

Aus der Klinik für pädiatrische Onkologie und Hämatologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. N. Graf

Untersuchung der Zelltodinduktion durch onkolytische Viren bei Glioblastom-Zelllinien

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von:

Anh Khoa Dennis Huynh

geb. am: 12.07.1996 in Dortmund

Tag der Promotion: 16. Dezember 2022
Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Graf
2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Lorenz Thurner

Meinen Eltern
Quoc Dung und Hong Diem
und meinen Brüdern
Anh Minh Philipp und Anh Phuc David

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Glioblastoma multiforme	5
2.2 Reovirus	8
2.2.1 Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des Reovirus	8
2.2.2 Infektionszyklus	9
2.2.3 Onkolytische Wirksamkeit.....	10
2.2.4 Tumorzellselektivität	10
2.2.5 Pathogenität für den Menschen.....	11
2.3 Newcastle Disease-Virus	12
2.3.1 Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des NDV	12
2.3.2 Infektionszyklus	12
2.3.3 Onkolytische Wirksamkeit.....	13
2.3.4 Tumorselektivität	15
2.3.5 Pathogenität für den Menschen.....	15
2.4 Parvovirus	16

2.4.1	Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des Parvovirus.....	16
2.4.2	Infektionszyklus	17
2.4.3	Onkolytische Wirksamkeit.....	18
2.4.4	Tumorzellselektivität	18
2.4.5	Pathogenität für den Menschen.....	19
2.5	Arten des Zelltods	20
2.5.1	Allgemeines	20
2.5.2	Apoptose	20
2.5.3	Nekrose	21
2.5.4	Nekroptose	21
2.6	Ziel der Arbeit und Fragestellung	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Material	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Geräte	25
3.1.3	Reagenzien	27
3.1.4	Antikörper	27
3.1.5	Verbrauchsmaterial	27
3.1.6	Viren.....	28
3.1.7	Kultivierte Zellen	29
3.1.8	Kits	29
3.1.9	Zellkulturmedien	30
3.1.10	Puffer und Lösungen.....	30

3.2	Methoden	32
3.2.1	Computer-Software	32
3.2.2	Allgemeine Zellkultur	32
3.2.3	Viren.....	34
3.2.4	RT-PCR.....	37
3.2.5	Virusinfektion	39
3.2.6	Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT-Assay	39
3.2.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	40
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbung mit Hoechst und PI	43
3.2.9	Western Blot	46
3.2.10	Caspase-Assay	49
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Unterschiede zwischen einer Einzelinfektion und einer Doppelinfektion mit onkolytischen Viren	52
4.2	Titration und Charakterisierung der produzierten RV-Charge 18.1	52
4.3	Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve und Identifikation der optimalen Konzentrationen 72h nach basaler OV-Infektion von U87 und U373	58
4.4	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Zelltodinduktion nach OV-Infektion von U87 und U373.....	66
4.5	Untersuchung der Apoptose-, Nekroptose- und Nekroserate nach OV-Infektion von U87.....	77
4.6	Elektrophoretischer Nachweis der Caspase-3/7 zur Ermittlung von Infektionszeitpunkten.....	83

4.7	Intrazellulärer Nachweis der Caspase-Aktivität als Zeichen der Apoptose-Induktion nach OV-Infektion von U87	84
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse des Promotionsprojekts	94
5	DISKUSSION	98
5.1	Kombinationstherapie von OV mit anderen antitumoralen Therapiemethoden ...	98
5.2	Titration und Charakterisierung der neu produzierten RV-Charge 18.1	101
5.3	Onkolytische Wirksamkeit der OV nach Einzel- und Doppelinfection	103
5.4	Zelltodarten nach einer Einzelinfection und kombinierten RV- und PV-Infektion	111
5.5	Zelltodarten nach einer Einzelinfection und kombinierten RV- und NDV-Infektion	117
5.6	Zelltodarten nach einer Einzelinfection und kombinierten PV- und NDV-Infektion	120
5.7	Zukünftige Aufgaben in der Forschung	122
6	LITERATURVERZEICHNIS	124
7	PUBLIKATION UND DANKSAGUNG	139
7.1	Publikation	139
7.2	Danksagung	140
8	LEBENS LAUF	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezept für vTE1 % TritonX-100-Puffer nach M. Alkassar (2012).....	35
Tabelle 2: Probenpuffer.....	46
Tabelle 3: Trenn- und Sammelgel.....	47
Tabelle 4: Laufpuffer.....	48
Tabelle 5: Transferpuffer.....	48
Tabelle 6: Ermittelte Probenkonzentration durch die RT-PCR.....	55
Tabelle 7: tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Promotionsprojekts	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops (SCHMITZ, DESEL, 2018).....	43
Abbildung 2: schematische Darstellung des Prinzips des Caspase 3/7-Assays (PROMEGA, 2018).....	50
Abbildung 3: Übersicht über die Chronologie und den Zusammenhang der Ergebnisse des Dissertationsprojekts.....	52
Abbildung 4: Ermittelte Titrationskurven der Standardproben, der neu produzierten RV-Probe 18.1 und der bekannten RV-Probe 17.2 mittels RT-PCR. 53	
Abbildung 5: Ermittelte Standardkurve aus den mitgeführten Standardproben der RT-PCR.....	54
Abbildung 6: Vergleich des relativen Überlebens der U87-Glioblastomzelllinie 72h nach einer Infektion mit RV 18.1 und RV 17.2.....	56
Abbildung 7: Vergleich des relativen Überlebens der U87-Glioblastomzelllinie 72h nach einer Infektion mit RV 18.3, PV 17.1 und NDV 15.1.....	58
Abbildung 8: Relatives Überleben von U87-Glioblastomzellen 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV, RV + PV, (B), RV, NDV, RV + NDV und (C) PV, NDV, PV + NDV.....	60
Abbildung 9: Relatives Überleben von U373-Glioblastomzellen 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV, RV + PV, (B), RV, NDV, RV + NDV und (C) PV, NDV, PV + NDV.....	63
Abbildung 10: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse 24h, 48h und 72h nach OV- Infektion von U87.....	66
Abbildung 11: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion von U373.....	67
Abbildung 12: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz.....	68

Abbildung 13: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz.....	68
Abbildung 14: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz	70
Abbildung 15: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz.....	71
Abbildung 16: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz	72
Abbildung 17: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz.....	73
Abbildung 18: repräsentatives Beispiel einer Hoechst einzeln positiven, apoptotischen Zelle nach Immunfluoreszenzfärbung.....	74
Abbildung 19: Auswertung der Hoechst einzeln positiven apoptotischen Zellen 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV und RV + PV (B) RV, NDV, und RV + NDV, (C) PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz.....	75
Abbildung 20: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, PV und RV + PV.....	77
Abbildung 21: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, PV und RV + PV.....	78
Abbildung 22: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, NDV und RV + NDV	79
Abbildung 23: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, NDV und RV + NDV	80
Abbildung 24: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit PV, NDV und PV + NDV	81
Abbildung 25: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit PV, NDV und PV + NDV	81
Abbildung 26: Darstellung der (A) b-Aktin Kontrollbande und (B) Caspase-3-Bande im Western Blot nach Einzelinfektion mit NDV 10 cp/c.....	83
Abbildung 27: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz.....	84

