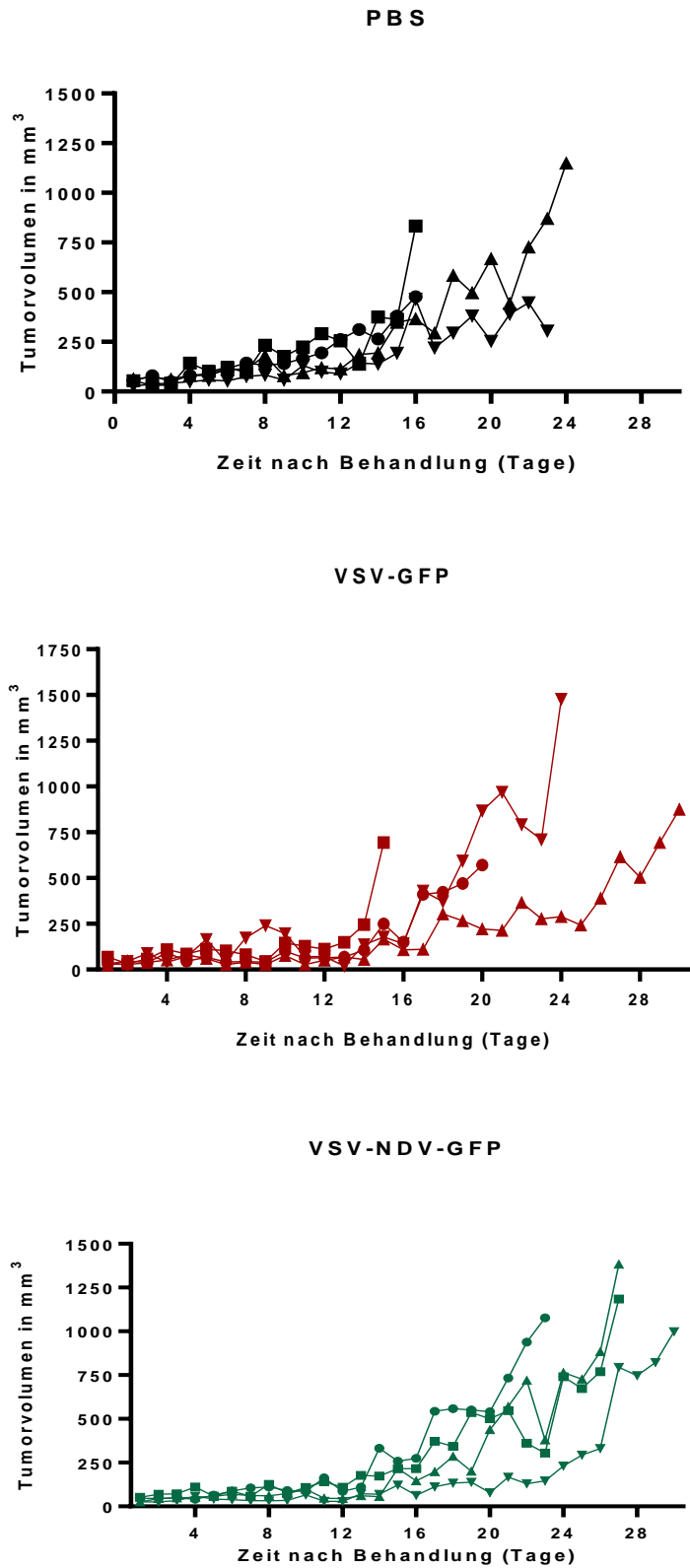
Bei den Versuchsgruppen handelte es sich um mit VSV-GFP (n = 4 Mäuse) oder mit VSV-NDV-GFP (n = 4 Mäuse) behandelte Mäuse. Die Kontrollgruppe erhielt PBS (n = 4 Mäuse). Die intratumorale Therapie erfolgte zweimal in einem Zeitintervall von einer Woche.

Wie aus Abb. 20 ersichtlich wies die Versuchsgruppe, die das rekombinante Virus VSV-NDV-GFP erhielt, das kleinste Tumolvolumen in den ersten 17 Tagen nach der Behandlung auf. Bei den subkutanen Tumoren der Kontrollgruppe PBS konnte hingegen eine deutliche Größenzunahme festgestellt werden. 15 Tage nach der ersten intratumoralen Therapie zeigte sich ein signifikanter Unterschied (\*p = 0,0183) zwischen den Tumorumfängen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS. Die Tumorumfänge der einzelnen Mäuse (abgebildet in der jeweiligen Versuchsgruppe) sind in Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 20:** Tumolvolumen (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die Mäuse wurden an Tag 0 und 7 intratumoral therapiert; Versuchsgruppen (n = 4 VSV-GFP; n = 4 VSV-NDV-GFP); Kontrollgruppe (n = 4 PBS); \* signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP 15 Tage nach der ersten Behandlung

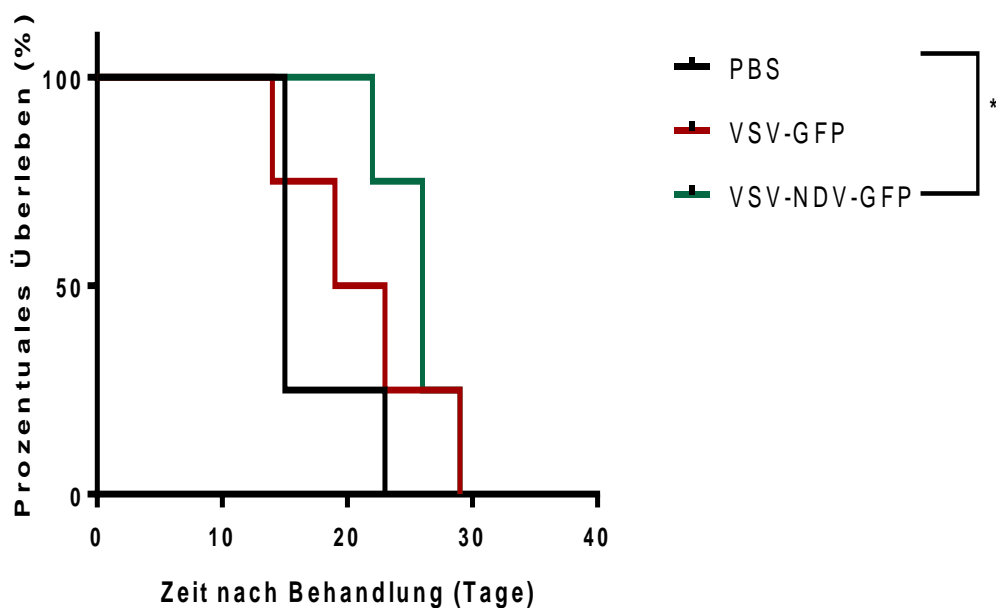




**Abb. 21: Tumorvolumina (in mm<sup>3</sup>) der einzelnen Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage); dargestellt sind die Versuchsgruppen (n = 4 VSV-GFP; n = 4 VSV-NDV-GFP) und die Kontrollgruppe (n = 4 PBS) im Vergleich zueinander**

Die durchschnittliche Überlebenszeit in der Versuchsgruppe mit der VSV-NDV-GFP Applikation betrug 26 Tage (siehe Abb. 22). Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0292$ ) gegenüber der Kontrollgruppe (PBS), mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von nur 15 Tagen. Mäuse, die mit VSV-GFP therapiert wurden, überlebten im Durchschnitt 21 Tage.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass sich das rekombinante VSV-NDV-GFP als ein effektives Therapeutikum darstellte. Aufgrund dieser vielversprechenden Daten folgte eine zweite Überlebenszeitstudie im HCC-Mausmodell mit dem Ziel, den Therapieeffekt noch weiter zu optimieren.



**Abb. 22: Prozentuales Überleben der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Therapie (in Tagen); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; intratumorale Injektionen erfolgten an Tag 0 und 7; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS**

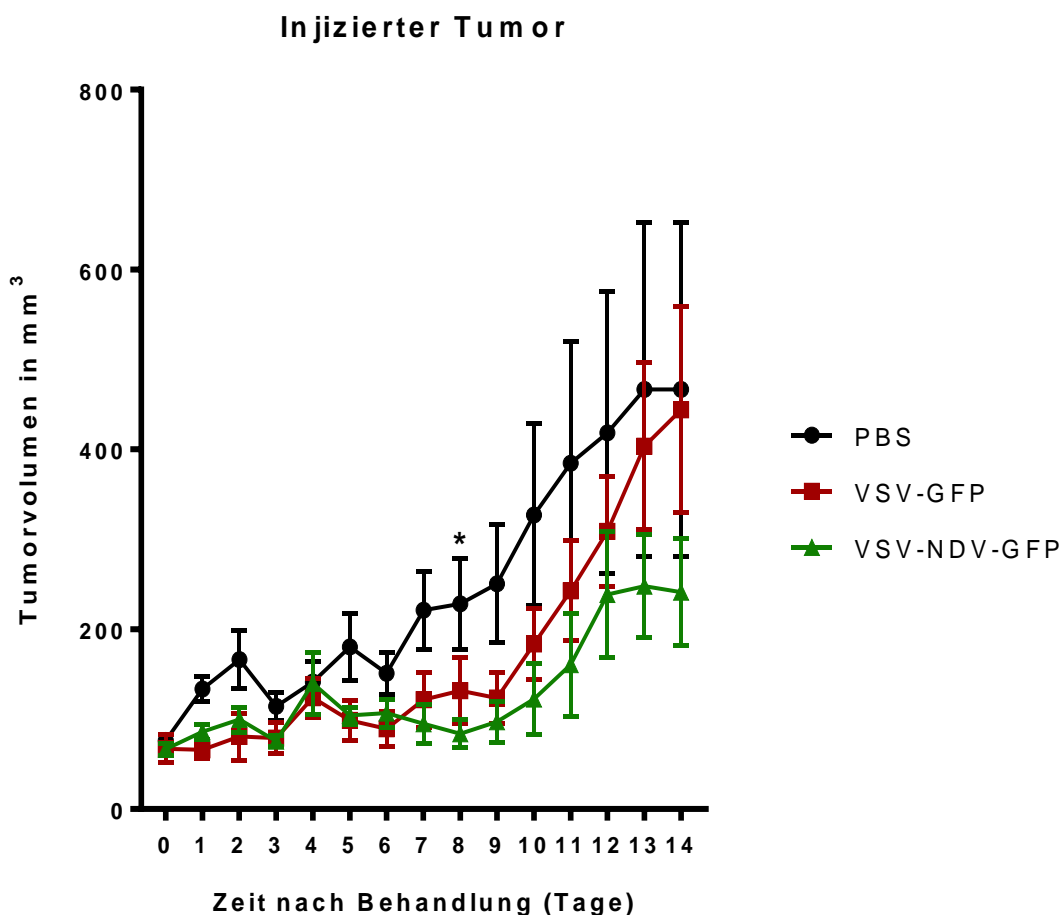
In der zweiten Überlebenszeitanalyse im Mausmodell (Versuchsaufbau siehe Abb. 11, Kapitel III. 2.3.4.) wurden insgesamt 17 C57BL/6 Mäuse in die Studie einbezogen. Die Gruppengröße der Versuchstiere setzte sich aus 6 mit VSV-GFP und 6 mit VSV-NDV-GFP behandelten Mäusen zusammen. 5 Mäuse erhielten PBS in der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zur ersten Überlebenszeitstudie wurden den Mäusen beidseits RIL-175 Zellen implantiert, jedoch wurde nur der rechtsseitige Tumor intratumoral therapiert. Für die Therapie des Tumors wurden auf der rechten Seite ursprünglich  $5 \times 10^5$  RIL-175 Zellen und auf der linken Seite, dem unbehandelten Tumor, nur  $2,5 \times 10^5$  Zellen implantiert.

Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass die Tiere öfter und in kürzeren Zeitabständen (dreimal im Abstand von drei Tagen) intratumoral injiziert wurden, mit dem Ziel, den Therapieeffekt zu verbessern. Des Weiteren sollte die Immunantwort auf den linksseitigen HCC-Tumor untersucht werden.

Wie aus Abb. 23 hervorgeht zeigten die onkolytischen Versuchsgruppen (VSV-GFP und VSV-NDV-GFP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) ein langsames Tumorwachstum in den ersten 14 Tagen nach Therapiebeginn (injizierte Tumore). Vor allem die Mäuse, die das rekombinante Virus VSV-NDV-GFP erhielten, wiesen ein reduziertes Tumorwachstum (injizierte und nicht injizierte Tumore) in den ersten zehn Tagen nach der intratumoralen Injektion auf (siehe Abb. 23 und 24).

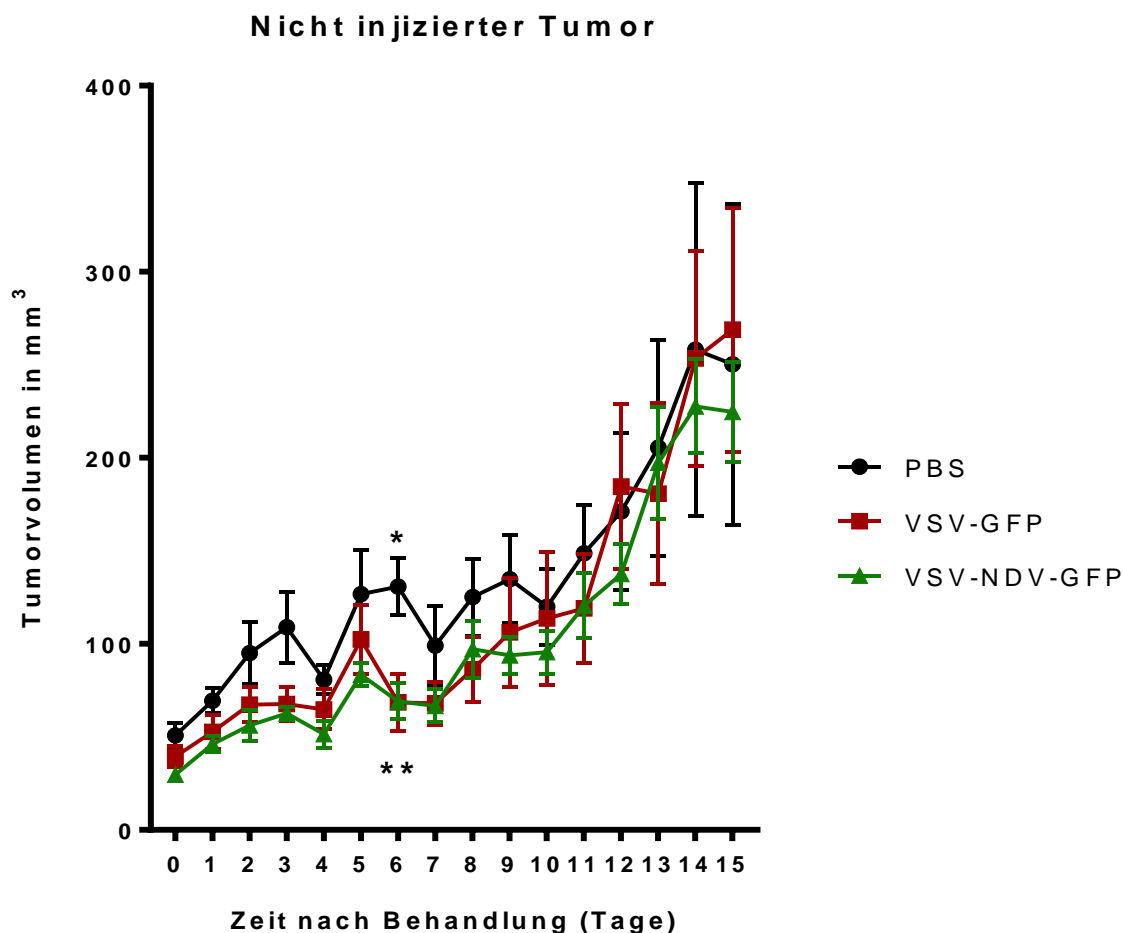
Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied (\* $p = 0,0183$ ) zwischen den rechtsseitigen Tumolvolumina der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS acht Tage nach der ersten intratumoralen Therapie (siehe Abb. 23).