Abbildung 28: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz..... 85

Abbildung 29: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz..... 85

Abbildung 30: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz 87

Abbildung 31: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz 87

Abbildung 32: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz 88

Abbildung 33: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz..... 89

Abbildung 34: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz..... 89

Abbildung 35: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz..... 90

Abbildung 36: Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität 4h, 8h und 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV und RV + PV (B) RV, NDV und RV + NDV und (C) PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz..... 91

Abbildung 37: Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität (A) 4h, (B) 8h und (C) 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV, NDV, RV + PV, RV + NDV und PV + NDV in Lumineszenz..... 92

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AP-1	Activator Protein 1
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
CC	Zellkontrolle
c/GF	Zellen pro Gesichtsfeld
cm ²	Quadratcentimeter

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	„Crossing Point“
cp	Viruskopie
cp/c	Viruskopien pro Zelle
DAXX	Death Domain Associated Protein
DI	Doppelinfektion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	Doppelstrang
EGFR	epidermal growth factor Rezeptor
EI	Einzelinfektion
eIF2 α	eukaryotic initiation factor-2 α
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
GBM	Glioblastoma multiforme
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IDH	Isocitratdehydrogenase
IFN	Interferon

IFNAR	interferon α/β receptor Komplex
IRF3	interferon regulatory Faktor 3
ISG	IFN-stimulierende Gene
ISVP	infectious subvirion particle
JAM-A	junctional adhesion molecule-A
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MAPK	mitogen activated protein Kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NDV	Newcastle-Disease Virus
NF- κ B	kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nm	Nanometer
NOS	not otherwise specified
NS	Nichtstrukturprotein
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OV	Onkolytische Viren
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKR	Protein Kinase R
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PRR	pattern recognition receptor
PV	Parvovirus
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RIP1	receptor-interacting serine-threonine Protein
RIPK1	receptor-interacting serine-threonine Proteinkinase 1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
RV	Reovirus

s	Sekunde(n)
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N'-Tetramethylendiamin
TME	Tumormikromilieu
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing Ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	„volume per volume“
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	weight per minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme ist der aggressivste Hirntumor des Menschen. Die derzeitige Therapie sieht eine chirurgische Resektion kombiniert mit einer Radiochemotherapie vor. Dennoch versterben die Patienten im Durchschnitt nach 10 bis 15 Monaten und ein kurativer Therapieansatz, der eine vollständige Tumoregression bewirkt, fehlt. Die nicht humanpathogenen onkolytischen Reo- (RV), Parvo- (PV) und Newcastle-Disease-Viren (NDV) zeichneten sich in der Vergangenheit durch ihre vielversprechende Fähigkeit, selektiv Tumorzellen abtöten zu können, aus.

Basierend auf Vorarbeiten und Erkenntnissen aus der Literatur wurde im vorliegenden Dissertationsprojekt die onkolytische Wirksamkeit einer Doppelinfektion im Vergleich zur Einzelinfektion mit onkolytischen Viren (OV) evaluiert, um die Erfolgsaussichten einer kombinierten OV-Therapie abzuschätzen. Dazu wurde die onkolytische Zelltodinduktion charakterisiert.

Nach der Produktion der OV und Bestimmung der exakten Virusmenge per real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) wurde die Zytotoxizität im 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-formazan-(MTT)-Assay nachgewiesen. Anschließend wurde die basale Viruskonzentration für eine onkolytische Wirksamkeit erhoben und eine Dosis-Wirkungskurve bestimmt. Daraufhin wurde das Zellsterben mittels Apoptose und Nekrose anhand der zellulären Hoechst- und Propidiumiodid-Bindung und der Auswertung der Zellmorphologie nachgewiesen. In einer durchflusszytometrischen Untersuchung wurde die Apoptose-, Nekroptose- und Nekroserate über die Expression von Phosphatidylserin und die Detektion von Annexin-V bestimmt. Dabei wurde die Einzelinfektion mit der Doppelinfektion von bis zu zwei Glioblastomzelllinien mit verschiedenen Infektionstitern und Inkubationszeiten verglichen. Zusätzlich wurde die Aktivität der Effektorcaspasen-3/7, einer zellulären Protease des Apoptose-Signalweges, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einzel- und Doppelinfektion ermittelt.

Nach Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve und Charakterisierung des Zelltods zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige onkolytische Wirksamkeit nach Einzel- und Doppelinfektion. 24h und 48h nach kombinierter Gabe von NDV mit einem weiteren Virus in den verwendeten niedrigen (1 und 10 cp/c) Viruskonzentrationen waren die ermittelten Zelltod-

Aktivitäten gegenüber denen der NDV-Einzelfektion nicht erhöht. Die Doppelfektion mit RV und PV mit hoher Viruskonzentration zeigte eine um 12 % erhöhte onkolytische Wirksamkeit im Vergleich zur jeweiligen Einzelfektion, die sich auch mit geringfügig erhöhten Aktivitäten der untersuchten Zellode bestätigten.

72h nach Doppelfektion der U87 Zellen wurde eine zur Einzelfektion höhere Zytotoxizität nachgewiesen. Dieser Effekt konnte nach Doppelfektion der sekundären Glioblastomzelllinie U373 nicht bestätigt werden, sodass zelllinienspezifische Ergebnisse vorlagen. Die RV- und NDV-Einzelfektionen zeigten eine ausgeprägte onkolytische Wirksamkeit.

Nach Doppelfektion unterschieden sich zeitabhängig die induzierten Zellode von denen nach Einzelfektion. Je länger die Inkubationszeit, desto höher waren die Aktivitäten der programmierten Zellodarten Apoptose und Nekroptose. Nach Doppelfektion wurde im Zeitverlauf hauptsächlich der Zellod durch Nekroptose eingeleitet. Allerdings wurden in abnehmender Intensität auch Apoptose und Nekrose verzeichnet.

Zudem konnte bereits 4h nach Infektion mit RV, NDV, RV+PV, RV+NDV und PV+NDV eine caspase-abhängige Apoptose-Induktion nachgewiesen werden, die je nach untersuchter Inkubationszeit unterschiedlich ausgeprägt war.

Die verwendeten Viruskonzentrationen und der untersuchte Zeitraum zur Charakterisierung der Zellodarten reichten nicht aus, um eine signifikant vermehrte onkolytische Wirksamkeit und höhere Zellodaktivitäten nach Doppelfektion nachzuweisen.

Daher sollten die vielversprechenden Beobachtungen zur Zellodinduktion zukünftig mit einer höheren Viruskonzentration und einer längeren Inkubationszeit wiederholt werden. Dadurch können potenzielle additive Effekte, insbesondere durch den immunogenen Zellod durch Nekroptose, nach Doppelfektion aufgedeckt werden.

1.2 Abstract

Glioblastoma multiforme is the most aggressive human brain tumor. Even after undergoing standard therapy, which currently consists of surgical resection and radiochemotherapy, patients die after 10 to 15 months on average. There has yet to be discovered a curative therapeutic approach that achieves complete tumor regression. Oncolytic viruses (OV) that are not pathogenic to humans, such as reovirus (RV), parvovirus (PV), and newcastle Disease virus (NDV), have demonstrated the promising ability to selectively kill tumor cells in the past.

Based on previous work and findings from literature, this dissertation project evaluates the oncolytic efficacy of a double infection compared to a single infection with OV in order to assess the chances of success of a combined OV therapy. For this purpose, we characterized cell death induction by OV.

We performed 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-formazan-(MTT)-assays to assess cytotoxicity after producing OV and determining the exact amount of virus concentration using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Following that, the basal virus concentration for oncolytic concentration was measured, and a dose-response curve was determined.

Cell death via apoptosis and necrosis was then detected by using cellular Hoechst and propidium iodide staining and by evaluation of the cell morphology. Then, we performed a flow cytometric assay to determine the activity of apoptosis, necroptosis, and necrosis by the expression of phosphatidylserine and detection of annexin-V. Using different infection titers and incubation times, single infection was compared to double infection of up to two glioblastoma cell lines. Furthermore, the activity of effector caspases-3/7, a cellular protease involved in the apoptosis signaling pathway, was measured at multiple time points after single and double infection.

After generating the dose-response curve and characterizing cell death, time- and concentration-dependent oncolytic efficacy for single and double infection could be demonstrated. 24h and 48h after combined administration of NDV with another virus at low (1 and 10 cp/c) virus concentrations, the cell death activity observed was not increased compared with a single NDV infection. RV and PV double infection with high virus concentration resulted in a 12% increase in oncolytic efficacy compared to the corresponding single infection, which was also backed by slightly increased activities of the investigated cell death modes. Monotherapy with RV

and NDV showed substantial oncolytic efficacy. Higher cytotoxicity was detected 72 hours after double infection of U87 cells compared to single infection. This effect could not be reproduced after double infection of the secondary glioblastoma cell line U373, indicating that cell line-specific results were obtained. When compared to a single infection, different cell deaths were induced in a time-dependent manner after double infection. The longer the incubation period, the more active the programmed cell death modes via apoptosis and necroptosis were. As time passed after a double infection, cell death was primarily mediated by necroptosis. Apoptosis and necrosis were also detected in low levels. In addition, caspase-dependent apoptosis induction was detected 4h after infection with RV, NDV, RV+PV, RV+NDV, and PV+NDV. The apoptosis activity varied depending on the incubation period examined.

The virus concentrations used, and the incubation period studied to characterize the cell death modes were insufficient to demonstrate significantly increased oncolytic efficacy and higher cell death activities after double infection.

Future experiments should reproduce the encouraging findings on cell death induction with a higher virus concentration and a more extended incubation period. This could reveal potential additive effects on tumor cell killing through immunogenic cell death by necroptosis after double infection.

2 Einleitung

2.1 Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste primäre Hirntumor des Erwachsenen und gehört zur Familie der Gliome. Es gibt primäre und sekundäre Hirntumoren. Zu den primären Hirntumoren zählen Neoplasien der Zellen des Gehirns und der Meningen. Sekundäre Hirntumore haben ihren Ursprung außerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) und zu ihnen gehören Metastasen und maligne Lymphome.

Die Klassifikation der Hirntumore durch die World Health Organization (WHO) wird allgemein angewendet. Nach dieser werden Tumoren nach dem histomorphologischen und molekulargenetischen Profil in vier Malignitätsgrade unterteilt, wobei die Grade 1 und 2 als gutartig und Grade 3 und 4 als bösartig gelten (LOUIS et al., 2016). Nach dieser Einteilung gehört das GBM mit den Astrozytomen, Oligoastrozytomen und Oligodendrogliomen zu der Gruppe der astrozytären und oligodendroglialen Tumoren. Das GBM ist als Grad 4 Tumor der aggressivste ZNS-Tumor.

Das GBM lässt sich molekulargenetisch in drei Untergruppen differenzieren, die die Grundlage für ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge der Onkogenese und Tumorprogression schaffen:

1. Glioblastom, IDH-Wildtyp, klinisch primäres Glioblastom oder de novo Glioblastom
2. Glioblastom, IDH-mutiert, klinisch sekundäres Glioblastom
3. Glioblastom NOS, not otherwise specified

Der Glioblastom IDH-Wildtyp lässt sich anhand der Histologie weiter unterteilen in:

1. Gliosarkom; mit metaplastisch mesenchymaler Komponente
2. Giant Cell Glioblastom; Präsenz mehrkerniger Zellen
3. Epitheloides Glioblastom; mit großen Epitheloidzellen und variabel vorhandenen Rhabdoidzellen

Die weltweite Inzidenz des GBM beträgt 0,59 bis 3,69 pro 100.000 Personen (OSTROM et al., 2014). Diese nimmt mit dem Alter zu und erreicht ihr Maximum im Alter von 75 bis 84 Jahren (SOOMRO et al., 2017).

Weiterhin existieren primäre und sekundäre GBMs (SCHERER, 1940). Mit einem Anteil von 90 % bei älteren Menschen entsteht die Mehrheit der GBMs de novo und ist primärer Genese, während sekundäre GBMs aus niedrig-gradigen Gliomen, wie diffusen oder anaplastischen Astrozytomen, entstehen und eher bei jüngeren Menschen auftreten. Letztere sind typischerweise im Frontalhirn lokalisiert, haben einen geringeren Nekrosegrad und besitzen eine bessere Prognose. Diese Differenzierung lässt sich durch die Analyse ihrer genetischen und epigenetischen Profile vornehmen (OHGAKI, KLEIHUES, 2013).

GBMs entstehen durch den Erwerb verschiedener molekulargenetischer Veränderungen, insbesondere durch Isocitrat-Dehydrogenase-(IDH)-Mutationen, die hauptsächlich in sekundären GBMs (85 %) vorliegen. In pädiatrischen GBMs treten Mutationen in H3F3A- und DAXX-Genen auf, die beim Erwachsenen selten vorkommen (STURM et al., 2012).

Durch molekulare Untersuchungen von humanen GBMs konnten drei wichtige genetische Ereignisse identifiziert werden, welche die maligne Transformation vorantreiben (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2008):

- 1) Dysregulation der Wachstumssignalwege durch die Amplifikation und mutierten Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase-Gene
- 2) Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Signalwegs (PI3K)
- 3) Inaktivierung der p53- und Retinoblastom-Tumorsuppressor-Signalwege

Als Reaktion auf Proliferations- und Wachstumsreize passen sich die genetischen und metabolischen Prozesse des Tumors an, indem sie beispielsweise die Gefäßversorgung und den Stoffwechsel regulieren (HANAHAAN, WEINBERG, 2011; VANDER HEIDEN et al., 2009).

GBMs metastasieren sehr selten außerhalb des zentralen Nervensystems, da dafür die Basalmembran der Kapillargefäße in der Blut-Hirn-Schranke überwunden werden muss (BERNSTEIN, WOODARD, 1995).