**Abb. 23: Tumorvolumen (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); hierbei handelt es sich um den injizierten Tumor; dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); Versuchsgruppen (n = 6 VSV-GFP; n = 6 VSV-NDV-GFP); Kontrollgruppe (n = 5 PBS); die Mäuse wurden an Tag 0, 3 und 6 intratumoral injiziert; \* signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP 8 Tage nach der ersten intratumoralen Therapie**

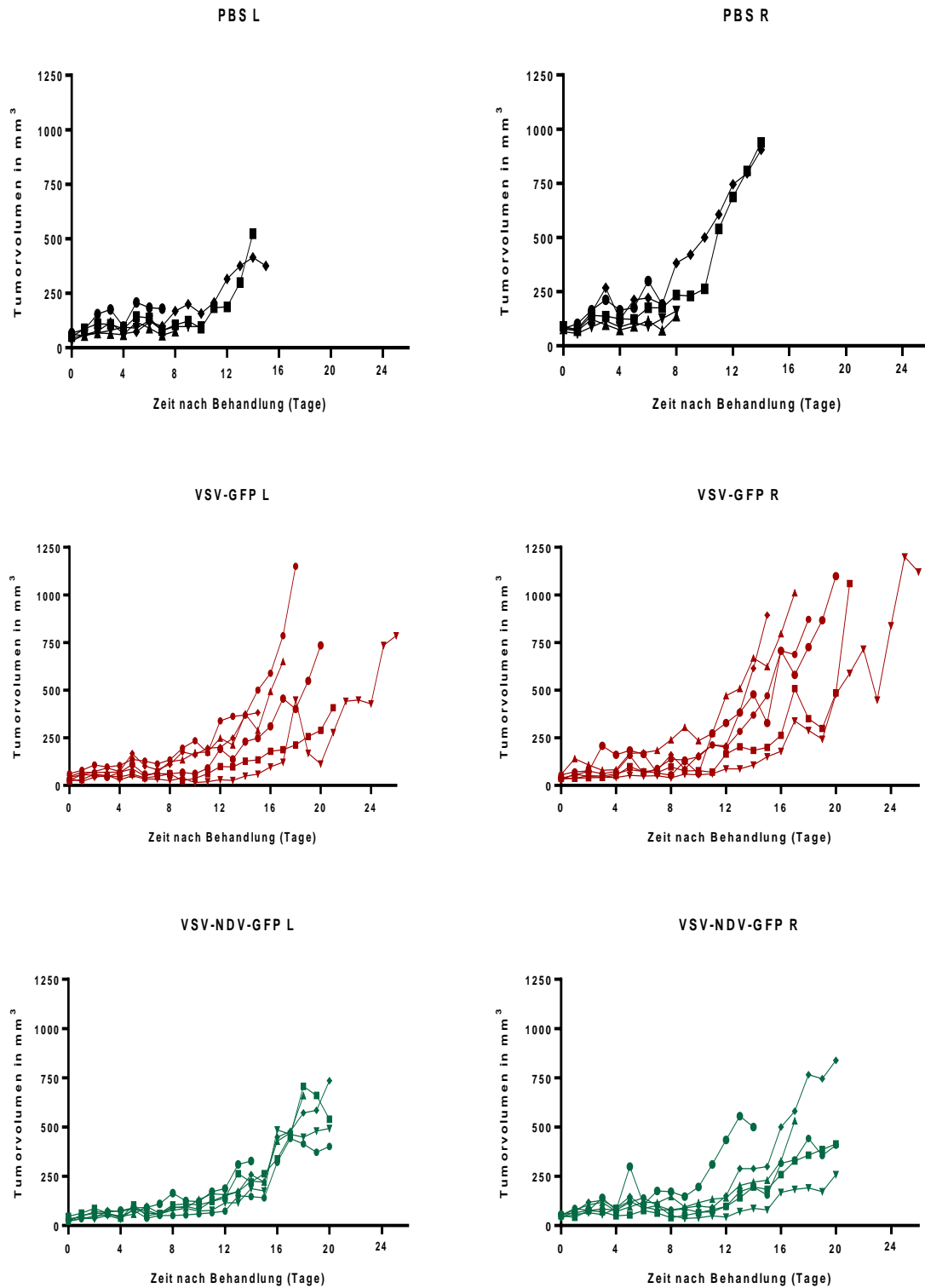
Wie aus Abb. 24 ersichtlich konnte sechs Tage nach Therapiebeginn ein signifikanter Unterschied (\*p = 0,0196) zwischen der Tumorgröße der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Kontrollgruppe PBS sowie zwischen mit VSV-NDV-GFP therapierten Mäusen und der Kontrollgruppe PBS (\*\* p = 0,0064) festgestellt werden.

Abb. 23 und 24 veranschaulichen den Mittelwert der Tumorumfänge der jeweiligen Versuchsgruppe. In Abb. 25 sind hingegen die Tumorumfänge der einzelnen Mäuse in jeder Versuchsgruppe dargestellt.



**Abb. 24: Tumorumfang (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); hierbei handelt es sich um den nicht injizierten Tumor; dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); Versuchsgruppen (n = 6 VSV-GFP; n = 6 VSV-NDV-GFP); Kontrollgruppe (n = 5 PBS); \* signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-GFP 6 Tage nach Therapiebeginn; \*\* signifikanter Unterschied (p < 0,01) zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP 6 Tage nach Therapiebeginn**

Aufgrund von Varianzen zwischen den Mäusen wurde in Abb. 25 die Reaktion jedes einzelnen Tumors auf die onkolytische Therapie dokumentiert. Die parentale Versuchsgruppe VSV-GFP wies hierbei große Unterschiede in den einzelnen Tumolvolumina auf. Hingegen zeigten die mit dem VSV-NDV-GFP behandelten Mäuse einen besser reproduzierbaren Therapieeffekt. Das chimäre Virus führte sowohl in den injizierten als auch in den nicht injizierten Tumoren zu einer kontrollierbaren Einflussnahme auf das Tumorwachstum.

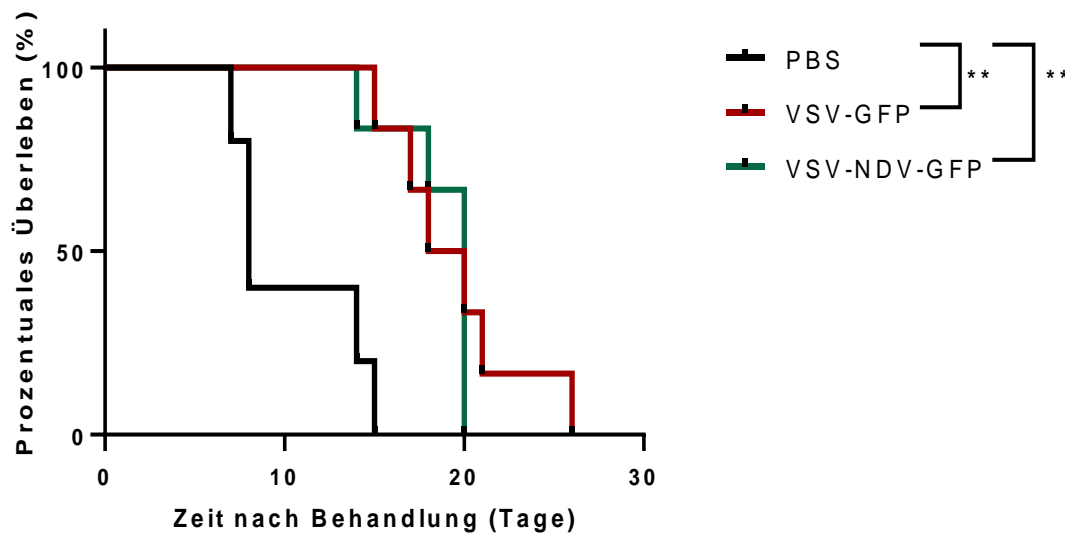


**Abb. 25: Tumorvolumina (in mm<sup>3</sup>) der einzelnen Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage); dargestellt sind die Versuchsgruppen (n = 6 VSV-GFP; n = 6 VSV-NDV-GFP) und die Kontrollgruppe (n = 5 PBS) im Vergleich zueinander; R = Rechter (injizierter) Tumor; L = Linker (nicht injizierter Tumor)**

Wie aus Abb. 26 hervorgeht ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-GFP ( $p = 0,0029$ ) und zwischen der onkolytischen Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und Mäusen, die PBS erhielten ( $p = 0,0039$ ).

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Kontrollgruppe betrug acht Tage, die der Versuchsgruppe VSV-GFP 19 Tage. Die mit dem chimären VSV-NDV-GFP behandelten Mäuse überlebten im Durchschnitt 20 Tage.

Sowohl die parentale Versuchsgruppe VSV-GFP als auch die rekombinante Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP zeigten eine signifikante Verlängerung ( $***p = 0,0004$ ) der Überlebenszeit im Vergleich zu Mäusen, die mit PBS behandelt wurden.



**Abb. 26: Prozentuales Überleben der Versuchsgruppen (n = 6 VSV-GFP; n = 6 VSV-NDV-GFP) und der Kontrollgruppe (n = 5 PBS) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); \*\* signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-GFP ( $p < 0,01$ ); \*\* signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP ( $p < 0,01$ )**



In der zweiten Überlebenszeitstudie im HCC-Mausmodell resultierte somit ein positiver Therapieeffekt sowohl von dem chimären VSV-NDV-GFP als auch von dem parentalen Vesikulären Stomatitis Virus. Jedoch stellte sich das rekombinante Virus als ein noch effektiveres Therapeutikum dar. Das VSV-NDV-GFP führte auch im nicht injizierten Tumor in den ersten Tagen nach Behandlungsbeginn zu einem immunbedingt reduzierten Tumorwachstum.

## **2.2. Beurteilung des Kinetikexperiments**

Das Ziel der folgenden Kinetikstudie im subkutanen RIL-175-Mausmodell (Versuchsaufbau siehe Kapitel III. 2.3.5.) bestand darin, die onkolytische Viruskinetik zu charakterisieren. Des Weiteren sollte die induzierte Immunantwort im injizierten (rechtsseitigen) und im nicht injizierten (linksseitigen) Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung untersucht werden.

Aufgrund des hohen zeitlichen und technischen Aufwandes wurde das Experiment in zwei Kohorten aufgeteilt. Insgesamt wurden 90 C57BL/6 Mäuse für die Studie herangezogen. Syngene RIL-175 HCC-Zellen wurden wie bereits in der zweiten Überlebenszeitstudie im Mausmodell beschrieben (siehe Kapitel IV. 2.1.) beidseitig subkutan implantiert. Die onkolytische Viro-Therapie erfolgte im Vergleich zu den vorherigen Versuchen nur einmal intratumoral.

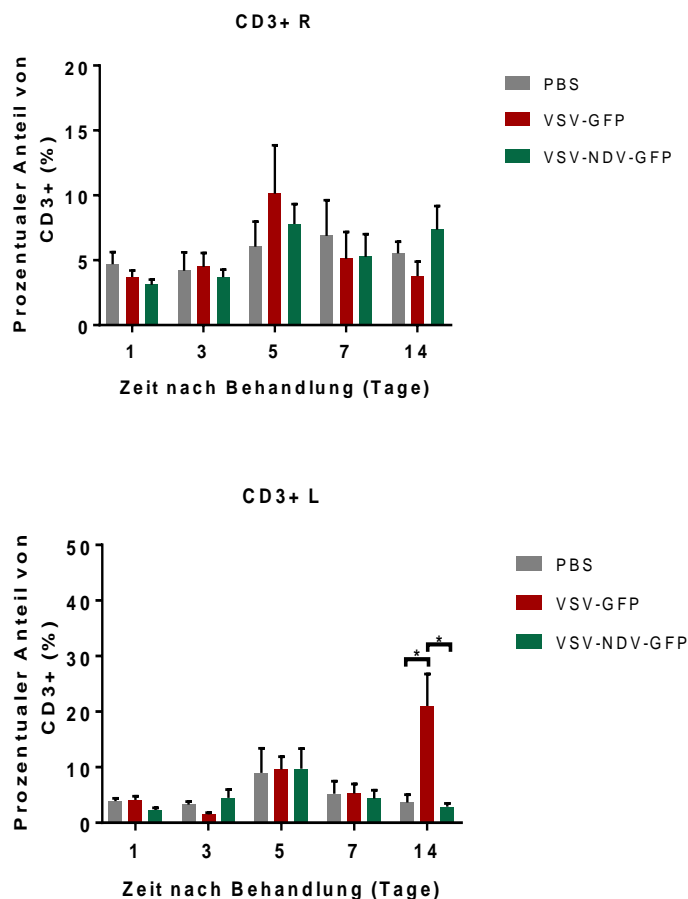
Die Gruppengröße setzte sich aus jeweils 30 Tieren (Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS) zusammen. Pro Zeitpunkt (ZP = 1., 3., 5., 7., 14. Tag post injectionem) wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe zur Tumoranalyse euthanasiert. Die entnommenen Tumorproben wurden anschließend mit der Durchflusszytometrie und histologisch analysiert. Intratumorale infektiöse Virustiter wurden mit der Tissue Culture Infection Dose 50 bestimmt.

### **2.2.1. Durchflusszytometrie (FACS)**

Für die Durchflusszytometrie wurden die entnommenen Tumorproben wie in Kapitel III. 2.3.6.2. beschrieben mehreren technischen Schritten unterzogen und anschließend auf das Vorkommen von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, PD1, PD-L1, GFP, toten und lebendigen Zellen untersucht.

Die Analyse der erhaltenen FACS-Daten zeigte einen signifikanten Unterschied (\*p = 0,0422) im prozentualen Anteil von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Kontrollgruppe PBS im nicht injizierten Tumor 14 Tage nach Therapiebeginn.

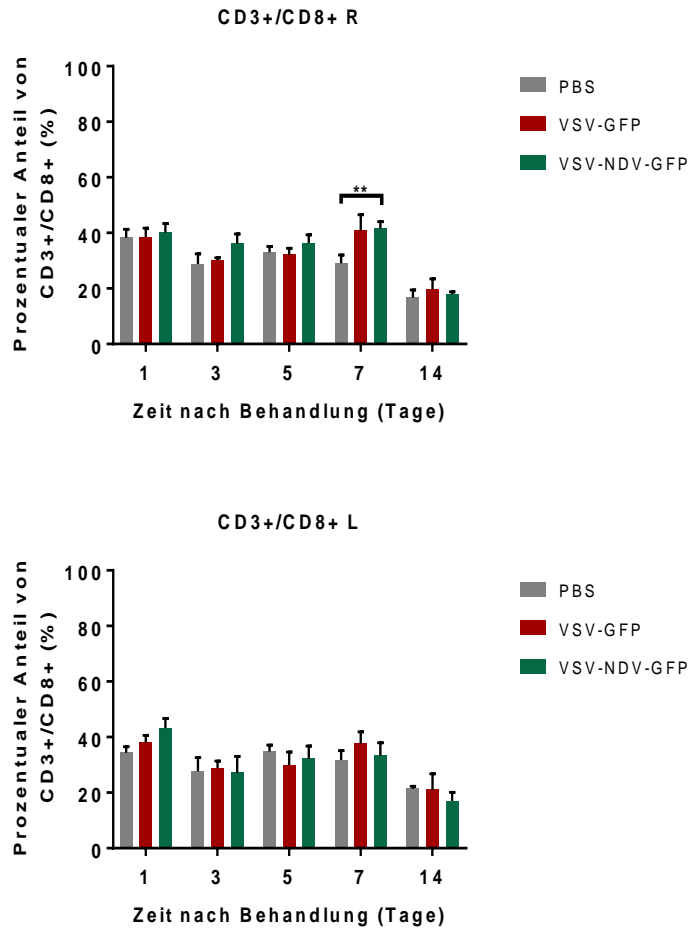
Des Weiteren konnte eine statistische Signifikanz (\*p = 0,0347) zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im linken Tumor 14 Tage nach der Behandlung festgestellt werden (siehe Abb. 27).



**Abb. 27: Prozentualer Anteil von CD3+-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Kontrollgruppe PBS, sowie zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im linksseitigen Tumor 14 Tage nach Therapiebeginn**

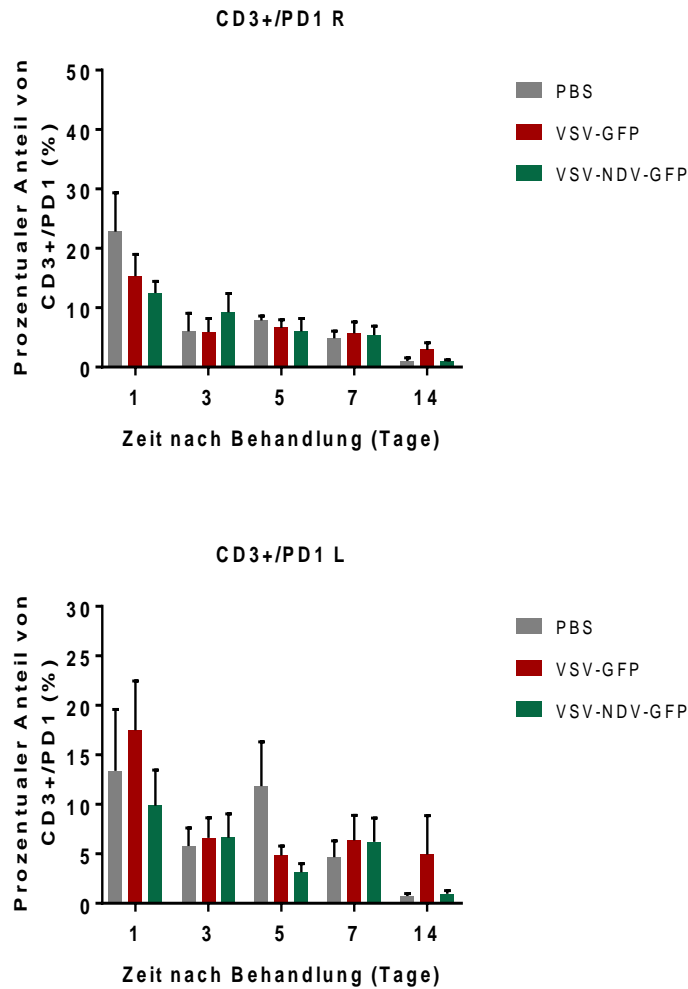
Der prozentuale Anteil von CD3+/CD8+-T-Zellen in den rechten Tumorproben, der mit VSV-NDV-GFP behandelten Mäuse lag sieben Tage nach intratumoraler Therapie im Durchschnitt bei 41,52 %, bei der Kontrollgruppe hingegen nur bei 29,05 %. Die Versuchsgruppe VSV-GFP erreichte einen durchschnittlichen Wert von 40,95 %.

Hieraus ergab sich eine statistische Signifikanz (\*\*p = 0,0091) in den injizierten Tumoren zwischen der onkolytischen Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS sieben Tage nach der Behandlung. (siehe Abb. 28).

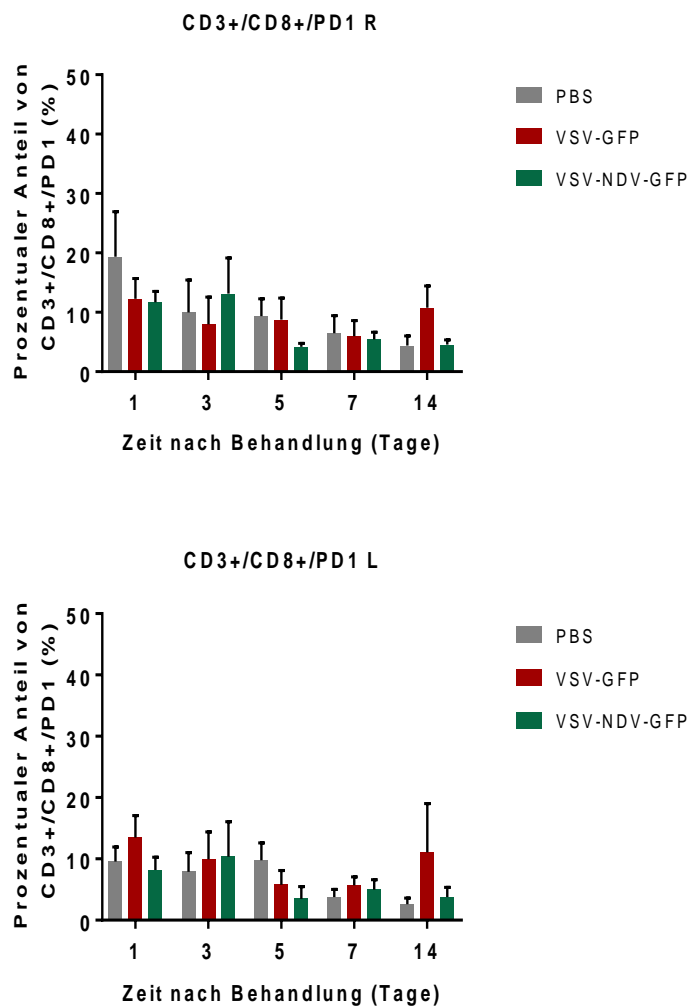


**Abb. 28: Prozentualer Anteil von CD3+/CD8+-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \*\* signifikanter Unterschied (p < 0,01) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS im rechten Tumor 7 Tage nach der intratumoralen Therapie**

Bei der Analyse der Daten von CD3+/PD1 und von CD3+/CD8+/PD1 konnten weder im injizierten noch im nicht injizierten Tumor statistische Unterschiede festgestellt werden (siehe Abb. 29 und 30).



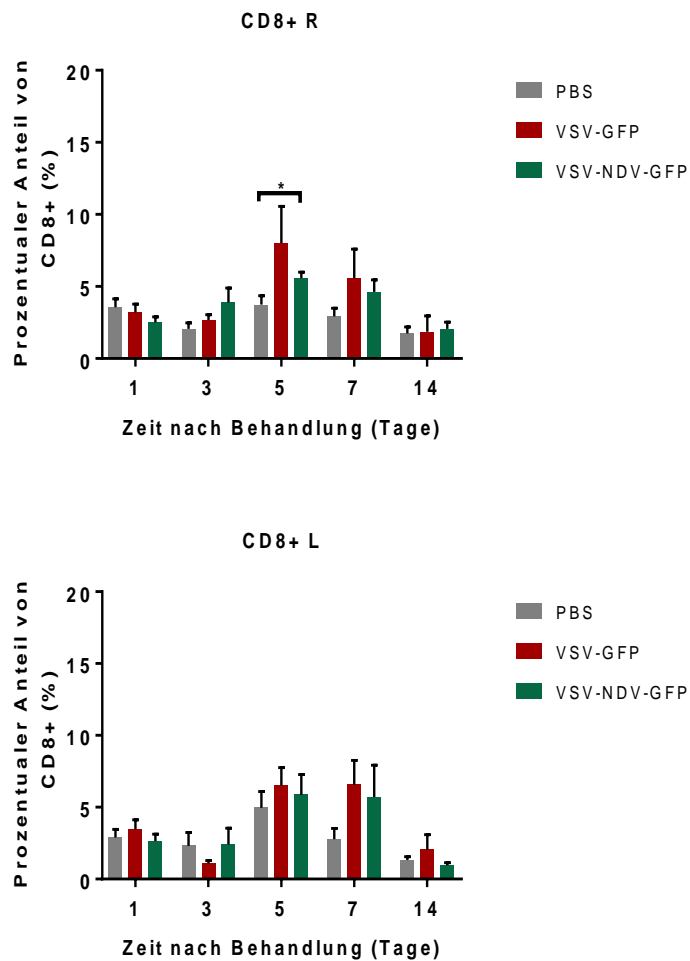
**Abb. 29: Prozentualer Anteil von CD3+/PD1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor**



**Abb. 30: Prozentualer Anteil von CD3+/CD8+/PD1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor**

Fünf Tage nach der intratumoralen Injektion (rechter Tumor) erreichte die Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP durchschnittlich 5,57 % an CD8+-T-Zellen, die Kontrollgruppe PBS hingegen nur 3,74 %. Bei der parentalen Versuchsgruppe VSV-GFP konnte ein Durchschnittswert von 8,00 % festgestellt werden.

Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied mit  $*p = 0,0340$  zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe im injizierten Tumor am 5. Tag *post injectionem* (siehe Abb. 31).



**Abb. 31: Prozentualer Anteil von CD8+-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \* signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS im injizierten Tumor 5 Tage nach der Behandlung**

Der prozentuale Anteil von toten und lebenden Zellen in den einzelnen Tumorproben wurde ebenfalls mit der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten der toten Zellen zeigten eine statistische Signifikanz (\* $p = 0,0290$ ) zwischen den mit PBS und den mit VSV-NDV-GFP therapierten Mäusen im injizierten Tumor sieben Tage nach der Behandlung.

In den kontralateralen, linksseitigen Tumorproben wurden in der Versuchsgruppe VSV-GFP ein Mittelwert von 43,03 %, in der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP ein Wert von 23,7 % und in der Kontrollgruppe durchschnittlich 46,43 % toter Zellen erreicht (sieben Tage nach Therapiebeginn). Hieraus ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (\*\* $p = 0,0060$ ) im Prozentsatz von toten Zellen zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VN-GFP sowie zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP (\* $p = 0,0130$ ) (siehe Abb. 32).

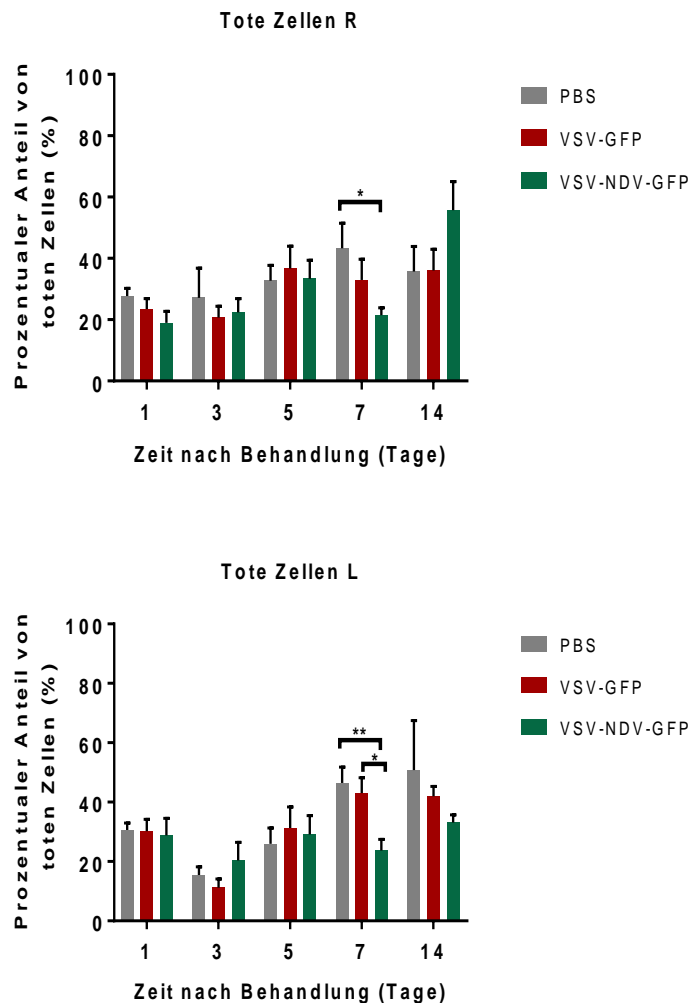
Entgegen den Erwartungen ließ sich dieses Ergebnis durch die erhaltenen Daten der Überlebenszeitstudien im Mausmodell erklären. Wie bereits in Kapitel IV. 2.1. dargestellt wurde, waren die Tumore der Kontrollgruppe PBS wesentlich größer und das Tumorwachstum schritt schneller voran als die HCC-Tumore, die mit onkolytischen Viren behandelt wurden. Der hohe prozentuale Anteil toter Zellen in der Kontrollgruppe könnte auf eine spontane zentrale Nekrose, bedingt durch die schnelle Größenzunahme und der damit verbundenen unzureichenden Blutversorgung des Tumors, zurückzuführen sein.

Wie aus Abb. 33 ersichtlich zeigten sich sowohl in den injizierten als auch in den kontralateralen, nicht injizierten Tumoren signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil von lebenden Zellen sieben Tage nach der Therapie.

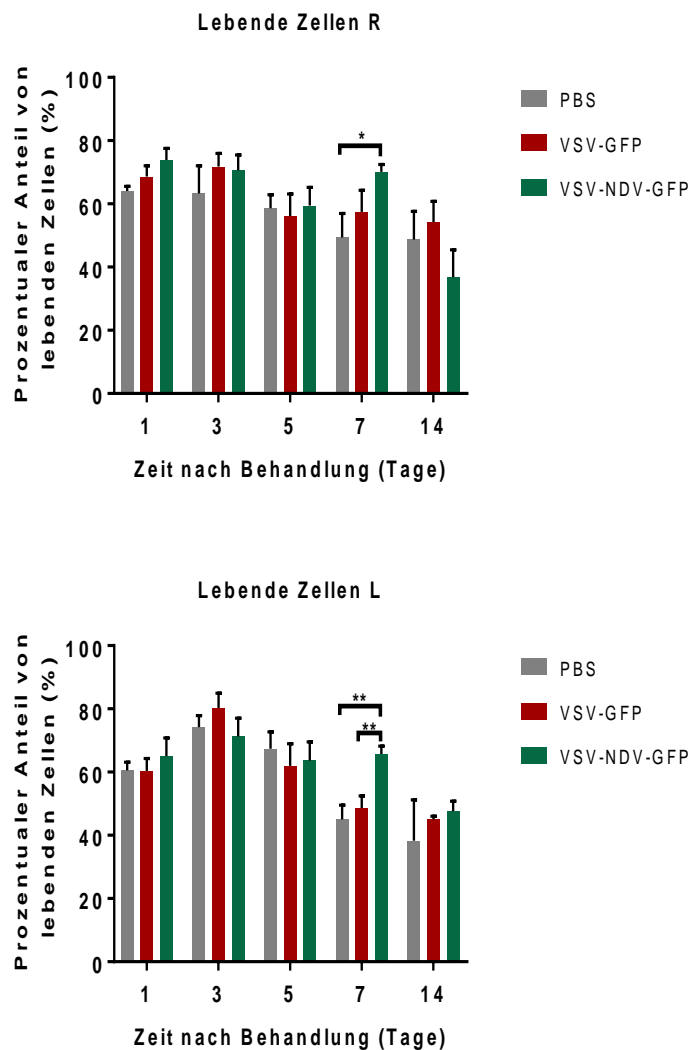
In den injizierten Tumorproben konnte eine statistische Signifikanz (\* $p = 0,0263$ ) im Prozentsatz von lebenden Zellen zwischen der Versuchsgruppe VN-GFP und der Kontrollgruppe PBS festgestellt werden.

Der prozentuale Anteil von lebenden Zellen in den nicht injizierten Tumorproben lag bei mit VSV-GFP behandelten Mäusen bei einem durchschnittlichen Wert von 48,58 %, bei der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP bei 65,72 % und bei der Kontrollgruppe PBS bei 45,02 %. Hieraus folgte ein signifikanter Unterschied (\*\* $p = 0,0026$ ) im Anteil von lebenden Zellen zwischen den mit VN-GFP behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe PBS. Des Weiteren zeigte sich eine statistische Signifikanz (\*\* $p = 0,0041$ ) zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP.



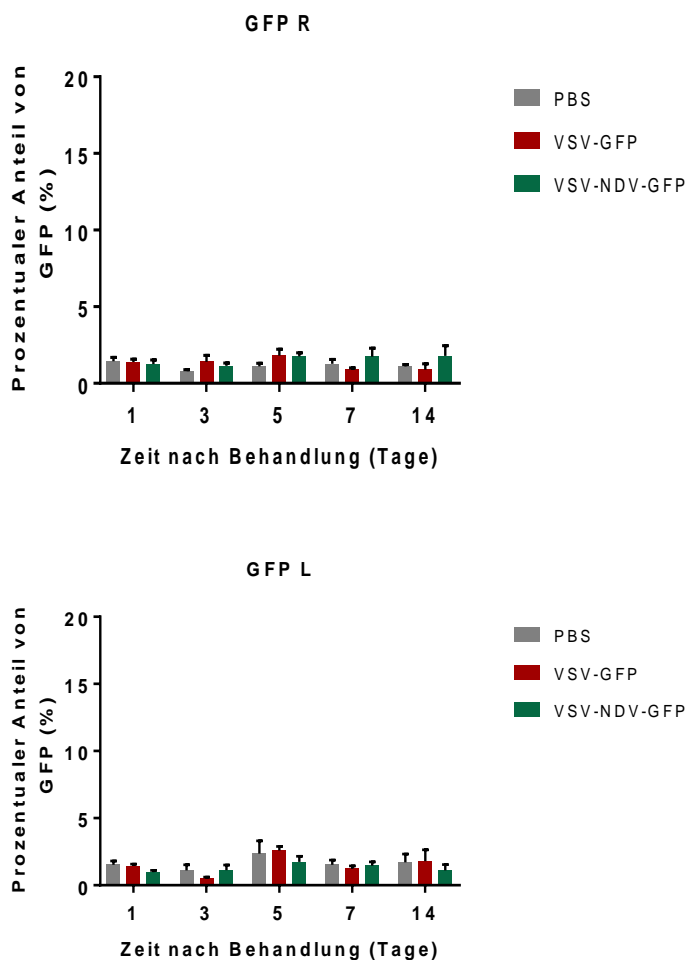


**Abb. 32: Prozentualer Anteil von toten Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS im rechten Tumor 7 Tage nach intratumoraler Injektion; \*\* signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im linken Tumor 7 Tage nach Therapiebeginn; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP im linken Tumor 7 Tage nach Therapiebeginn**



**Abb. 33: Prozentualer Anteil von lebenden Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im rechten Tumor 7 Tage nach der Behandlung; \*\* signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS im linken Tumor 7 Tage nach Therapiebeginn; \*\* signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP im linken Tumor 7 Tage nach Therapiebeginn**

Aus Abb. 34 geht hervor, dass das grün fluoreszierende Protein (GFP) nur in geringem Maße nachgewiesen werden konnte. Mäuse, die mit VSV-GFP behandelt wurden, zeigten einen maximalen Wert von 2,58 % fünf Tage nach Therapiebeginn im nicht injizierten Tumor.