In der Mehrheit der GBM-Erkrankten wird die Ursache für den Tumor nicht erkannt. Die Belastung durch ionisierende Strahlung und die Vererbung von Erkrankungen, denen eine Fehlregulierung der Tumorsuppressionsmechanismen zu Grunde liegen, erhöhen das Erkrankungsrisiko (FISHER et al., 2007). Dazu gehören die Neurofibromatosen 1 und 2, die tuberöse Sklerose und die Lynch- und Li-Fraumeni-, Turcot's-, von Hippel-Lindau- und Cowden-Syndrome (FARRELL, PLOTKIN, 2007).

Die Diagnose des GBM wird in der Regel anhand einer Bildgebung durch Magnetresonanz- oder Computertomografie gestellt. Diese zeigt das Bild einer von einem Ödem umgebenen, heterogenen Raumforderung mit einer zentralen Nekrose, sowie das charakteristische Bild eines girlandenförmigen Kontrastmittel-Enhancements (SANAI et al., 2005).

Das klinische Erscheinungsbild der GBM-Patienten ist sehr variabel und abhängig von der Größe und dem Ort der Tumoreinnistung in den funktionalen Zentren des Gehirns. Es reicht vom Auftreten von Krampfanfällen, fokalen neurologischen Defiziten, Verwirrtheit, Gedächtnisverlust, venösen Thromboembolien bis hin zu Wesens- und Persönlichkeitsveränderungen. Zusätzlich können Symptome durch einen erhöhten Hirndruck entstehen, wie beispielsweise Erbrechen, Übelkeit und Kopfschmerzen (WEN, KESARI, 2008).

Die derzeitige Therapie zielt auf eine symptomatische Behandlung nach einem multimodalen Konzept ab. Es setzt sich zusammen aus einer möglichst umfangreichen chirurgischen Tumoresektion, gefolgt von einer Chemotherapie mit Temozolomid und einer Radiotherapie. Das diffuse Tumorstadium erschwert die Resektion (CLAES et al., 2007). Bei über 70-jährigen Patienten orientiert sich die Therapie am Methylierungsstatus des MGMT-Promotors. Liegt eine Methylierung vor, so sieht die Leitlinie eine akzelerierte Bestrahlung mit einer begleitenden Chemotherapie mit Temozolomid vor. Ist der MGMT-Promotor nicht methyliert, so wird eine alleinige hypofraktionierte Strahlentherapie empfohlen. Zusätzlich erfolgt eine prophylaktische antikonvulsive Therapie und eine Kortikosteroidgabe, um das peritumorale Hirn-ödem abzuwehren (HOFER et al., 2019). Trotz all dieser Therapiemöglichkeiten bleibt das GBM bisher unheilbar und es fehlt eine kurative Therapie.

Die intra- und intertumorale Heterogenität des GBM stellt die bisherigen Therapiemethoden aufgrund der Therapieresistenz vor große Herausforderungen. Sie entsteht durch das Vorliegen von intratumoralen Klonen, wodurch jedes GBM individuelle Eigenschaften besitzt. Durch ihre unterschiedlichen molekularen Eigenschaften variieren die Tumore in ihrer Therapieansprechbarkeit und Prognose (INDA et al., 2014).

Lediglich zehn Prozent der Patienten überleben mehr als fünf Jahre. Im Durchschnitt versterben sie 12 bis 15 Monate nach der Diagnosestellung (SOOMRO et al., 2017). Die wichtigsten Faktoren, die mit einer verschlechterten Prognose einhergehen, sind ein fortgeschrittenes Alter, das Vorliegen multipler Läsionen, ein niedriger Karnofsky-Index, ein hoher Nekrosegrad

und ein nicht resektabler Tumor (CURRAN et al., 1993; THAKKAR et al., 2014). Dies zeigt die Notwendigkeit für personalisierte Therapien (DELGADO-MARTIN, MEDINA, 2020). Daher ist es von essenzieller Bedeutung die molekularen Signalwege und Mutationen des Tumors, die in seine Entstehung involviert sind besser zu verstehen, um daraus gezielt weitere effektive Therapiestrategien abzuleiten.

Folgende Therapiekonzepte der letzten Jahre stehen heute im Mittelpunkt:

Zum einen wird dem Tumormikromilieu (TME) eine große Bedeutung in seiner Rolle in der Immunantwort zugeschrieben. Dabei steht es mit dem Tumor im Austausch und grenzt es von außen vom restlichen Gewebe ab (BROWN et al., 2018).

Zum anderen wurden gute Erfahrungen mit einer selektiven Tumorzelltherapie mit genetisch veränderten oder nicht humanpathogenen OV gemacht. Die Erfahrung zeigte, dass für eine erfolgreiche OV-Therapie zwei essenzielle, nicht voneinander trennbare Mechanismen von Bedeutung sind: Der direkte virale Onkolyse-Effekt und die durch den Virus induzierte anti-tumorale Immunantwort (MARTIKAINEN, ESSAND, 2019).

2.2 Reovirus

2.2.1 Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des Reovirus

Reoviren (respiratory enteric orphan virus, RVs) gehören zur Familie der Reoviridae, der Unterfamilie der Spinareovirinae und dem Genus der Orthoreoviren, die sich in weitere Spezies unterteilen (DERMODY et al., 2013). Sie erhielten ihre Bezeichnung durch Albert Sabin, der sie im Respirations- und Gastrointestinaltrakt von Kindern entdeckte. Da zu dieser Zeit infizierte Personen asymptomatisch waren, enthält der Virus den Zusatz „orphan“ im Namen. Es handelt sich um ein unbehülltes Virus mit einem Durchmesser von 65 bis 80 nm und einer linearen Doppelstrang-RNA (dsRNA) aus drei großen (L1-L3), drei mittleren (M1-M3) und vier kleinen (S1-S4) Segmenten (SHATKIN et al., 1968). Das RV-Partikel besteht aus zwei Proteinschichten, dem inneren Kern (core) und dem äußeren Kapsid (outer capsid). Letztere Proteinschicht besteht aus 600 Heterodimeren des μ 1- und σ 3-Proteins. Am Virion lagern sich Kanäle aus λ 2-Protein-Pentameren an, die von Trimeren des σ 1-Attachment-Proteins verschlossen werden.

Die vier bisher bekannten Serotypen definieren sich durch das S1-Segment, das für das Attachment Protein kodiert: Typ I Lang, Typ II Jones, Typ III Dearing und Abney und Typ IV Ndelle (ATTOUI et al., 2001; ROSEN, 1960). Sie unterscheiden sich in ihrem Zell- und Gewebetropismus (DAY, 2009).

Die Anordnung des Virusgenoms in Segmenten ermöglicht bei einer Co-Infektion ihren Austausch zwischen verschiedenen RV-Typen durch Gen-Reassortment. Dadurch können neue Reassortanten aus gemischten Genomen entstehen (DERMODY et al., 2013).