**Abb. 34: Prozentualer Anteil von GFP (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor**

Bei dem Nachweis von PD-L1 in den rechten Tumorproben konnte ein signifikanter Unterschied (\*p = 0,0199) zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und den mit PBS behandelten Mäusen 14 Tage nach der intratumoralen Injektion festgestellt werden. Des Weiteren zeigte sich eine statistische Signifikanz (\*p = 0,0424) im Prozentsatz

von PD-L1 zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VN-GFP in den injizierten Tumoren 14 Tage nach der Behandlung. Die Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP wies zu diesem Zeitpunkt einen durchschnittlichen PD-L1 Wert (rechte Tumore) von 31,17 %, die Versuchsgruppe VSV-GFP einen Wert von 21,07 % auf und die Kontrollgruppe erreichte einen Durchschnittswert von 33,57 % (siehe Abb. 35).

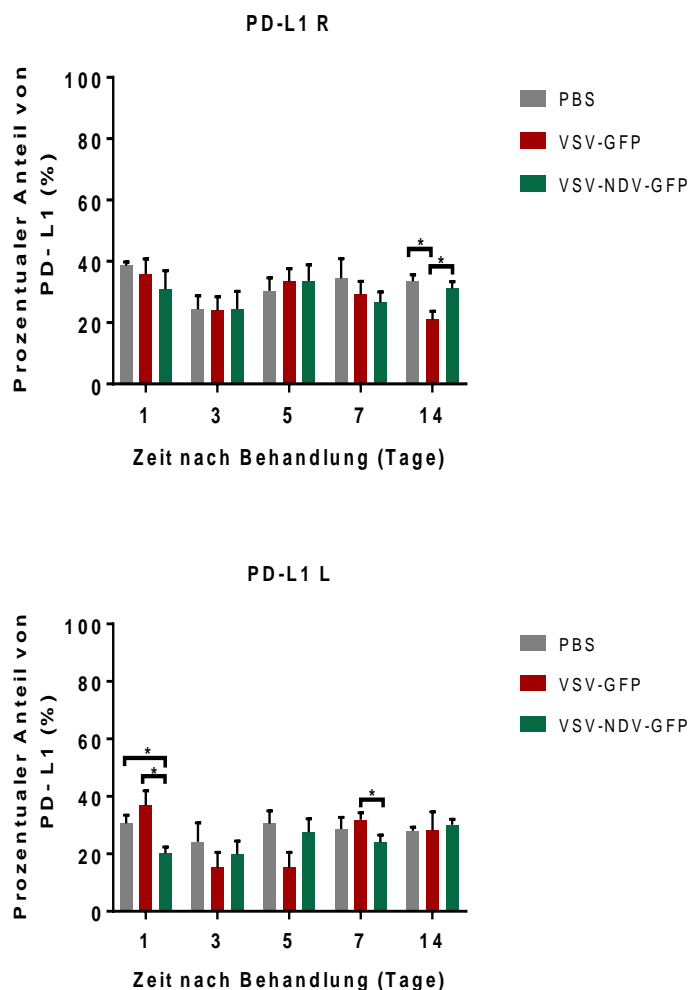
Wie aus Abb. 35 hervorgeht ergaben sich signifikante Unterschiede in der PD-L1 Expression in den linksseitigen Tumorproben an Tag 1 und 7 nach Therapiebeginn.

Einen Tag nach der Behandlung zeigte sich eine statistische Signifikanz (\*p = 0,0154) im Prozentsatz von PD-L1 (linke Tumore) zwischen der Versuchsgruppe VN-GFP und der Kontrollgruppe PBS sowie zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VN-GFP (\*p = 0,0108). Die Kontrollgruppe wies zu diesem Zeitpunkt einen Durchschnittswert von 30,62 %, die Versuchsgruppe VSV-GFP von 36,88 % und die Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP von 20,25 % in den linken Tumoren auf.

Sieben Tage nach Therapiebeginn konnte in den linksseitigen Tumorproben der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP ein durchschnittlicher PD-L1 Wert von 24,03 % und in der Versuchsgruppe VSV-GFP ein Durchschnittswert von 31,92 % festgestellt werden. Die Kontrollgruppe PBS erreichte einen durchschnittlichen Wert von 28,63 %. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied (\*p = 0,0467) im prozentualen Anteil von PD-L1 zwischen den beiden onkolytischen Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigten somit eine durch das onkolytische chimäre VSV-NDV-GFP ausgelöste Infiltration von CD3+/CD8+-T-Zellen in die injizierten Tumore sieben Tage nach der Therapie sowie ein vermehrtes Auftreten von CD8+-T-Zellen in den rechtsseitigen Tumoren fünf Tage nach der intratumoralen Injektion.

Das parentale VSV-GFP führte ebenfalls zu einer Infiltration von CD3+/CD8+-T-Zellen in die injizierten Tumore sieben Tage nach der Behandlung. Zudem konnte in der Versuchsgruppe VSV-GFP eine Zunahme an CD3+-T-Zellen in den linksseitigen Tumoren 14 Tage nach dem Therapiebeginn festgestellt werden.



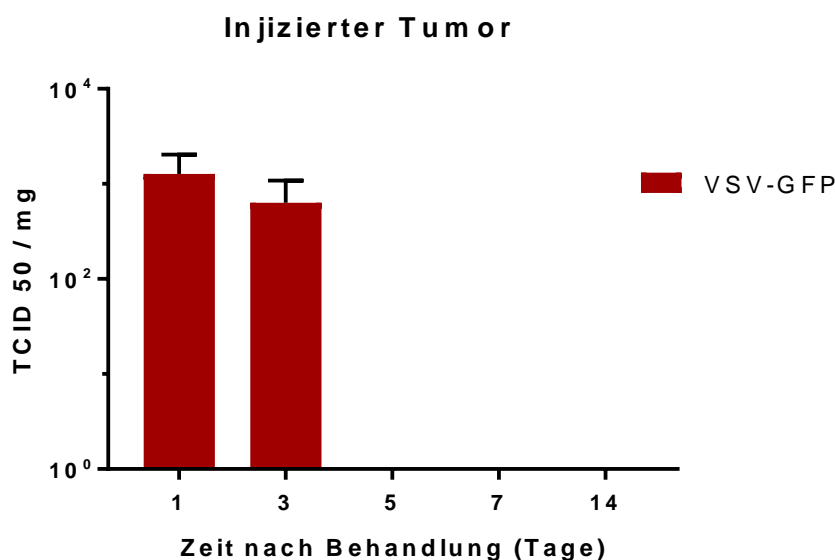
**Abb. 35: Prozentualer Anteil von PD-L1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); Versuchsgruppen: VSV-GFP, VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; R = Rechter injizierter Tumor; L = Linker nicht injizierter Tumor; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Kontrollgruppe PBS, sowie zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im rechten Tumor 14 Tage nach der intratumoralen Injektion; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe, sowie zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP im linken Tumor 1 Tag nach der Behandlung; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-GFP und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im linken Tumor 7 Tage nach Therapiebeginn**

### 2.2.2. Analyse der intratumoralen Virustiter

Um die intratumorale Kinetik der Virusreplikation bestimmen zu können, wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Proben sowohl von den injizierten als auch von den kontralateralen, nicht injizierten subkutanen RIL-175- HCC-Tumoren genommen.

Die Analyse der intratumoralen Virustiter der injizierten Tumore zeigte, dass das parentale VSV-GFP einen und drei Tage nach der Therapie nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 36). Der maximale virale Titer betrug einen Tag nach der intratumoralen Injektion  $1,27 \times 10^3$  TCID 50 pro Milligramm Tumorgewebe. Ab dem fünften Tag nach der Behandlung konnten keine infektiösen VSV-GFP-Partikel mehr festgestellt werden.

In den kontralateralen, nicht injizierten Tumorproben konnten hingegen keine VSV-GFP-Viruspartikel mittels TCID 50 nachgewiesen werden. Aus den erhaltenen Ergebnissen resultierte, dass das parentale VSV-GFP ausschließlich lokal im direkt injizierten Tumor verblieb.



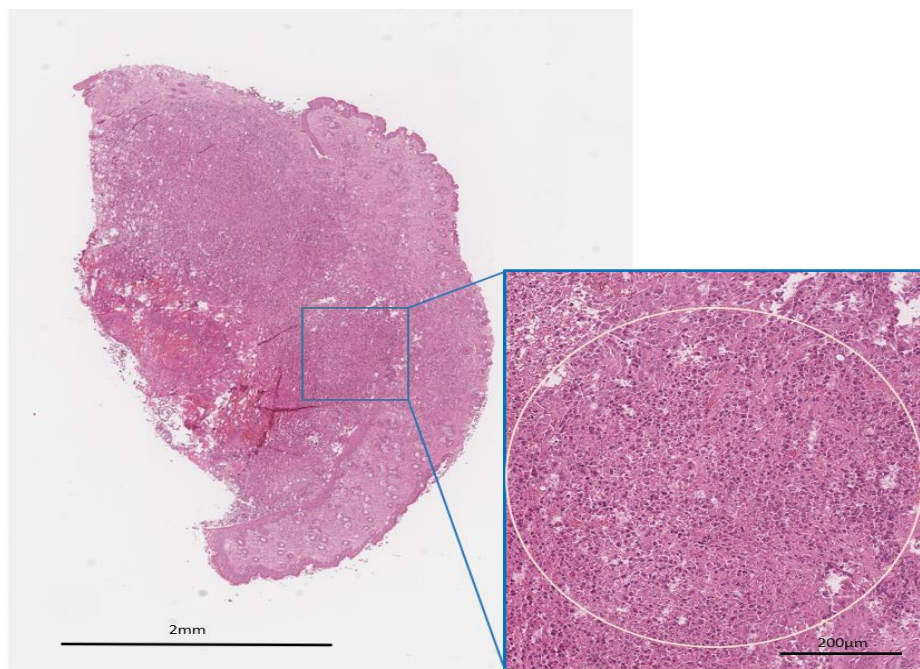
**Abb. 36: Tissue Culture Infection Dose 50 pro mg Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); hierbei handelt es sich um die intratumoral injizierte Versuchsgruppe VSV-GFP; n = 6 Tiere pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM)**

Bei der Analyse der intratumoralen Virustiter der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP konnte weder in den injizierten noch in den kontralateralen, nicht injizierten Tumorproben infektiöse virale Partikel nachgewiesen werden.

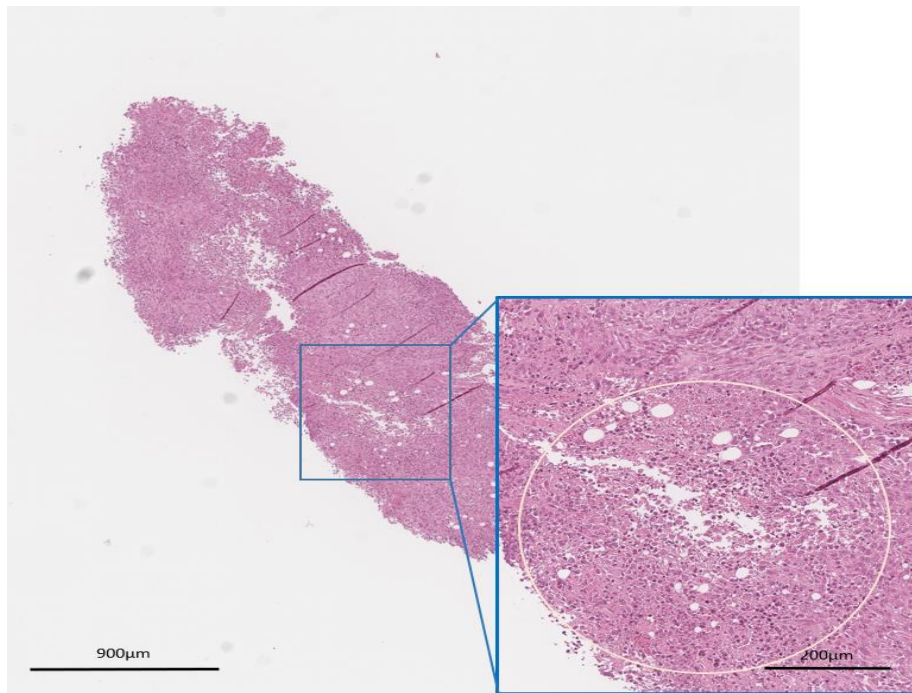
### 2.2.3. Histologie

Von den entnommenen subkutanen RIL-175-Tumorproben wurden in der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der TU München histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden im weiteren Verlauf einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und daraufhin auf das Vorkommen einer Immunzellinfiltration und auf das Auftreten von Zellnekrosen analysiert. Wie bereits beschrieben wurde die Kinetikstudie in zwei Kohorten aufgeteilt.

Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Tumorproben der onkolytischen Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP zeigten charakteristische Zellnekrosen (siehe Abb. 37 und 38).



**Abb. 37: Histologische Darstellung des intratumoralen Nekroseanteils einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6 Maus 7 Tage nach der Behandlung; hierbei handelt es sich um den injizierten Tumor; Nekroseanteil = 80 %**



**Abb. 38: Histologische Darstellung des intratumoralen Nekroseanteils einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6 Maus 7 Tage nach der Behandlung; hierbei handelt es sich um den nicht injizierten Tumor; Nekroseanteil = 70 %**

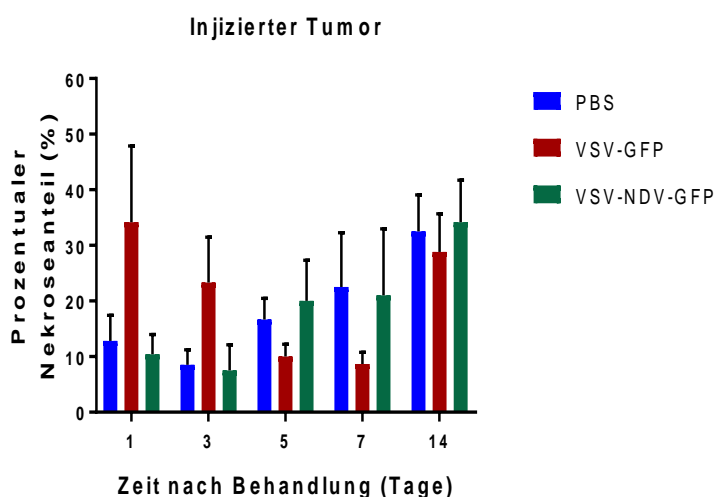
Die Analyse der histologischen Schnitte der Kontrollgruppe PBS zeigte sowohl in den injizierten als auch in den kontralateralen, nicht injizierten Tumoren eine Zunahme der Zellnekrose ab dem dritten Tag *post injectionem* (siehe Abb. 39 a) – b)).

Mäuse, die mit VSV-GFP behandelt wurden, wiesen einen maximalen Nekroseanteil von 34,17 % am ersten Tag nach der intratumoralen Therapie im injizierten Tumor auf. Bis zum siebten Tag nahm der prozentuale Nekroseanteil in den injizierten Tumoren ab und stieg bis 14 Tage nach der Behandlung auf einen Wert von 28,83 % an (siehe Abb. 39 a) – b)).

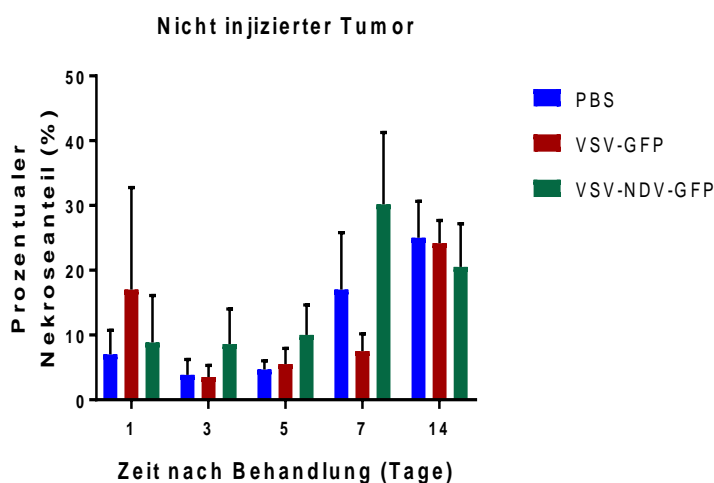
Wie aus Abb. 39 a) – b) hervorgeht, konnte ein Anstieg der Zellnekrose in den injizierten Tumoren der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP ab dem dritten Tag nach Therapiebeginn festgestellt werden.



a)



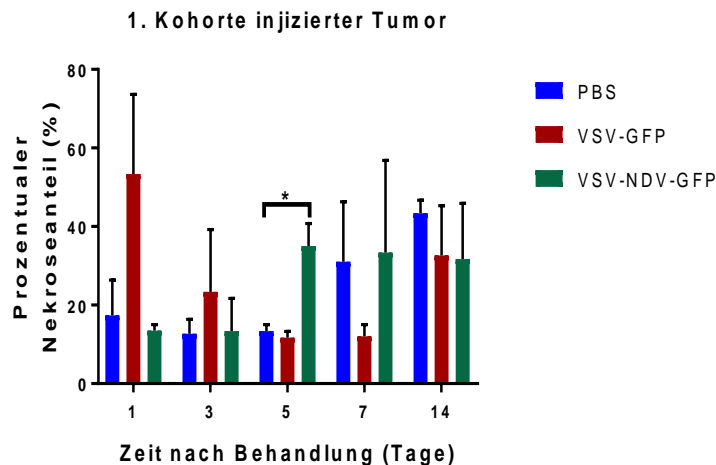
b)



**Abb. 39 a) – b): Prozentualer Nekroseanteil in den Tumorproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n = 6 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung; Versuchsgruppen: VSV-GFP und VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS**

In der ersten Kohorte dieser Kinetikstudie zeigte sich fünf Tage nach der intratumoralen Therapie ein signifikanter Unterschied (\* $p = 0,0295$ ) im prozentualen Nekroseanteil der injizierten Tumorproben zwischen der onkolytischen Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS. Der durchschnittliche

Nekroseanteil in den injizierten Tumoren der mit VN-GFP behandelten Mäuse lag bei 35 %. Der Durchschnittswert der Kontrollgruppe PBS betrug hingegen nur 16,7 % (siehe Abb. 40). Der höhere Prozentsatz an nekrotischen Zellen in den injizierten Tumorproben der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP spiegelte die onkolytische Wirkung des rekombinanten Virus wider.

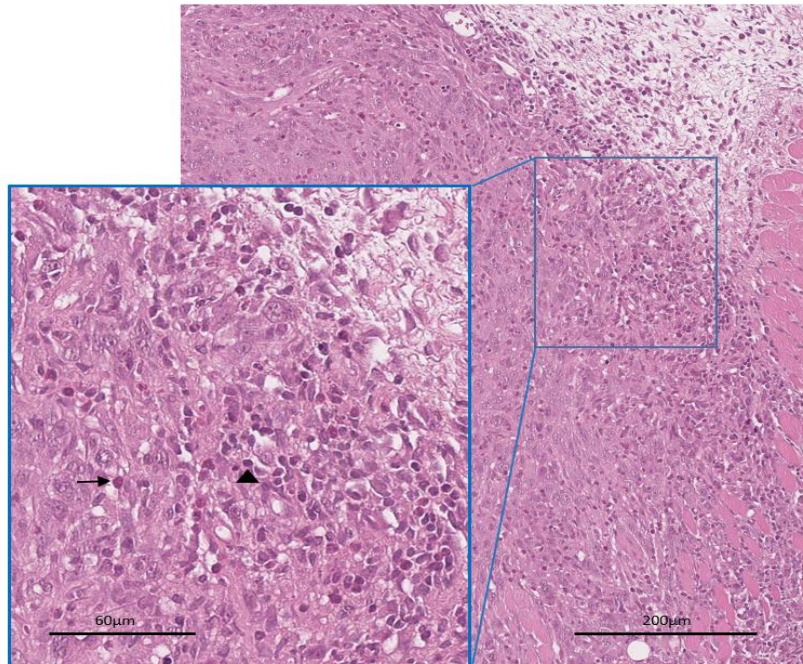


**Abb. 40: Prozentualer Nekroseanteil in den Tumorproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage); dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); ; n = 3 Mäuse pro Gruppe pro Zeitpunkt (1., 3., 5., 7., 14. Tag nach der Behandlung; Versuchsgruppen: VSV-GFP und VSV-NDV-GFP; Kontrollgruppe: PBS; hierbei handelt es sich um den injizierten Tumor der ersten Kohorte; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS 5 Tage nach der intratumoralen Therapie**

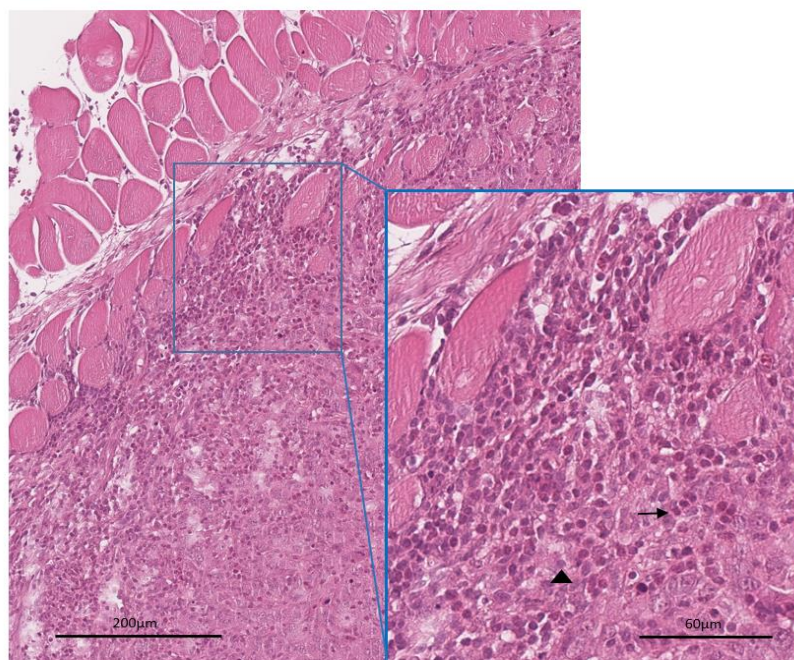
Die histologischen Schnitte der Tumorproben wurden zudem auf das Vorkommen von mononukleären Zellen und eosinophilen Granulozyten analysiert. Obwohl die meisten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte eine Infiltration beider Entzündungszellen zeigten, konnte jedoch kein eindeutiger Bezug auf die onkolytische Virustherapie oder die jeweiligen Zeitpunkte festgestellt werden.

Abb. 41 a) – b) veranschaulicht eine Infiltration von mononukleären Zellen und eosinophilen Granulozyten in die RIL-175 HCC-Tumore einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6 Maus einen Tag nach der intratumoralen Therapie.

**a) Nicht injizierter Tumor**



**b) Injizierter Tumor**



**Abb. 41 a) – b): Histologische Darstellung der Immunezellinfiltration in die RIL-175-HCC-Tumore einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6-Maus 1 Tag nach der Behandlung; a) Nicht injizierter Tumor: E: 1, M:1; b) Injizierter Tumor: E:2; M:2; E = Eosinophile Granulozyten (mit Pfeil markiert); M: Mononukleäre Zellen (mit Pfeilspitze markiert); 1 = geringe Infiltration; 2 = moderate Infiltration**

### **2.3. Ratten-Überlebenszeitanalyse**

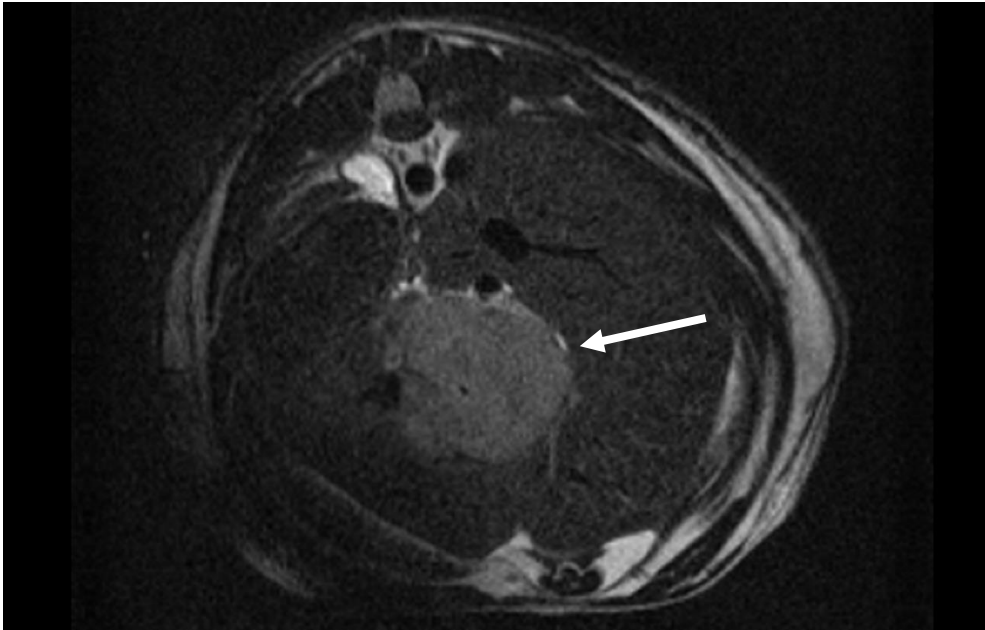
Um das Therapiespektrum im weiteren Versuchsverlauf zu erweitern, wurde eine Überlebenszeitstudie im orthotopen HCC-Rattenmodell durchgeführt (Versuchsaufbau siehe Kapitel III. 2.4.). Im Vergleich zu den vorangegangenen Mausversuchen wurden die Morris HCC-Zellen direkt intrahepatisch implantiert.

Für diese Überlebenszeitstudie wurden insgesamt 20 Buffalo (BUF/CrCrI) Ratten einbezogen (N = 20). Die Versuchsgruppen (VSV-GFP und VSV-NDV-GFP) setzten sich aus jeweils 7 Tieren (n = 7) und die Kontrollgruppe aus 6 Tieren (n = 6) zusammen.

Des Weiteren sollte die systemische Applikation der onkolytischen Viren über die Schwanzvene, verglichen mit der vorherigen intratumoralen Injektion, untersucht werden. Intravenöse Injektionen erfolgten hierbei dreimal im Abstand von sieben Tagen.

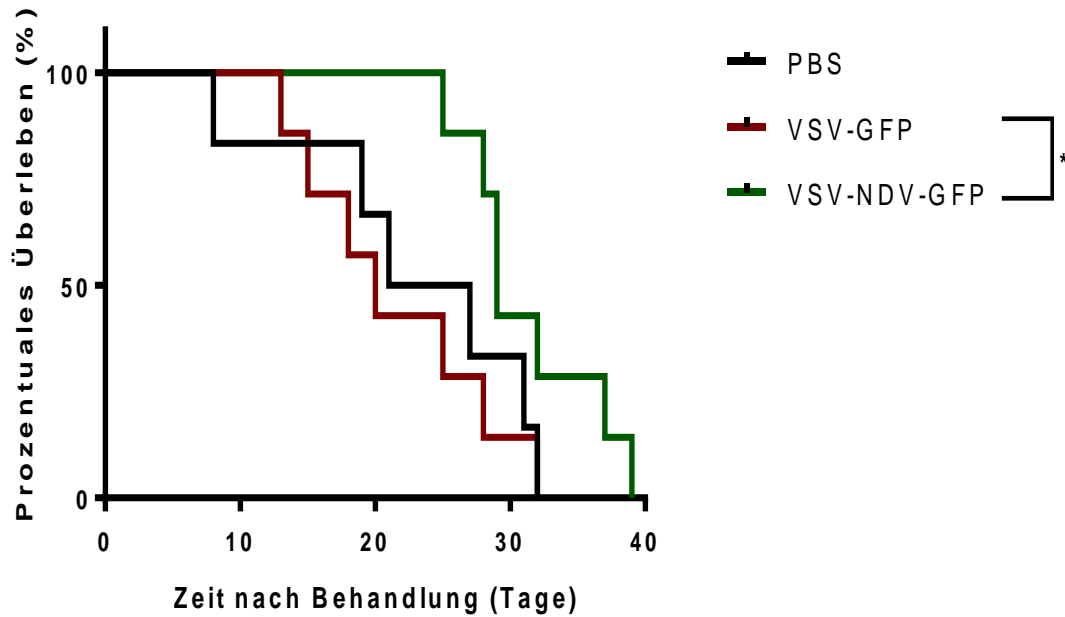
Um eine Aussage über die erfolgreiche Implantation der syngenesischen McA-RH7777 Zellen sowie über den Verlauf des Tumorwachstums treffen zu können, wurden die Ratten zweimal im Zeitintervall von zwei Wochen mittels der Magnetresonanztomographie (MRT) gescannt. Der erste MRT-Scan wurde vor Therapiebeginn durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich die implantierten Morris Hepatoma Zellen zu einem Karzinom entwickelten. Die zweite MRT erfolgte nach 14 Tagen, um die Progredienz des Tumors beurteilen zu können.

Abb. 42 veranschaulicht ein hepatozelluläres Karzinom 24 Tage nach der intrahepatischen Implantation. Der HCC-Tumor war deutlich vom umliegenden Leberparenchym abgrenzbar und zeigte im Vergleich zum ersten MRT-Scan (siehe Kapitel III. 2.4.3.) eine progrediente Größenzunahme.



**Abb. 42: Hepatozelluläres Karzinom 24 Tage nach intrahepatischer McA-RH7777 Implantation (mit Pfeil markiert)**

Wie aus Abb. 43 ersichtlich, konnte bei den Ratten, die mit dem rekombinanten VSV-NDV-GFP behandelt wurden, die längste Überlebenszeit festgestellt werden. Dabei lag die durchschnittliche Überlebenszeit der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP bei 29 Tagen und die der Versuchsgruppe VSV-GFP bei 20 Tagen. Die Kontrollgruppe PBS überlebte im Durchschnitt 24 Tage. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0230$ ) in der Überlebenszeit zwischen den Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP.



**Abb. 43: Prozentuales Überleben der Versuchsgruppen (n = 7 VSV-GFP; n = 7 VSV-NDV-GFP) und der Kontrollgruppe (n = 6 PBS) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen); die intravenöse Therapie über die Schwanzvene erfolgte an Tag 0, 7 und 14; \* signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen VSV-GFP und VSV-NDV-GFP mit  $p < 0,05$**

In diesem Experiment konnte der positive Therapieeffekt der onkolytischen Viro-Immuntherapie mit VSV-NDV-GFP zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms gezeigt werden. Im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP war das rekombinante VSV-NDV-GFP auch systemisch über die intravenöse Injektion in die Schwanzvene wirksam.

## V. DISKUSSION

Aufgrund der steigenden Inzidenz von Krebserkrankungen und des Defizits an effektiven Behandlungsmöglichkeiten, die zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung neuartiger Therapien von sehr großem Interesse.

Onkolytische Viren (OVs) stellen hierbei einen vielversprechenden neuen Therapieansatz auf dem sich entwickelnden Gebiet der Krebsimmuntherapie dar. Der therapeutische Effekt von OVs beruht einerseits auf dem Potenzial eine direkte tumorspezifische Zelllyse und andererseits eine potente antitumorale Immunantwort auszulösen. Die erste Zulassung eines onkolytischen Virus namens „talimogene laherparepvec (T-VEC)“ von der U.S. Food and Drug Administration im Jahr 2015 [98] initiierte in den letzten Jahren eine intensive Forschung im Bereich der OV-Immuntherapie. Zu den vielversprechendsten Vektoren der onkolytischen Virustherapie zählen das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) und das Newcastle Disease Virus (NDV). Trotz der Erfolg versprechenden präklinischen Daten kann das VSV durch die viralbedingte Hepato- und Neurotoxizität nicht bedenkenlos klinisch eingesetzt werden [88-90]. NDV sind tumorspezifische Viren, die sich bereits in mehreren klinischen Studien als ein sicheres und effektives Therapeutikum für die Krebsbehandlung erwiesen haben [71]. Das Virus stellt jedoch ein hohes wirtschaftliches Risiko für die Geflügelindustrie dar. Eine onkolytische Viro-Immuntherapie sollte folglich nicht nur eine potente spezifische Tumor-Zelllyse und eine antitumorale Immunantwort auslösen, sondern sich gleichzeitig auch als ein sicheres Agens für die klinische Translation herausstellen.

Das Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines implantierbaren HCC-Modells in immunkompetenten Mäusen & Ratten und die Optimierung einer neuen Viro-Immuntherapie. Basierend auf der Erfolg versprechenden Studie von Abdullahi et al. [92] sollte das chimäre VSV-NDV-GFP im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht werden. Im ersten Teil dieser Studie wurden zuerst syngene Maus- und Ratten-HCC-Zellen *in-vitro* charakterisiert, um die folgenden *in-vivo* Versuche besser planen zu können. In den *in-vitro* Experimenten wurde insbesondere die Suszeptibilität der Zelllinien für das rekombinante VSV-NDV-

GFP analysiert, um festzustellen, ob die HCC-Zellen für die geplante *in-vivo* Implantation geeignet sind.

Für die unterschiedlichen Tiermodelle wurden sowohl in den Mausstudien als auch in der Ratten-Überlebenszeitanalyse männliche Versuchstiere herangezogen. Wie bereits in Kapitel II. 1.1. beschrieben liegt eine männliche Geschlechtsprädisposition für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms vor [99]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jennifer Altomonte schon in früheren maskulinen Mausstudien (Daten wurden nicht gezeigt) eine männliche Prädisposition für die Entwicklung eines HCCs und auch ein geschlechtsspezifisch schnelleres Fortschreiten der Krankheit nachweisen. Infolgedessen wurden für die Versuche nur männliche Tiere einbezogen, um potenzielle Schwankungen innerhalb des Tumorwachstums und möglicherweise auch in der Reaktion auf die onkolytische Virustherapie zu reduzieren. Große Varianzen hätten die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen erheblich erhöht.