2.2.2 Infektionszyklus

RVs infizieren Zellen über einen adhäsionsverstärkenden Mechanismus unter niedrig-affiner Einwirkung des Bindungsproteins $\sigma 1$ auf Kohlenhydrate der Zelloberfläche (BARTON et al., 2001a). Die stabile Bindung wird über die Interaktion des $\sigma 1$ -Proteins mit dem junctional adhesion molecule-A (JAM-A) der Hostzelle vermittelt (BARTON et al., 2001b). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über eine $\beta 1$ -integrin-abhängige Endozytose (MAGINNIS et al., 2008). Dabei spielen die säureabhängigen Cathepsin B- und L-Proteasen eine wichtige Rolle. Sie entfernen das $\sigma 3$ -Protein und zerschneiden das $\mu 1$ -Protein in die zwei Fragmente δ und ϕ , um für den Zelleintritt eine Zwischenstufe, das sogenannte infectious subviriion particle (ISVP), zu erzeugen (EBERT et al., 2002). Das ϕ -Fragment ist in der Lage, Poren in die Zellmembran einzubauen und trägt gemeinsam mit dem partikelassoziierten δ -Fragment zur Translokation des viralen Cores über die endosomale Membran in das Zytoplasma bei (DANTHI et al., 2013).

Der virale (-)-RNA-Einzelstrang dient als Vorlage für die Transkription einer mRNA im Zytoplasma (DERMODY et al., 2013). Die mRNA besitzt eine 5'-7-Methylguanosin-Kappe, die die anschließende Translation in der infizierten Zelle ermöglicht (KOZAK, SHATKIN, 1978). Die viralen Nichtstrukturproteine μ NS und σ NS bilden funktionelle Einheiten (engl. viral factories), die als Orte der Transkription, Translation und Assemblierung dienen. Innerhalb dieser viralen Einheiten entstehen neue Kernpartikel, wodurch die virale Transkription und Proteinsynthese potenziert wird (ANTCZAK, JOKLIK, 1992; DERMODY et al., 2013). Die virale Transkription ist abgeschlossen, sobald sich die äußeren Kapsid-Proteine am Vorläufer-Core-Partikel angesammelt haben. Nachdem Trimere des $\sigma 1$ -Attachmentproteins an den $\lambda 2$ -

Pentamer-Kanälen eingefügt worden sind, ist die Bildung des Virions abgeschlossen und das neu synthetisierte Virus verlässt die Zelle.

2.2.3 Onkolytische Wirksamkeit

Die angeborene und die erworbene Immunantwort werden nach RV-Infektion aktiviert. Interferon-1 (IFN-1) wird als Schlüsselkomponente der angeborenen Immunantwort freigesetzt. Die virale RNA wird durch zelluläre pattern recognition receptors (PRRs), wie beispielsweise Toll-Like-Rezeptoren und der dsRNA-aktivierten Protein Kinase R (PKR), erkannt. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren interferon regulatory Faktor 3 (IRF3), kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) und activator-protein-1 (AP-1) aktiviert, welche die Expression und Sekretion von IFN-1 (IFN- α und IFN- β) einleiten (LEVY et al., 2011; STUART et al., 2018). Nach Rezeptorbindung (interferon α/β receptor Komplex (IFNAR)) wird die Expression der IFN-stimulierenden Gene (ISGs) potenziert. Diese leiten verschiedene Mechanismen ein, um die Virusreplikation zu hemmen und die Virusverbreitung zu bremsen. Das kann beispielsweise durch den verstärkten Abbau der viralen RNA, die Hemmung der viralen Translation, die Beeinträchtigung der Infektion oder die Verbesserung der Viruserkennung zum Schutz der Nachbarzellen geschehen (SCHNEIDER et al., 2014).

Eine weitere Schlüsselrolle nimmt die PKR in der Regulierung der Virusreplikation und des onkolytischen Potenzials ein. Denn für eine erfolgreiche Virusvermehrung ist es unabdingbar, dass die infizierte Zelle in der Lage ist, Proteine zu translatieren. Bei Vorliegen einer viralen dsRNA wird die zelluläre PKR aktiviert. Diese blockiert daraufhin die zelluläre Proteinsynthese, indem sie den eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) inaktiviert (DALET et al., 2015). Normalerweise ist die PKR durch die IFN-1 Immunreaktion hochreguliert. In RV-infizierten Zellen hemmt das σ 3-Protein die Aktivierung der PKR, indem es die dsRNA verdeckt (IMANI, JACOBS, 1988; YUE, SHATKIN, 1997).

2.2.4 Tumorzellselektivität

Die Fähigkeit der RVs transformierte Tumorzellen zu infizieren und in diesen zu replizieren, wurde in den späten 70er Jahre entdeckt. Grundlage dafür, ist die native und gekürzte Form des epidermal growth factor Rezeptors (EGFR), der die Zellen anfälliger für eine RV-Infektion macht (STRONG et al., 1993). Er potenziert die RV-Replikation durch Aktivierung des Ras-

Signalwegs (STRONG, LEE, 1996). EGFR ist in einer Vielzahl von Karzinomen hochreguliert, da es die natürliche Tumorzellproliferation verstärkt (WELLS, 1999).

Seit der Entdeckung der RVs etablierten sich vier Erklärungsansätze für ihren Tropismus für transformierte Zellen:

1. Die GTPase Ras überträgt Liganden-gesteuerte, extrazelluläre Signale in eine zytoplasmatische Signalkaskade, um das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und das Zellüberleben zu regulieren (CAMPBELL et al., 1998). Der EGFR aktiviert den Ras/Raf/MAPK-Signalweg und potenziert die Virusreplikation, indem er das Uncoating, die Produktion infektiöser Partikel und die Apoptose-abhängige Freisetzung von Vorläufer-Virionen aus den Zellen beeinflusst (NORMAN et al., 2004).
2. Cathepsine sind in Karzinomzellen überexprimiert. Insbesondere Cathepsin-B erleichtert das Uncoating in der Virusinfektionskaskade und erhöht damit die zelluläre Suszeptibilität. Im Vergleich sind die Cathepsin-B- und -L-Spiegel in nicht-transformierten Zellen niedriger (ALAIN et al., 2007; SHMULEVITZ, LEE, 2012).
3. RV-infizierte, transformierte Zellen weisen keine PKR-Aktivität auf. Dadurch ist in diesen Zellen die RV-vermittelte Onkolyse im Vergleich zu nicht transformierten Zellen potenziert (FERNANDES, 2016; STRONG et al., 1998).
4. RV erschwert die Ein- und Fortleitung der IFN1-vermittelten Immunantwort in Ras-transformierten Zellen. Die IFN-1 Produktion wird dabei über den PI3K- und den Raf/MEK/ERK-Signalweg gehemmt. Dadurch wird die angeborene Immunantwort unterbrochen und die Virusvermehrung nach der Infektion begünstigt (BATTCOCK et al., 2006).

2.2.5 Pathogenität für den Menschen

RVs können alle Säugetiere und folglich auch Menschen infizieren. Menschen sind allerdings in der Regel nach einer Infektion asymptomatisch oder entwickeln milde Symptome wie einen Schnupfen, eine Pharyngitis oder eine Gastroenteritis. Es wurden auch einzelne schwere Fälle mit neurologischer Beteiligung im Rahmen einer Meningitis dokumentiert (YAMAMOTO et al., 2020). Durch die Tumorzellselektivität und insgesamt geringe humane Pathogenität bieten RVs sehr gute Voraussetzungen für die Therapie des GBM.