Eine Studie von Maruo et al. zeigte, dass die Tumorentstehung in rodenten Tiermodellen mit zunehmendem Alter und dadurch steigender Immunkompetenz wesentlich abnimmt [100]. Das Alter der Tiere zu Versuchsbeginn (6–8 Wochen) wurde daher so gewählt, dass die Versuchsgruppen möglichst einheitlich gestaltet waren, das Immunsystem schon voll entwickelt war und die Versuchstiere trotzdem noch relativ jung waren.

In dieser Arbeit konnte anhand des ersten Teilversuchs, der *in-vitro* Experimente, gezeigt werden, dass sich die unterschiedlichen HCC-Zelllinien sowohl mit dem parentalen VSV-GFP als auch mit dem chimären VSV-NDV-GFP infizieren ließen. Es gibt einige Faktoren, die die *in-vitro* Versuche beeinflussen können. Krebszellen weisen unter anderem eine differierende Suszeptibilität für virale Infektionen auf. Dies kann zum einem durch die Virusspezifität oder zum anderen durch Defekte in der antiviralen Signalübertragung, die während der malignen Tumorzell-Transformation auftreten, verursacht sein. Offensichtlich gibt es auch noch weitere, bis jetzt nicht bekannte Faktoren, die die Empfänglichkeit einer Zelle für eine onkolytische Virusinfektion beeinflussen. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass sich die *in-vitro* Suszeptibilität für OV-Infektionen nicht immer auf die onkolytische Reaktion *in-vivo* übertragen lässt. *In-vivo* haben sowohl die Mikroumgebung des Tumors als auch immun-medierte Effekte einen Einfluss auf die onkolytische Virustherapie.



Das Vesikuläre Stomatitis Virus führte – wie zu erwarten – zu einem schnellen Zelltod mit typischerweise abgerundeten Zellen und hohen viralen Titern mit einem Peak 24 Stunden *post infectionem*. Der von Finkelshtein et al. beschriebene Pantropismus von Vesikulären Stomatitis Viren [80] konnte anhand der Infektion unterschiedlicher HCC-Zelllinien (DENA Zellklon HCC-EB-2, HCC-EB-3, HCC-EB-6; Morris Hepatoma Zellen (McA-RH7777) und RIL-175 Zellen) gezeigt werden.

Die Anlagerung von Paramyxoviren an die Oberfläche der Wirtszelle erfolgt über das sogenannte Attachment-Protein, die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN). Die HN bindet sich an ubiquitär vorkommende Sialinsäurereste an der Zelloberfläche. Interessanterweise neigen tumoröse Zellen zu einer Überexpression von Sialoglykoproteinen [101]. Der Pantropismus von VSV-NDV-GFP wurde folglich durch die Inkorporation der Hämagglutinin-Neuraminidase in das virale Genom generiert [92]. Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jennifer Altomonte konnte jedoch in vorherigen *in-vitro* Experimenten (Daten wurden nicht gezeigt) eine gewisse Zell-Selektivität des rekombinanten Virus feststellen. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Diskrepanz bedarf noch einer weiteren Forschung.

In dieser Studie zeigten Infektionen mit dem rekombinanten VSV-NDV-GFP eine charakteristische Synzytienbildung zwischen benachbarten tumorösen HCC-Zellen. Die Replikation der VSV-NDV-GFP erfolgte langsamer und mit niedrigeren viralen Titern im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP. Jedoch konnten 48 Stunden nach der Infektion annähernd gleiche Zytotoxizitäten zwischen dem parentalen VSV-GFP und dem chimären VSV-NDV-GFP festgestellt werden. In Bezug auf eine zukünftige klinische Translation der erhaltenen Ergebnisse könnte der Einsatz von dem rekombinanten VSV-NDV-GFP mit niedrigeren viralen Titern, aber mit dem gleichen onkolytischen Effekt, von immenser therapeutischer Bedeutung sein.

Des Weiteren stellt das parentale VSV-GFP aufgrund seiner viralbedingten Hepato- und Neurotoxizität einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor dar. Das parentale Newcastle Disease Virus führt hingegen immer wieder zu wirtschaftlichen Einbußen in der Geflügelindustrie. In der Studie von Abdullahi et al. konnte gezeigt werden, dass das rekombinante rVSV-NDV eine signifikant geringere Zytotoxizität in gesunden Hepatozyten und Neuronen sowie eine deutlich erhöhte MTD (maximal tolerierbare Dosis) in Mäusen aufwies. Zudem konnte keine Pathogenität in infizierten embryonierten Hühnereiern nachgewiesen werden. rVSV-NDV ist somit als lentogen

und nicht virulent für aviäre Spezies einzustufen [92]. Infolgedessen erweist sich das chimäre Virus als ein sicheres Viro-Immuntherapeutikum für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms.

In den *in-vivo* Versuchen wurde mit den Morris Hepatoma Zellen im orthotopen Rattenmodell und den RIL-175 Zellen im subkutanen Mausmodell weitergeforscht. Bei der Morris Hepatoma und der RIL-175 Zelllinie handelt es sich um syngene HCC-Zellen, durch die eine Abstoßungsreaktion durch das körpereigene Immunsystem der Ratte bzw. der Maus vermieden werden konnte. Für die *in-vivo* Experimente wurden ausschließlich immunkompetente Nager herangezogen. Der Vorteil immunkompetenter Tiermodelle ist, eine bessere Aussage über den Therapieeffekt bei Patienten treffen zu können. Die meisten Studien mit onkolytischen Viren werden an immungeschwächten Tiermodellen durchgeführt. Das Immunsystem ist jedoch einerseits für die Regulierung der Virusreplikation (insbesondere die angeborene Immunantwort) zuständig und andererseits trägt es durch die Induktion einer antitumoralen Immunantwort zum Viro-Immuntherapieeffekt bei.

Aufgrund des unterschiedlichen Hygieneniveaus in den Haltungsräumen, in denen die DENA Zellklone generiert wurden, konnten mit diesen Zellen keine weiteren *in-vivo* Versuche im TranslaTUM durchgeführt werden. Jedoch zeigten die vielversprechenden *in-vitro* Daten, dass eine weitere Forschung mit diesen Zelllinien sinnvoll wäre. Zudem könnten die DENA Zelllinien in die weitverbreiteten Wistar-Ratten implantiert werden, wohingegen die Morris Hepatoma Zellen nur in den nicht kommerziell erhältlichen Buffalo-Ratten wachsen.

Für die Tumorumplantation wurden die RIL-175 und die Morris Zellen frisch aus der Kryokonservierung aufgetaut und mit einer niedrigen Passagenummer implantiert, um die Versuchsvoraussetzungen möglichst konstant zu halten. Thompson et al. zeigte, dass mit steigender Passagenummer die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination bzw. eines genetischen Drifts zunimmt und infolgedessen ein funktioneller Verlust der Zellen entstehen kann [102]. Außerdem wurden die HCC-Zellen immer mit der gleichen Zellzahl und an der gleichen Stelle implantiert. Nach jeder Injektion der RIL-175 Zellen wurde eine neue Insulinspritze verwendet, um eine exakte subkutane Injektion sicherzustellen.

Die subkutane Implantation wurde gewählt, da die HCC-Tumore exponiert an der Körperoberfläche wuchsen und dadurch eine quantitative Bestimmung des Tumorwachstums möglich war. Das subkutane Modell hatte außerdem den Vorteil, dass die Bestimmung einer antiviralen Immunantwort durch die Implantation eines kontralateralen, nicht injizierten Tumors möglich war. Des Weiteren konnte den Mäusen eine zusätzliche Belastung durch eine Narkose, die im orthotopen Modell obligat ist, erspart werden. Durch die personenabhängige tägliche Größenbestimmung des Tumors waren jedoch individuelle Größenabweichungen möglich. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die subkutane Implantation von hepatozellulären Karzinomzellen das komplexe Zellsystem der Leber nicht exakt widerspiegeln kann [103].

In der ersten Überlebenszeitstudie im HCC-Mausmodell mit einseitiger Tumorimplantation erfolgte die intratumorale Therapie zweimal im Abstand von sieben Tagen. Die Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP zeigte die kleinsten Tumolvolumina in den ersten 17 Tagen nach der Behandlung. Es konnte eine signifikante Verlängerung (\*) der Überlebenszeit der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP (26 Tage) im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS (15 Tage) festgestellt werden. Mäuse, die mit VSV-GFP therapiert wurden, überlebten im Durchschnitt 21 Tage, zeigten jedoch keine statistisch signifikante Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Aus diesen Ergebnissen resultierte, dass sowohl das rekombinante VSV-NDV-GFP als auch das parentale VSV-GFP eine Onkolyse der HCC-Zellen bewirkte. Jedoch stellte sich das VSV-NDV-GFP als ein effizienteres Therapeutikum dar.

Dies lässt vermuten, dass sich das rekombinante Virus, wie bereits aus den *in-vitro* Versuchen ersichtlich, durch die Ausbildung von Synzytien zwischen den Karzinomzellen effizienter im Tumor ausbreiten konnte und dass diese letztendlich den immunogenen Tumorzelltod herbeiführten. In einer Studie von Bateman et al. wurde gezeigt, dass eine Synzytienbildung durch die Expression des viralen Fusionsproteins der Paramyxoviren zu einer gesteigerten Präsentation von tumorassozierten Antigenen durch die Dendritischen Zellen und folglich zum immunogenen Zelltod führte [39].

In der zweiten Überlebenszeitstudie im HCC-Mausmodell erfolgte die Tumorimplantation beidseitig. In diesem Modell wurde der Tumor auf der rechten

Seite intratumoral behandelt und die induzierte Immunantwort der onkolytischen Virustherapie auf den linksseitigen, nicht injizierten Tumor untersucht.

Im Vergleich zum Vorversuch wurde die Virusapplikation in kürzeren Abständen (alle drei Tage) und dreimal in Folge durchgeführt, mit dem Ziel eine Optimierung der vorherigen Ergebnisse und einen gesteigerten onkolytischen Effekt zu erreichen. Des Weiteren wurde die Gruppengröße von vier auf sechs Mäuse pro Gruppe erhöht, um die statistische Signifikanz der Studienergebnisse zu verbessern.

In dieser Studie konnte ein reduziertes Tumorwachstum bei den Versuchsgruppen VSV-NDV-GFP und VSV-GFP verglichen mit der Kontrollgruppe PBS festgestellt werden. Vor allem die onkolytische Therapie mit VN-GFP zeigte sowohl im injizierten als auch im kontralateralen nicht injizierten Tumor eine nahezu konstant bleibende Tumorgöße innerhalb der ersten zehn Tage nach Behandlungsbeginn. Am achten Tag nach der ersten intratumoralen Injektion konnte ein signifikanter Unterschied (\*) zwischen der Tumorgöße der rechtsseitigen HCC-Tumore der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP dokumentiert werden.

Verglichen mit der ersten Überlebenszeitstudie im Mausmodell führten somit mehrfache Injektionen in kürzeren Zeitabständen zu einem effizienteren onkolytischen Effekt.

Ferner ergab sich sechs Tage nach der ersten intratumoralen Injektion ein signifikanter Unterschied (\*) zwischen den linksseitigen Tumorumfängen der Kontrollgruppe PBS und der Versuchsgruppe VSV-GFP sowie zwischen der Kontrollgruppe und der rekombinanten Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP (\*\*). Dieses Ergebnis lässt sich durch eine virusbedingte antitumorale Immunantwort auf den linken, nicht injizierten Tumor erklären. Wie bereits in Kapitel II. 3. beschrieben, aktivieren onkolytische Viren indirekt das adaptive Immunsystem. Dieses richtet sich gegen den Tumor selbst und führt zur Zerstörung der nicht infizierten tumorösen Nachbarzellen.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der mit Virus therapierten Versuchsgruppen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (\*\*) verlängert werden. Mäuse, die mit VSV-NDV-GFP behandelt wurden, überlebten im Durchschnitt 20 Tage, die Versuchsgruppe VSV-GFP 19 Tage und die Kontrollgruppe PBS 8 Tage. Jedoch mussten drei von insgesamt fünf Mäusen, die PBS erhielten, bis zum achten Tag nach Therapiebeginn aufgrund einer Ruptur der Haut, den Abbruchkriterien entsprechend,

euthanasiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich das rekombinante VSV-NDV-GFP, konform zur ersten Überlebenszeitanalyse, als effektives und noch potenteres Viro-Immuntherapeutikum im Vergleich zum parentalen VSV-GFP darstellte.

Da die Ergebnisse der vorherigen Experimente auf eine immun-medierte therapeutische Wirkung hinwiesen, wurde eine Kinetikstudie durchgeführt. Ziel dieses Experiments war die Analyse der viralbedingten induzierten Immunantwort im injizierten und nicht injizierten Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Wie bereits in der zweiten Überlebenszeitstudie beschrieben wurden die RIL-175 Zellen beidseitig implantiert; jedoch erfolgte die onkolytische Therapie im Vergleich zu den Vorversuchen nur einmal intratumoral, um die Versuchsbedingungen konstant zu halten. Bei mehrfachen Injektionen hätte man zu den späteren Zeitpunkten nicht analysieren können, ob die Immunreaktion auf die erste oder auf eine darauffolgende Injektion zurückzuführen ist. Das Experiment wurde aufgrund des hohen zeitlichen und technischen Aufwandes in zwei Kohorten aufgeteilt.

Die Daten der Durchflusszytometrie zeigten einen signifikanten Unterschied (\*\*) im prozentualen Anteil von CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im injizierten Tumor zwischen der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP und der Kontrollgruppe PBS sieben Tage nach der intratumoralen Therapie. Fünf Tage nach dem Therapiebeginn konnte eine statistische Signifikanz (\*) im prozentualen Anteil von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (injizierte Tumore) zwischen mit VSV-NDV-GFP therapierten Mäusen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen lösen durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula und durch die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  die Apoptose virusinfizierter Zellen aus [104]. Das parentale VSV-GFP führte ebenfalls zu einer Infiltration von CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in die injizierten Tumore sieben Tage nach der Behandlung. Zudem konnte in der Versuchsgruppe VSV-GFP eine Zunahme an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in den linksseitigen Tumoren 14 Tage nach dem Therapiebeginn festgestellt werden. CD3<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen. Folglich konnte eine Immunreaktion durch die onkolytische Virustherapie in den HCC-Tumoren nachgewiesen werden. Um die erhaltenen Ergebnisse noch weiter zu verbessern, wäre es empfehlenswert, das verwendete Protokoll der Durchflusszytometrie für zukünftige Kinetikexperimente zu optimieren. Möglicherweise sind einige Immunzellen durch die technische Bearbeitung der Tumorproben verloren gegangen.

Eine Weiterentwicklung der Forschung mit der Kombination des chimären VSV-NDV-GFP und einer Immuncheckpoint-Blockade könnte zudem zu einer Optimierung der bereits erworbenen Kenntnisse führen. PD1 („Programmed cell death protein 1“) und PD-L1 („Programmed death – Ligand 1“) stellen Marker für eine Erschöpfung des Immunsystems dar. Studien zeigten, dass die Kombination einer onkolytischen Virustherapie mit Immuncheckpoint-Blockaden (Anti-PD1-Antikörper und Anti-PD-L1-Antikörper) zu einer effektiveren Krebs-Immuntherapie führte [105, 106].

Infektiöse virale Titer von VSV-GFP konnten am ersten und dritten Tag nach der intratumoralen Therapie im injizierten Tumor nachgewiesen werden. Eine Distribution in den kontralateralen, nicht injizierten Tumor konnte jedoch nicht festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass das Virus lokal im direkt injizierten Tumor verblieb. Intratumorale VSV-NDV-GFP-Titer konnten weder im injizierten noch im nicht injizierten Tumor nachgewiesen werden. Wie bereits in den *in-vitro* Versuchen (siehe Kapitel IV. 1.) gezeigt wurde, replizierte sich das chimäre Virus mit niedrigeren Titern als das parentale VSV-GFP. Höchstwahrscheinlich kam das erhaltene Ergebnis dadurch zustande, da das VSV-GFP nur aufgrund der höheren viralen Titer detektiert werden konnte.

Die histologischen Daten zeigten ein gehäuftes Vorkommen von Zellnekrosen in den Tumorproben der Kontrollgruppe PBS zu den einzelnen Zeitpunkten. Dies ließ sich durch die schnellere Größenzunahme der Tumore, wie in den vorangegangenen Überlebenszeitstudien dokumentiert, bestätigen. Mäuse, die mit VSV-GFP therapiert wurden, wiesen einen maximalen Nekroseanteil im injizierten Tumor einen Tag nach der intratumoralen Therapie auf. Dieses Ergebnis lässt sich durch die schnelle Replikationskinetik des parentalen VSV-GFP, wie in den *in-vitro* Versuchen gezeigt wurde, erklären. Bis zum siebten Tag nach der Behandlung nahm der prozentuale Nekroseanteil in den injizierten Tumoren anschließend ab und stieg bis zum 14. Tag, aufgrund der Größenzunahme und der damit verbundenen unzureichenden Blutversorgung des Tumors, wieder an. Die histologische Auswertung stellt eine semiquantitative Methode dar. In der ersten Kohorte dieses Experiments konnte ein signifikanter Unterschied (\*) im prozentualen Nekroseanteil zwischen der Kontrollgruppe PBS und der onkolytischen Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP fünf Tage nach Therapiebeginn festgestellt werden. Man geht davon aus, dass der größere Nekroseanteil in der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP auf einem viralbedingten

Zelltod beruht. Die histologischen Daten stammen jedoch aus der Analyse eines einzelnen Anschnitts des Tumors, der möglicherweise nicht repräsentativ für die Reaktion im gesamten Tumor ist. Die Heterogenität innerhalb des Tumors lässt sich einerseits durch den intratumoralen Einstich und andererseits durch die vermutlich nicht gleichmäßige Verteilung der onkolytischen Viren im tumorösen Gewebe erklären. Aufgrund der großen Varianz zwischen den zwei Kohorten empfiehlt es sich, weitere histologische Schnitte aus unterschiedlichen Regionen der einzelnen Tumore zu analysieren.

Um auszuschließen, dass die erhaltenen Ergebnisse lediglich ein Artefakt eines einzelnen und eventuell nicht repräsentativen, künstlichen Nagetier-Tumormodells sind, wurde eine Überlebenszeitstudie im orthotopen Rattenmodell durchgeführt.

Die direkte intrahepatische Implantation von hepatozellulären Karzinomzellen (syngene Morris Hepatoma Zellen) führte zu einem verbesserten Widerspiegeln des komplexen Mikromilieus der Leber. Des Weiteren wurde anstatt einer intratumoralen onkolytischen Therapie der virale Vektor systemisch über die Schwanzvene injiziert. Die systemische Applikation wurde in diesem Experiment gewählt, um die Ergebnisse der von Abdullahi et al. durchgeführten AST-Mausstudie noch weiter zu fundieren. Zudem stellt die systemische Verabreichung des viralen Therapeutikums einen optimalen Weg für die Behandlung von multifokalen bzw. systemischen neoplastischen Erkrankungen dar.

Der Therapieeffekt der onkolytischen Viro-Immuntherapie mit VSV-NDV-GFP spiegelte sich in der signifikanten Verlängerung (\*) der Überlebensdauer im Vergleich zur Versuchsgruppe VSV-GFP wider. Dieses Ergebnis stützte die von Abdullahi et al. durchgeführte Studie, in der die systemische Applikation von rVSV-NDV über die Schwanzvene zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit von immunkompetenten HCC-tragenden AST-Mäusen führte. Die systemische Applikation von rVSV-GFP zeigte hingegen keinen wesentlichen Therapieeffekt [92]. Es ist bekannt, dass die Effektivität der systemischen Applikation von den meisten onkolytischen Viren durch immunologische Barrieren begrenzt wird [107]. Auch in dieser Studie zeigte die systemische Injektion von VSV-GFP keinen Effekt auf die Verlängerung der Überlebenszeit. Um den genauen Mechanismus und somit die systemische Wirksamkeit von VSV-NDV-GFP erklären zu können, sind noch weitere mechanistische Studien notwendig. Zudem wäre es sinnvoll, die Versuchsgruppen und

die Kontrollgruppe auf eine Tieranzahl von zehn Tieren pro Gruppe zu erhöhen, um eine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erhalten und gleichzeitig die Replizierbarkeit dieser Studie zu überprüfen.

Die systemische Wirksamkeit von VSV-NDV-GFP stellt einen großen therapeutischen Vorteil für den späteren klinischen Einsatz dar. Der intravenöse Verabreichungsweg ist im Gegensatz zu einer CT-gesteuerten intratumoralen Injektion zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms eine weniger invasive und nicht so schmerzhaftere Methode für den Patienten. Des Weiteren können Metastasen, die möglicherweise mit einer Bildgebung noch nicht darstellbar sind, zusätzlich therapiert werden.

Wie bereits in den *in-vitro* Experimenten (siehe Kapitel IV. 1.) gezeigt werden konnte, replizieren sich die rekombinanten VSV-NDV-GFP mit niedrigeren Titern als das parentale VSV-GFP. In Bezug auf die systemische Wirksamkeit von VSV-NDV-GFP wird davon ausgegangen, dass dieses Ergebnis durch die fusogene Kapazität des chimären Virus zustande kam. Höchstwahrscheinlich reichen einzelne Virionen aus, sich innerhalb des Tumors zu akkumulieren und durch die Synzytienbildung zwischen den neoplastischen Zellen einen effizienten immunogenen Zelltod auszulösen. Das parentale VSV-GFP ist unter Umständen durch die hohen viralen Titer und der dadurch ausgelösten Immunantwort systemisch nicht wirksam. Es wird spekuliert, dass sowohl die intratumorale als auch die systemische Injektion von höheren Titern des chimären VSV-NDV-GFP zu noch beeindruckenderen therapeutischen Effekten führen könnte. Hierzu bedarf es jedoch weiterer Forschungsarbeiten.

Die aus dieser Studie erhaltenen Ergebnisse zeigen das vielsprechende Potenzial des rekombinanten VSV-NDV-GFP als onkolytische Viro-Immuntherapie für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms. In allen drei Überlebenszeitstudien konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der mit VSV-NDV-GFP behandelten Versuchstiere festgestellt werden. Das chimäre VSV-NDV-GFP stellt somit ein Erfolg versprechendes, effektives und sicheres – im Vergleich zu den parentalen Viren – Therapeutikum für die Entwicklung zukünftiger Krebstherapien dar. Die erworbenen Kenntnisse dieser Studie können nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der tiermedizinischen Onkologie Anwendung finden.



## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

### **Entwicklung eines implantierbaren HCC-Modells in immunkompetenten Mäusen & Ratten und Optimierung einer neuen Viro-Immuntherapie**

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) stellen in 75–85 % der Fälle die häufigste Anzahl der primären Lebertumoren dar. Eine spezielle Form der Krebstherapie, die sich in den letzten Jahren stark entwickelt hat, ist die Viro-Immuntherapie mittels onkolytischer Viren. Trotz einiger vielversprechender präklinischer Studien ist die klinische Translation der onkolytischen Virustherapie oft durch virale Risikofaktoren begrenzt. Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer neuen Viro-Immuntherapie. Basierend auf einer vielversprechenden Studie sollte das chimäre VSV-NDV-GFP für die zukünftige klinische Anwendung weiterentwickelt werden. In dieser Arbeit wurde das rekombinante VSV-NDV-GFP im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP an unterschiedlichen Tiermodellen für die Behandlung des HCCs getestet. Im ersten Teil dieser Studie wurden *in-vitro* Versuche in rodenten HCC-Zellen durchgeführt. Die Replikation der chimären VSV-NDV-GFP erfolgte langsamer und mit niedrigeren viralen Titern im Vergleich zu dem parentalen VSV-GFP. Jedoch konnten 48 Stunden nach der Infektion annähernd gleiche Zytotoxizitäten festgestellt werden. In den folgenden Überlebenszeitstudien im subkutanen HCC-Mausmodell sollte der Therapieeffekt der onkolytischen Viren durch intratumorale Injektionen analysiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten in beiden Überlebenszeitstudien eine signifikant verlängerte Überlebenszeit der Versuchsgruppe VSV-NDV-GFP im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS. Mehrfache Injektionen im Abstand von drei Tagen führten in der zweiten Überlebenszeitanalyse zu einer verbesserten Therapie mit dem chimären Virus und zudem zu einer vermutlich viralbedingten antitumoralen Immunantwort. Um die Kinetik der Virusreplikation sowie die Kinetik der induzierten Immunantwort überprüfen zu können, wurde im weiteren Versuchsverlauf eine Kinetikstudie durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen auf eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-medierte Immunantwort hin, die durch das rekombinante VSV-NDV-GFP hervorgerufen wurde. Um die onkolytische Therapie in einem zusätzlichen präklinischen Tiermodell zu untersuchen, wurden syngene Ratten-HCC-Zellen intrahepatisch in immunkompetente

Ratten implantiert. Die virale Therapie erfolgte über systemische Injektionen in die Schwanzvene. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der mit VSV-NDV-GFP behandelten Ratten im Vergleich zur Versuchsgruppe VSV-GFP. Die Resultate bestätigten die Kenntnisse der vorangegangenen Studie, dass auch die systemische Verabreichung des chimären VSV-NDV-GFP zu einem therapeutischen Effekt in orthotopen HCCs führte. Das rekombinante VSV-NDV-GFP erwies sich in dieser Studie als ein vielversprechendes onkolytisches Immuntherapeutikum für die zukünftige Therapie des hepatozellulären Karzinoms.

## VII. SUMMARY

### **Establishment of an implantable hepatocellular carcinoma model in immune competent mice & rats and optimization of a novel viro-immunotherapy**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common form of primary liver tumors accounting for 75–85 % of cases. A special form of cancer therapy that has been under intense development in recent years is viro-immunotherapy using oncolytic viruses. Despite some promising preclinical studies, the clinical translation of oncolytic virus therapy is often limited by viral risk factors. The aim of this study was to optimize a new viro-immunotherapy. Based on an encouraging study, the chimeric VSV-NDV-GFP should be further developed for future clinical use. In this study, the recombinant VSV-NDV-GFP was compared to the parental VSV-GFP on different animal models for the treatment of hepatocellular carcinoma. In the first part of this study, *in-vitro* experiments were carried out in rodent HCC cells. Replication of the VSV-NDV-GFP was slower and with lower viral titers compared to the parental VSV-GFP. However, both viruses led to approximately the same extent of cytotoxicity 48 hours after infection. In the following survival studies in the subcutaneous HCC mouse model, the therapeutic effect of the oncolytic viruses was analyzed by intratumoral injections. The results obtained showed a significantly longer survival of mice in the VSV-NDV-GFP treatment group compared to the PBS control group in both survival studies. Multiple injections at three-day intervals in the second survival analysis led to improved therapeutic responses with the chimeric virus and resulted in a presumable viral-mediated antitumoral immune response. In order to investigate the kinetics of virus replication and the kinetics of the induced immune response, a kinetics study was carried out in a subsequent experiment. The results indicated a CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated immune response elicited by the recombinant VSV-NDV-GFP. In order to investigate the therapy in an additional preclinical tumor model, syngeneic rat HCC cells were implanted intrahepatically in the following study in immune competent rats. The viral therapy was carried out via systemic injections into the tail vein. The results showed a significant survival prolongation of the rats treated with VSV-NDV-GFP compared to the treatment group VSV-GFP, confirming previous findings that the chimeric VSV-

NDV can result in therapeutic responses in orthotopic HCC, even when administered by systemic application. This study indicates that the recombinant VSV-NDV-GFP is a promising oncolytic immunotherapeutic for the future therapy of hepatocellular carcinoma.

**VIII. LITERATURVERZEICHNIS**

1. WHO. *Key facts*. 2018, September 12 [cited 2019 December 10]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
3. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
4. Davis, J.J. and B. Fang, Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. J Gene Med, 2005. **7**(11): p. 1380-9.
5. Balogh, J., et al., *Hepatocellular carcinoma: a review*. J Hepatocell Carcinoma, 2016. **3**: p. 41-53.
6. But, D.Y., C.L. Lai, and M.F. Yuen, *Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(11): p. 1652-6.
7. WHO. *Hepatitis B*. 2019, July 18 [cited 2019 December 10]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
8. IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 59. 1994, Lyon, France.
9. Jewell, J. and N. Sheron, Trends in European liver death rates: implications for alcohol policy. Clinical Medicine, 2010. **10**: p. 259-63.
10. Gao, C., et al., Potential role of diabetes mellitus in the progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a cross-sectional case-control study from Chinese patients with HBV infection. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2013. **12**(4): p. 385-393.
11. Rinella, M.E., Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. JAMA, 2015. **313**(22): p. 2263-73.
12. Larsson, S.C. and A. Wolk, Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. Br J Cancer, 2007. **97**(7): p. 1005-8.

13. van Meer, S., et al., Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: Results from a large cohort in the Netherlands. *J Hepatol*, 2015. **63**(5): p. 1156-63.
14. Bialecki, E.S. and A.M. Di Bisceglie, *Diagnosis of hepatocellular carcinoma*. *HPB (Oxford)*, 2005. **7**(1): p. 26-34.
15. RANDEEP, K., \* , et al., *Clinical Significance of Elevated a-Fetoprotein in Adults and Children*. *Digestive Diseases and Sciences*, 2001, August. **46**: p. 1709-1713.
16. Di Bisceglie, A.M., et al., Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol*, 2005. **43**(3): p. 434-41.
17. Colombo, M., *Screening for Cancer in Viral Hepatitis*. *Clinics in Liver Disease*, 2001, February 1. **5**(1): p. 109-122.
18. Khien, V.V., 1, et al., Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biological Markers*, 2001, April. **16**(2): p. 105-111.
19. TAKETA, K., et al., Lectin-Reactive Profiles of Alpha-Fetoprotein Characterizing Hepatocellular Carcinoma and Related Conditions. *Gastroenterology*, 1990. **99**: p. 508-518.
20. Motoyasu, I., M.D., et al., Simultaneous Measurements of Serum a-Fetoprotein and Protein Induced by Vitamin K Absence for Detecting Hepatocellular Carcinoma. *The American Journal of Gastroenterology* 2000. **95**(4): p. 1036-1040.
21. Sangiovanni, A., et al., The diagnostic and economic impact of contrast imaging techniques in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Gut*, 2010. **59**(5): p. 638-44.
22. Vilana, R., et al., Intrahepatic peripheral cholangiocarcinoma in cirrhosis patients may display a vascular pattern similar to hepatocellular carcinoma on contrast-enhanced ultrasound. *Hepatology*, 2010. **51**(6): p. 2020-9.

23. Borzio, M., et al., The evaluation of fine-needle procedures for the diagnosis of focal liver lesions in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 1994. **20**: p. 117-121.
24. Bruix, J., M. Sherman, and D. American Association for the Study of Liver, *Management of hepatocellular carcinoma: an update*. *Hepatology*, 2011. **53**(3): p. 1020-2.
25. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, D.K.e.V.u.D.K.e.V. *Leitlinienprogramm Onkologie `Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms´*. 2013, May [cited 2019 December 12]; Available from: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/S3-HCC-OL-Langversion-V1.0.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/HCC/S3-HCC-OL-Langversion-V1.0.pdf).
26. Allemann, P., et al., Long-term outcome after liver resection for hepatocellular carcinoma larger than 10 cm. *World J Surg*, 2013. **37**(2): p. 452-8.
27. Takayasu, K., et al., Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology*, 2006. **131**(2): p. 461-9.
28. Lewandowski, R.J., et al., *Transcatheter Intraarterial Therapies: Rationale and Overview* *Radiology*, 2011, June. **259**(3): p. 641-657.
29. Llovet, J.M., M.D., et al., *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma*. *The New England Journal of Medicine*, 2008, July 24. **359**(4): p. 378-390.
30. Liptak, J.M., BVSc, MVetClinStud, FACVSc\* , W.S. Dernell, DVM, MS, DACVS, and S.J. Withrow, DVM,DACVS, DACVIM (Oncology), *Liver Tumors in Cats and Dogs*. *Compendium*, 2004, January: p. 50-57.
31. Kinsey, J.R., et al., Factors associated with long-term survival in dogs undergoing liver lobectomy as treatment for liver tumors. *Can Vet J*, 2015, June. **56**: p. 598-604.
32. PATNAIK, A.K., A.I. HURVITZ, and P.H. LIEBERMAN, *Canine Hepatic Neoplasms: A Clinicopathologic Study*. *Vet.Pathol.*, 1980. **17**: p. 553-564.
33. Krabbe, T. and J. Altomonte, *Fusogenic Viruses in Oncolytic Immunotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(7).

34. STOJDL , D.F., et al., Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature Medicine*, 2000, July. **6**: p. 821-825.
35. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 1-10.
36. Melcher, A., et al., Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Mol Ther*, 2011. **19**(6): p. 1008-16.
37. Podbilewicz, B., *Virus and cell fusion mechanisms*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014. **30**: p. 111-39.
38. Salsman, J., et al., Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol*, 2005. **79**(13): p. 8090-100.
39. Bateman, A.R., et al., Viral Fusogenic Membrane Glycoproteins Kill Solid Tumor Cells by Nonapoptotic Mechanisms That Promote Cross Presentation of Tumor Antigens by Dendritic Cells. *Cancer Research*, 2002, November 15. **62**: p. 6566–6578.
40. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
41. Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin, [*Innate immunity: structure and function of TLRs*]. *Med Sci (Paris)*, 2007. **23**(1): p. 67-73.
42. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
43. Sen, G.C., *VIRUSES AND INTERFERONS*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001. **55**: p. 255-281.
44. Rammensee, H.-G., T. Friede, and S. Stevanovid, *MHC ligands and peptide motifs: first listing*. *Immunogenetics*, 1995, February. **41**: p. 178-228.
45. AHLENSTIEL, G. and B. REHERMANN, *Hepatic NK, NKT, and T Cells*, ed. G. M.E., V. J.M., and M. M.P. 2007, *Liver Immunology*: Humana Press.