2.3 Newcastle Disease-Virus

2.3.1 Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des NDV

Das Newcastle Disease Virus (NDV) ist hauptsächlich bei Geflügel bekannt, da es bei diesen hochansteckend ist und systemische Erkrankungen verursacht. Das Virus gehört zur Familie der Paramyxoviren und dem Genus der Avulaviren. Es besitzt eine nicht segmentierte (-)ssRNA und pleomorphe Virionen mit einem Durchmesser von 150 – 250 nm, die in einer Lipidhülle in helikal angeordneten Nukleoprotein-Komplexen vorliegen. Bekannte Virusvertreter sind zum Beispiel Masern-, Mumps- und respiratorische Synzytialviren (SINKOVICS, HORVATH, 2000). Die Familie der Paramyxoviren besitzt eine Hämagglutinations- und Neuraminidase-Aktivität.

NDV besitzt sechs Transkriptionseinheiten, die analog dazu in 3'-5'-Richtung sechs Virusstrukturproteine mit wichtigen Funktionen synthetisieren: Nukleokapsidprotein (NP), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Hämagglutinin-Neuraminidase (HN), und Large Polymerase Protein (L) (SCHIRRMACHER et al., 2019). NP-Proteine kapseln die genomische RNA ein und binden an P- und L-Proteine, um Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) zu bilden, die als Vorlagen für die Transkription und Replikation des viralen Genoms dienen (NAGAI et al., 1989). Das HN- und das F-Protein sind die beiden wichtigsten Virulenzfaktoren von NDV. Unter der Virushülle befindet sich das M-Protein, das die Form und Struktur und damit auch die Flexibilität des Virions erhält (YUSOFF, TAN, 2001).

2.3.2 Infektionszyklus

Um an eine Wirtszelle anzudocken, bindet das HN-Protein des Nukleokapsids über N-Acetyl-Neuraminsäure-Resten von Glykolipiden an die äußere Zellmembran (FOURNIER et al., 2004; LI et al., 2017). Die Fusion mit der zellulären Membran wird vom F-Protein vermittelt, welches die Virusinfektiosität bestimmt. Denn erst durch proteolytische Spaltung des F-Proteins (F₀), entstehen die infektiösen Partikel F₁ und F₂. Seine Aktivierung und die anschließende Fusion mit der Zellmembran erfordern eine strukturelle Umlagerung im F₁-Protein (ZAMARIN, PALESE, 2012). Weiterhin können NDVs auch über clathrin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose in die Zelle eindringen (TAN et al., 2016).

Nach dem Zelleintritt wird die Proteinbiosynthese der Virusproteine vorbereitet. Dafür wird zuerst im Zytoplasma ein zur (-)ssRNA komplementärer Positivstrang (dsRNA) synthetisiert. Der Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus dem RNA-Genom, NP-, P- und L-Proteinen, dient als Vorlage für die sukzessive Transkription subgenerischer mRNA und die Replikation der vollständigen RNA. Spezifische Gensequenzen kennzeichnen den Start (GS = Gen-Start) und den Stopp (GE = Gen-Ende) der Transkription (PEETERS et al., 2000). Die zelluläre Proteinanhäufung durch die Proteinbiosynthese reguliert, ob der Polymerase-Komplex (PC) in der Transkriptions- oder Replikations-Form vorliegt (CONZELMANN, 2004). Sobald die Transkription abgeschlossen ist, dissoziiert der PC von der RNA.

Im weiteren Verlauf wird dann die mRNA in virale Proteine translatiert (WHELAN et al., 2004). Die neu synthetisierte RNA kann als Translations-Matrize dienen, sobald die leader-RNA, die das Verkapselungssignal besitzt, freigesetzt wird. Die Transkription endet am GE-Signal des letzten L-Gens mit einem Stopp- oder Polyadenylierungs-Signal, dem kein GS mehr folgt, während die Replikation bis zum 5'-Ende reicht (CONZELMANN, 2004).

Die neu synthetisierten Viren verlassen die Zelle mittels Budding (LAMB, PARKS, 2013).

NDVs werden anhand ihrer Pathogenität in drei Klassen gegliedert werden: lentogen (abgeschwächter Stamm ohne oder mit geringer Pathogenität), mesogen (toxischer Stamm mit mittelgradiger Pathogenität) und velogen (starker Stamm mit hoher Pathogenität). Je effektiver die Spaltung, desto velogener und virulenter ist das Virus (ALEXANDER, 2000).

2.3.3 Onkolytische Wirksamkeit

In physiologischen Zellen können NDVs nicht replizieren, da sie durch die Immunantwort gestoppt werden. Erst in transformierten Tumorzellen können sie aufgrund der Defekte in der IFN-Immunantwort einer vorzeitigen Erkennung durch das Immunsystem entkommen und replizieren.

Durch die Infektion physiologischer Zellen wird eine starke Interferonantwort induziert. Grundlage dafür sind sogenannte Pattern Recognition Receptors (PRR), welche die fremde Virus-RNA erkennen und über mehrere Signalwege die Interferon-Antwort einleiten. Zu den PRR gehören zytoplasmatische RIG-I-like Rezeptoren (RLR) und membrangebundene interferon- α/β -Rezeptoren (IFNAR) (HERVAS-STUBBS et al., 2011).

Nach der Erkennung der Virus-RNA wird über das mitochondrial antiviral-signaling Protein (MAVS) unter Einbindung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B die Transkription von IFN-1 und proinflammatorischen Zytokinen eingeleitet. Zusätzlich wird die IFN-1 Antwort über TLR und über die Erkennung der Fremd-DNA durch den zyklischen GMP-AMP-Synthase-(cGAS)-Signalweg induziert (LEE et al., 2019).

NDVs sind in der Lage den Zelltod über mehrere Mechanismen zu induzieren. Neben dem direkten onkolytischen Effekt können NDVs auch das Immunsystem aktivieren (SCHWAIGER et al., 2017). Die angeborene Immunantwort wird durch NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt. Beispielsweise wird das HN-Protein durch NKp46 von NK-Zellen erkannt und vermittelt durch zytotoxizitätsinduzierende Signale das Absterben der Tumorzellen (LIANG et al., 2019). Makrophagen können entweder die infizierten Zellen direkt abtöten, indem sie TNF oder Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen oder sie den T-Helferzellen präsentieren, um tumorspezifische CD28⁺ T-Zellen zu rekrutieren und die T-Zell-vermittelte erworbene Immunantwort einzuleiten (UMANSKY et al., 1996).

Weiterhin unterteilt man NDVs in lytische und nicht-lytische Virusstämme (SCHIRRMACHER et al., 2001).

Damit ein Virus in der Zelle adäquat replizieren kann, muss es den zelleigenen antiviralen Mechanismen entkommen. Das Nichtstrukturprotein V spielt dabei eine wichtige Rolle, indem es selektiv STAT1 (signal transducers and activators of transcription 1) bindet und abbaut (HUANG et al., 2003). Nach Inkorporation zweier G-Nukleotide an der RNA-Bearbeitungsseite des P-Gens wird es von diesem kodiert. Seine Aktivität korreliert mit der NDV-Virulenz (WANG et al., 2019). Es kann mit RIG-I interagieren und führt zur Hemmung von interferon regulatory factor (IRF-3) und der IFN- β -Induktion (ALAMARES et al., 2010).