46. O'Farrelly C. and D. D.G., *A Short Primer on Fundamental Immunology*, ed. Gershwin M.E., Vierling J.M., and M.P. Manns. 2007, Liver immunology: Humana Press.
47. Inoue, H. and K. Tani, Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(1): p. 39-49.
48. Kepp, O., et al., Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(9): p. e955691.
49. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. 2002, New York, Garland Science.
50. Law, M. and L. Hangartner, *Antibodies against viruses: passive and active immunization*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 486-92.
51. Altomonte, J. and O. Ebert, Sorting Out Pandora's Box: Discerning the Dynamic Roles of Liver Microenvironment in Oncolytic Virus Therapy for Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 85.
52. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. *Liver Int*, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
53. Parker, G.A. and C.A. Picut, *Liver immunobiology*. *Toxicol Pathol*, 2005. **33**(1): p. 52-62.
54. Manickan, E., et al., Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors. *Mol Ther*, 2006. **13**(1): p. 108-17.
55. Guidotti, L.G. and F.V. Chisari, *Cytokine-mediated control of viral infections*. *Virology*, 2000. **273**(2): p. 221-7.
56. Trinchieri, G., Biology of Natural Killer Cells, in *Advances in Immunology* Volume 47. 1989. p. 187-376.
57. Altomonte, J., et al., Exponential enhancement of oncolytic vesicular stomatitis virus potency by vector-mediated suppression of inflammatory responses in vivo. *Mol Ther*, 2008. **16**(1): p. 146-53.

58. Alexander, D.J., *Newcastle disease and other avian paramyxoviruses*. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2000. **19**(2): p. 443-462.
59. Hines, N.L. and C.L. Miller, Avian paramyxovirus serotype-1: a review of disease distribution, clinical symptoms, and laboratory diagnostics. Vet Med Int, 2012. **2012**: p. 708216.
60. Awan, M.A., M.J. Otte, and A.D. James, *The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review*. Avian Pathol, 1994. **23**(3): p. 405-23.
61. (LAVES), N.L.f.V.u.L. *Newcastle Disease*. 2018, September 26 [cited 2019 Decemcer 22]; Available from:  
[https://tierseucheninfo.niedersachsen.de/anzeigepflichtige\\_tierseuchen/gefluegelseuchen/newcastle\\_krankheit/newcastle-disease-21656.html](https://tierseucheninfo.niedersachsen.de/anzeigepflichtige_tierseuchen/gefluegelseuchen/newcastle_krankheit/newcastle-disease-21656.html).
62. Zamarin, D. and P. Palese, Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. Future Microbiol, 2012. **7**(3): p. 347-67.
63. Alexander, D.J. and D.A. Senne, *Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections*. Diseases of Poultry, ed. Y.M. Saif. 2008.
64. Cornax, I., et al., Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase proteins contribute to its macrophage host range. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 6): p. 1189-1194.
65. Huang, Z., et al., Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8676-85.
66. Song, H., et al., *Application of Newcastle disease virus in the treatment of colorectal cancer*. World J Clin Cases, 2019, August 26. **7**(16): p. 2134-2412.
67. Hulo, C., et al., *ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D576-82.
68. Chang, A. and R.E. Dutch, Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. Viruses, 2012. **4**(4): p. 613-36.

69. Sanchez-Felipe, L., E. Villar, and I. Munoz-Barroso, *Entry of Newcastle Disease Virus into the host cell: role of acidic pH and endocytosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(1 Pt B): p. 300-9.
70. Vigil, A., et al., Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8285-92.
71. Altomonte, J., et al., Engineered newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2010. **18**(2): p. 275-84.
72. SERGEL, T.A., L.W. MCGINNES, and T.G. MORRISON, A Single Amino Acid Change in the Newcastle Disease Virus Fusion Protein Alters the Requirement for HN Protein in Fusion. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2000, June. **74**: p. 5101–5107.
73. Elankumaran, S., D. Rockemann, and S.K. Samal, Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol*, 2006. **80**(15): p. 7522-34.
74. LETCHWORTH, G.J., RODRIGUEZ; L. L., and J.D.C. BARRERA, *Vesicular Stomatitis*. *The Veterinary Journal* 1999. **157**: p. 239-260.
75. Cureton, D.K., et al., The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(9): p. e1001127.
76. LAWSON, N.D., et al., *Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, May. **92**: p. 4477-4481.
77. Sun, X., et al., Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses. *Future Virol*, 2010. **5**(1): p. 85-96.
78. Velazquez-Salinas, L., et al., Complete Genome Sequences of Two Vesicular Stomatitis New Jersey Viruses Representing the 2012 U.S. Epidemic Strain and Its Closest Relative Endemic Strain from Southern Mexico. *Genome Announc*, 2018. **6**(7).
79. BLV, B.f.L.u.V. *Vesikuläre Stomatitis*. 2019, May [cited 2019 December 23]; Available from:

- <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/tiere/tierseuchen/uebersicht-seuchen/alle-tierseuchen/vesikulaere-stomatitis.html>.
80. Finkelshtein, D., et al., LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(18): p. 7306-11.
81. HEINE, J.W. and C.A. SCHNAITMAN, *Entry of Vesicular Stomatitis Virus into L Cells*. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 1971, November. **8**(5): p. 786-795.
82. Sun, X., et al., Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 2005. **338**(1): p. 53-60.
83. Balachandran, S., M. Porosnicu, and G.N. Barber, Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol*, 2001. **75**(7): p. 3474-9.
84. Breitbach, C.J., et al., *Targeting tumor vasculature with an oncolytic virus*. *Mol Ther*, 2011. **19**(5): p. 886-94.
85. Fernandez, M., et al., Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. *J Virol*, 2002. **76**(2): p. 895-904.
86. Kubo, T., et al., Oncolytic vesicular stomatitis virus administered by isolated limb perfusion suppresses osteosarcoma growth. *J Orthop Res*, 2011. **29**(5): p. 795-800.
87. Obuchi, M., M. Fernandez, and G.N. Barber, Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J Virol*, 2003. **77**(16): p. 8843-56.
88. Johnson, J.E., et al., Neurovirulence Properties of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors in Non-Human Primates. *Virology*, 2007, March 30. **360**(1): p. 36-49.
89. van den Pol, A.N., K.P. Dalton, and J.K. Rose, Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J Virol*, 2002. **76**(3): p. 1309-27.

90. Zhang, L., et al., Safety Studies in Tumor and Non-Tumor-Bearing Mice in Support of Clinical Trials Using Oncolytic VSV-IFNbeta-NIS. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2016. **27**(3): p. 111-22.
91. Quiroz, E., et al., *A Human Case of Encephalitis Associated with Vesicular Stomatitis Virus (Indiana Serotype) Infection* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1988, September 1. **39**(3): p. 312-314.
92. Abdullahi, S., et al., A Novel Chimeric Oncolytic Virus Vector for Improved Safety and Efficacy as a Platform for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J Virol*, 2018. **92**(23).
93. Altomonte, J., et al., Synergistic antitumor effects of transarterial viroembolization for multifocal hepatocellular carcinoma in rats. *Hepatology*, 2008. **48**(6): p. 1864-73.
94. Ebert, O., et al., Syncytia Induction Enhances the Oncolytic Potential of Vesicular Stomatitis Virus in Virotherapy for Cancer. *CANCER RESEARCH*, 2004, May 1. **64**: p. 3265–3270.
95. Cuadrado-Castano, S., et al., The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res*, 2015. **209**: p. 56-66.
96. Stahl, S., et al., Tumor agonist peptides break tolerance and elicit effective CTL responses in an inducible mouse model of hepatocellular carcinoma. *Immunol Lett*, 2009. **123**(1): p. 31-7.
97. Carlsson, G., B. Gullberg, and L. Hafström, *Estimation of Liver Tumor Volume Using Different Formulas An Experimental Study in Rats\**. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983. **105**: p. 20-23.
98. LEDFORD, H., *Cancer-fighting viruses near market*. *Nature*, 2015, October 29. **526**: p. 622-623.
99. European Association For The Study Of The, L., R. European Organisation For, and C. Treatment Of, *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2012. **56**(4): p. 908-43.

100. MARUO, K., et al., *HUMAN TUMOUR XENOGRAFTS IN ATHYMIC RATS AND THEIR AGE DEPENDENCE*. Br. J. Cancer, 1982, January 25. **45**: p. 786-789.
101. Matveeva, O.V., et al., Oncolysis by paramyxoviruses: multiple mechanisms contribute to therapeutic efficiency. Mol Ther Oncolytics, 2015. **2**.
102. Thompson, M.L., E.J. Kunkel, and R.O. Ehrhardt, *Cryopreservation and Thawing of Mammalian Cells*, in *eLS*. 2014.
103. Santos, N.P., A.A. Colaco, and P.A. Oliveira, *Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review*. Tumour Biol, 2017. **39**(3): p. 1010428317695923.
104. Rosendahl Huber, S., et al., T cell responses to viral infections - opportunities for Peptide vaccination. Front Immunol, 2014. **5**: p. 171.
105. Engeland, C.E., et al., CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. Mol Ther, 2014. **22**(11): p. 1949-59.
106. Ribas, A., et al., Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. Cell, 2017. **170**(6): p. 1109-1119 e10.
107. Willmon, C., et al., Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. Mol Ther, 2009. **17**(10): p. 1667-76.

**IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abb. 1: Schematischer Versuchsaufbau; (i.t. = intratumoral) .....</b>	<b>2</b>
<b>Abb. 2: CE-MRT-Bilder .....</b>	<b>5</b>
<b>Abb. 3: Aufbau eines Newcastle Disease Virions.....</b>	<b>14</b>
<b>Abb. 4: Genom des Newcastle Disease Virus .....</b>	<b>14</b>
<b>Abb. 5: Aufbau eines Vesikulären Stomatitis Virions.....</b>	<b>16</b>
<b>Abb. 6: Schematische Darstellung des Vesikulären Stomatitis Genoms.....</b>	<b>18</b>
<b>Abb. 7: Konstruktion des rekombinanten VSV-NDV.....</b>	<b>19</b>
<b>Abb. 8: Infektion der humanen Zelllinie Huh7 .....</b>	<b>20</b>
<b>Abb. 9: Die Schwanzveneninjektion von rVSV-NDV führte zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit in orthotopen, multifokalen HCC-Tumoren in AST Mäusen.....</b>	<b>22</b>
<b>Abb. 10: Versuchsaufbau: Einseitige Tumorimplantation und intratumorale Therapie .....</b>	<b>31</b>
<b>Abb. 11: Versuchsaufbau: Beidseitige Tumorimplantation und intratumorale Therapie .....</b>	<b>32</b>
<b>Abb. 12: Versuchsaufbau: Kinetikstudie .....</b>	<b>33</b>
<b>Abb. 13: Versuchsaufbau: Überlebenszeitstudie im Rattenmodell .....</b>	<b>38</b>
<b>Abb. 14: Hepatozelluläres Karzinom 10 Tage nach intrahepatischer McA-RH7777 Implantation.....</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 15: Lichtmikroskopische Morphologie infizierter HCC-Zellen (<i>in-vitro</i>); 18 Stunden nach VSV-NDV-GFP bzw. VSV-GFP Infektion (MOI 1) .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 16: Lichtmikroskopische Morphologie infizierter HCC-Zellen (<i>in-vitro</i>); 48 Stunden nach VSV-NDV-GFP bzw. VSV-GFP Infektion (MOI .01) .....</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 17: Lichtmikroskopische Morphologie der RIL-175 Zellen (<i>in-vitro</i>) 48 Stunden <i>post infectionem</i> (MOI 1).....</b>	<b>46</b>

<b>Abb. 18 a) – e): Laktatdehydrogenase-Freisetzung nach der Infektion mit dem parentalen VSV-GFP und dem rekombinanten VSV-NDV-GFP .....</b>	<b>49</b>
<b>Abb. 19 a) – e): Virale Titer infizierter HCC-Zelllinien .....</b>	<b>55</b>
<b>Abb. 20: Tumorzvolumen (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>58</b>
<b>Abb. 21: Tumorzvolumina (in mm<sup>3</sup>) der einzelnen Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage).....</b>	<b>59</b>
<b>Abb. 22: Prozentuales Überleben der Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Therapie (in Tagen) .....</b>	<b>60</b>
<b>Abb. 23: Tumorzvolumen (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>62</b>
<b>Abb. 24: Tumorzvolumen (in mm<sup>3</sup>) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>63</b>
<b>Abb. 25: Tumorzvolumina (in mm<sup>3</sup>) der einzelnen Mäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage).....</b>	<b>65</b>
<b>Abb. 26: Prozentuales Überleben der Versuchsgruppen (n = 6 VSV-GFP; n = 6 VSV-NDV-GFP) und der Kontrollgruppe (n = 5 PBS) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>66</b>
<b>Abb. 27: Prozentualer Anteil von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>69</b>
<b>Abb. 28: Prozentualer Anteil von CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>70</b>
<b>Abb. 29: Prozentualer Anteil von CD3<sup>+</sup>/PD1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>71</b>
<b>Abb. 30: Prozentualer Anteil von CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/PD1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>72</b>
<b>Abb. 31: Prozentualer Anteil von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen).....</b>	<b>73</b>



<b>Abb. 32: Prozentualer Anteil von toten Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>75</b>
<b>Abb. 33: Prozentualer Anteil von lebenden Zellen (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>76</b>
<b>Abb. 34: Prozentualer Anteil von GFP (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>77</b>
<b>Abb. 35: Prozentualer Anteil von PD-L1 (%) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>79</b>
<b>Abb. 36: Tissue Culture Infection Dose 50 pro mg Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>80</b>
<b>Abb. 37: Histologische Darstellung des intratumoralen Nekroseanteils einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6 Maus 7 Tage nach der Behandlung; hierbei handelt es sich um den injizierten Tumor .....</b>	<b>81</b>
<b>Abb. 38: Histologische Darstellung des intratumoralen Nekroseanteils einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6 Maus 7 Tage nach der Behandlung; hierbei handelt es sich um den nicht injizierten Tumor .....</b>	<b>82</b>
<b>Abb. 39 a) – b): Prozentualer Nekroseanteil in den Tumorproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage).....</b>	<b>83</b>
<b>Abb. 40: Prozentualer Nekroseanteil in den Tumorproben in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (Tage).....</b>	<b>84</b>
<b>Abb. 41 a) – b): Histologische Darstellung der Immunzellinfiltration in die RIL-175-HCC-Tumore einer mit VSV-NDV-GFP therapierten C57BL/6-Maus 1 Tag nach der Behandlung.....</b>	<b>85</b>
<b>Abb. 42: Hepatozelluläres Karzinom 24 Tage nach intrahepatischer McA-RH7777 Implantation.....</b>	<b>87</b>
<b>Abb. 43: Prozentuales Überleben der Versuchsgruppen (n = 7 VSV-GFP; n = 7 VSV-NDV-GFP) und der Kontrollgruppe (n = 6 PBS) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung (in Tagen) .....</b>	<b>88</b>



## **X. TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1: Für die Versuche verwendete Reagenzien.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 2: Für die Versuche verwendete Materialien und Geräte, die in den einzelnen Kapiteln nicht explizit aufgeführt sind.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 3: Standardisiertes Protokoll der HE-Färbung mit verwendeten Substanzen und Zeitangabe.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 4: Zusammensetzung Antikörper-Mix (AK: 1:100); die Verdünnung erfolgte in PBS .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 5: Für die intrahepatische Tumorumplantation benötigte Instrumente ..</b>	<b>40</b>



## **XI. DANKSAGUNG**

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Jennifer Altomonte, die mir diese Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München ermöglichte. Frau PD Dr. Altomonte danke ich besonders für die Unterstützung und Einarbeitung in die Grundlagen der Forschung mit onkolytischen Viren.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Von ganzem Herzen danke ich Teresa Krabbe und Janina Marek, die mich sowohl im Labor als auch bei den Tierversuchen jederzeit unterstützten und mir halfen.

Ein besonderes Dankeschön geht an Elisabeth Bliemsrieder, die mir ihre generierten DENA-Zelllinien zur Verfügung stellte und mir immer mit gutem Rat zur Seite stand.

Frau Dr. med. vet. Katja Steiger und ihren Mitarbeiterinnen Frau Dr. med. vet. Hsi-Yu Yen und Frau Olga Seelbach danke ich herzlich für die histologische Bearbeitung und Auswertung der Tumorproben.

Mein Dank gilt auch Daniela Steinmetz und Marina Geisler für die gute Zusammenarbeit und das gewissenhafte und liebevolle Pflegen der Tiere.

Ich bedanke mich auch herzlichst bei dem kompletten Laborteam unserer Arbeitsgruppe, das mir jederzeit zur Seite stand.

Zuletzt bedanke ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie. Meinen Eltern, Gisela und Berndt Smutny, danke ich für die jahrelange Unterstützung und den Rückhalt. Dank meiner Eltern und auch meines Bruders Florian erreichte ich die bis jetzt von mir angestrebten Ziele.