Darüber hinaus führt die Virusinfektion zu einer zellulären Stressreaktion, da sowohl das Virus als auch die Zelle selbst, die zellulären Strukturen nutzen möchten, um Proteine zu synthetisieren. Dadurch wird der PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP-Signalweg eingeleitet. Nach Aktivierung von eIF2 α durch Phosphorylierung werden gemeinsam mit PKR Stress Granula (SG) gebildet und über Zwischenschritte die zelluläre Proteinsynthese beendet (FIOLA et al., 2006).

2.3.4 Tumorselektivität

NDVs sind in der Lage sich selektiv und effizient in Tumorzellen zu vermehren (BELLO et al., 2020). Im Vergleich zu normalen Zellen ist die NDV-Replikation in Tumorzellen bis zu 10000 Mal effektiver (SCHIRRMACHER et al., 2019).

Grundlage für die Tumorzellselektivität von NDVs sind tumorspezifische Defekte, welche die Virusreplikation in normalen Zellen beeinträchtigen (SCHIRRMACHER, 2017):

- a) der Aktivierung der antiviralen Signalwege über RIG-I
- b) dem Typ I IFN-Signalweg
- c) in Apoptose-Signalwegen
- d) der Aktivierung des Ras-Signalübertragung und Expression des Rac1-Proteins

Die bisherigen Studien bieten Hinweise über die Synergie zwischen der NDV-Vermehrung und der Eigenschaften der transformierten Zellen. Demnach erwies sich die Rho GTPase Rac1, die zur Ras Superfamilie der Onkogene gehört, als essenzieller Faktor sowohl für das Tumorzellwachstum als auch für die Virusreplikation. Insbesondere konnte ihr Einfluss auf die Zellmigration und -invasion in GBM erforscht werden (ABDULLAH et al., 2014).

2.3.5 Pathogenität für den Menschen

Nach zwei- bis viertägiger Inkubationszeit führt die Infektion des Geflügels abhängig von der Viruslast und dem Immunstatus zu schweren Erkrankungen des Atemapparats, des Gastrointestinaltraktes und des zentralnervösen Systems. Die humane Infektion ist eher harmlos und verursacht milde klinische Krankheitsbilder wie Konjunktividen (ALEXANDER, 2000).

Da NDVs weder nachteilige Effekte auf humane Zellen besitzen noch pathologisch sind, können sie in ihrer nativen Form bei Tumorkranken angewendet werden.

2.4 Parvovirus

2.4.1 Allgemeines, Taxonomie und Aufbau des Parvovirus

Parvoviren (PVs) zeichnen sich durch ihre hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen, ihrem kleinen Wirtsspektrum und ihre starke Affinität zur Infektion transformierter Zellen aus. Sie sind die kleinsten bisher bekannten Viren und können human- und tierpathogen sein (lateinisch: parvo = klein). Es gibt drei Parvovirus-Familien: Parvovirinae, Densovirinae und Hamaparvovirinae. Erstere gliedern sich in zehn weitere Subtypen: Protoparvovirus, Amdoparvovirus, Bocaparvovirus, Aveparvovirus, Tetraparvovirus, Dependoparvovirus, Copiparvovirus, Artiparvovirus, Loriparvovirus und Erhythroparvovirus (PENZES et al., 2020). Das Genus der Protoparvoviren ist tierpathogen und gliedert sich wirtsspezifisch in 13 weitere Spezies (PENZES et al., 2020). Eine dieser ist das PV-H1. Es wurde 1960 zum ersten Mal von Toolan in Folge einer Kontamination von transplantierten humanen Tumoren im Hamster entdeckt (TOOLAN et al., 1960).

Die Subfamilien der PVs ähneln sich im Aufbau. Sie besitzen eine nicht-segmentierte (-)ssDNA mit einer Länge von ca. 5000 bpm, die in ein ikosaedrisch geformtes Kapsid ohne Hülle eingelagert ist. Dies erklärt ihre starke Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen. Ihr Durchmesser beträgt 18 bis 25 nm. In den Virionen befinden sich die Virusproteine VP1 und VP2, die in einem 1:5-Verhältnis vorliegen und in 60 Capsomeren eingelagert sind. Beide Virusproteine werden von derselben mRNA translatiert, anschließend gespleißt und unterscheiden sich an der N-terminalen Domäne. VP1 ist 142 Aminosäuren länger als VP2 (735 vs. 593 Aminosäuren). In vollständig verpackten, infektiösen Virionen werden posttranslational 18 bis 21 Aminosäuren am N-Terminus des VP2-Proteins abgespalten, woraus das VP3-Protein entsteht. Dieses stellt die Hauptkomponente des Viruskapsids dar (HALDER et al., 2013).

Es befinden sich zwei Promotoren auf dem viralen Genom, die als offene Leserahmen dienen:

Der frühe P4-Promotor auf der rep-Frequenz am 3'-Ende kontrolliert die Expression der Transkriptionseinheiten, die für die Kodierung der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 verantwortlich sind. Die Nichtstrukturproteine stellen essenzielle Bestandteile für die Replikation und Genexpression dar (FAISST et al., 1994).

In der Nähe des 5'-Endes befindet sich der späte P38-Promotor, der die Expression der Transkriptionseinheiten der Kapsidproteine VP1 und VP2 und des nichtstrukturellen small alternatively translated (SAT) Proteins reguliert (JONGENEEL et al., 1986).

2.4.2 Infektionszyklus

Am Anfang des Infektionszyklus steht die Adhäsion an die Hostzell-Zellmembran. Diese erfolgt unspezifisch über Sialinreste, welche die Zellmembranerkennung und den Zelleintritt über eine clathrin-vermittelte Endozytose ermöglichen (FERREIRA et al., 2020; LOPEZ-BUENO et al., 2006).

Um als DNA-Virus zum Zellkern zu gelangen, bewegen sich die viralen Partikel intrazellulär über das Mikrotubulinetzwerk fort. Durch Interaktion mit dem nuklearen Porenkomplex (NPC) exprimiert die N-terminale Region des viralen VP1-Proteins ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) und erreicht dadurch den Zellkern (LIU et al., 2017).

Nach Eintritt in den Zellkern der Wirtszelle, starten sie ihr Replikationsprogramm. Die in einer Haarnadelstruktur vorliegenden Telomere fungieren als Promotoren für die Transkription und als cis-Domäne zur Regulation der Replikation.

In einem ersten Schritt wird die Einzelstrang-DNA zu einem Doppelstrang vervollständigt. Das 3'-OH-Ende an der Haarnadelstruktur dient als Primer für die zelluläre DNA-Polymerase. Der neu synthetisierte Doppelstrang stellt dann die Vorlage für die virale mRNA-Synthese und die Bildung von multimeren DNA-Zwischenprodukten und -Nachkommen dar (COTMORE, TATTERSALL, 2007). Im Zellkern wird in vom Virus induzierten Komplexen die Replikation des Replikationsproteins A (FIOCCO et al.), des Ringklemmproteins (PCNA), der DNA-Polymerasen α und δ und Cyclin A reguliert (BASHIR et al., 2000; CHRISTENSEN, TATTERSALL, 2002). Nach Aktivierung des P38-Promotors durch NS1 werden die Expression der Kapsidproteine, die DNA-Replikation und die anschließende Verkapselung eingeleitet. Dafür interagiert NS1 mit den zellulären Proteinen RPA, Transkriptionsfaktoren (TBP), TFIIA und SP1/3 (HALDER et al., 2013). Nach der Replikation wird die neu synthetisierte (-)ssDNA, getrieben von der viralen DNA-Helikase, durch eine zylindrische Pore des Nukleus durchgeschleust und in ein Proteinkapsid verpackt. Dieses lagert sich dem Nukleus an und wird dann in das Zytoplasma freigesetzt (KING et al., 2001). Das neu synthetisierte Virus verlässt die Zelle durch Zellyse (COTMORE, TATTERSALL, 2007).

NS1 wird bereits früh nach der Infektion exprimiert und stellt den Hauptregulator der viralen DNA-Replikation dar. Es wirkt als Helikase, ATPase, Restriktionsenzym bei der Replikation und als Mediator der Zytotoxizität, indem es den Zellzyklusverhalt durch Apoptose triggert (HRISTOV et al., 2010). Bei letzterem wird es von NS2 unterstützt (LEGRAND et al., 1993; TATTERSALL et al., 1976).

2.4.3 Onkolytische Wirksamkeit

Eine Infektion mit PV-H1 induziert DNA-Schäden im Wirt und unterbricht den zellulären Zyklus in der Transition von der S1- in die G2-Phase (CORBAU et al., 1999; HRISTOV et al., 2010). Dabei spielen von NS1 induzierte, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle.

Durch eine verstärkte Permeabilität der Lysosomen werden aktives Cathepsin-B und -L (CTSB und CTSL) aus den Lysosomen wieder zurück in das Zytosol freigesetzt und setzen damit die Konzentrationen der Cathepsin-Inhibitoren Cystatin B und C herunter. Dadurch wird der Zelltod gefördert (DI PIAZZA et al., 2007).

Damit das Virus sich ausreichend vermehren kann, darf die infizierte Zelle nicht frühzeitig untergehen. Dafür aktiviert das NS1-Protein einen zellulären Signalweg, der den Zelltod verlangsamt (LACHMANN et al., 2008).

Studien weisen darauf hin, dass PV-H1 verschiedene Arten des Zelltods induzieren kann. Darunter fallen die Apoptose, Nekrose und der über lysosomale Membranpermeabilisierung induzierte Zelltod (ANGELOVA et al., 2009; DI PIAZZA et al., 2007; MOEHLER et al., 2001). Neben dem direkten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen, können sie durch Stimulation des Immunsystems eine Tumorzelllyse einleiten.

2.4.4 Tumorzellektivität

PVs können ausschließlich in Zellen replizieren, die sich in der S-Phase ihres Zellzyklus befinden. Sie können ruhende Zellen nicht zum Teilen anregen (COTMORE, TATTERSALL, 1987; SPALHOLZ, TATTERSALL, 1983).

Die S-Phase stellt eine der Landmarken der transformierten Zellen dar. In dieser Phase liegen viele Faktoren überexprimiert vor, welche die Virusvermehrung unterstützen. Beispielsweise vermittelt und kontrolliert die CDK1/PKC α -vermittelte Ruptur der Kernhülle den Transport

von PV-H1 aus dem Zellkern (PORWAL et al., 2013). Außerdem sind die zellulären Transkriptionsfaktoren hochreguliert. Man spricht daher auch von einem natürlichen PV-H1-Onkotropismus.

Mit dem Wissen, dass transformierte Tumorzellen Defekte in der Immunantwort besitzen, ist dies ein weiteres Indiz für ein erfolgreiches Zusammenspiel von PV-H1 und GBM-Zelllinien für eine tumorzellselektive Therapie.

2.4.5 Pathogenität für den Menschen

Bis dato sind keine humanpathogenen Erkrankungen durch PV-H1 bekannt. Dadurch liegt in der Regel auch keine Immunität gegenüber dem Virus vor. Durch ihr breites Wirtsspektrum und ihrem natürlichen Onkotropismus können sie auch in humanen Tumorzellen replizieren (FAISST et al., 1989; TELERMAN et al., 1993).

2.5 Arten des Zelltods

2.5.1 Allgemeines

Es wurden bis heute zwölf Formen des regulierten Zelltods (RCD, regulatory cell death) entdeckt. Sie charakterisieren sich durch morphologische Merkmale, die von apoptotisch bis nekrotisch reichen und einem immunmodulatorischen Profil, das sich von entzündungshemmend und tolerogen hin zu proinflammatorisch und immunogen erstreckt (GALLUZZI et al., 2018). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Zelltodarten der Apoptose, Nekrose und Nekroptose vorgestellt.

2.5.2 Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und sorgt dafür, dass Zellen ohne Schädigung ihrer Nachbarzellen untergehen können. Sie hat eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der zellulären Hämostase und wird ATP-abhängig strikt reguliert (SCHMITZ, DESEL, 2018). Die Apoptose findet in mehreren Schritten statt. Zuerst schrumpfen die Zellen und der Zellkern wird fragmentiert. Die einzelnen Fragmente und zytoplasmatischen Bestandteile der sterbenden Zelle werden in kleine apoptotische Vesikel (engl. apoptotic bodies) verpackt und aus dem Zellverbund herausgelöst. Diese apoptotischen „Körperchen“ werden dann von Fresszellen wie beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen und mesenchymalen Zellen phagozytiert und schließlich von Lysosomen abgebaut. Eine inflammatorische Antwort bleibt aus.

Man unterscheidet die intrinsische von der extrinsischen Apoptose. Beide münden in der Aktivierung von Caspasen (Familie der Proteasen), die im Mittelpunkt der Apoptose steht. Es gibt Initiator-Caspasen (-8,-9,-10) und Effektor-Caspasen (-3, -6, -7). Die Caspasen werden in Vorstufen (Proenzymen) sezerniert und entweder durch Eigenproteolyse oder durch andere Proteine aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt nach dem Kaskadenprinzip - Eine bereits aktivierte Caspase aktiviert eine Pro-Caspase.

2.5.2.1 Signalweg der Apoptose

Die Besonderheit der intrinsischen Form der Apoptose besteht in der Möglichkeit der Todesrezeptor-vermittelten und der Todesrezeptor-unabhängigen Zelltodinduktion. Im Zentrum der intrinsischen Form der Apoptose steht das Mitochondrium, dessen äußere Membran durch

Bid, einem Bcl-2-Protein, permeabilisiert. Zuvor wird dieses durch die Caspasen -8 und -10 aktiviert. Dadurch gelangt Cytochrom C in das Cytoplasma und bildet einen Komplex mit Protein Apaf-1, ATP und der Procaspase-9, um die Effektor-Caspasen-Kaskade einzuleiten (RIEDL, SHI, 2004). Darüber hinaus existieren caspase-unabhängige Formen der Apoptose.

Die extrinsische Apoptose-Induktion erfolgt durch die Bindung von Liganden (CD95L, Fas, TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand), TNF- α) an Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z.B. TNF- o. Fas-Rezeptor) oder das TRAIL-Rezeptorsystem, welches zu einer Rezeptortrimerisierung führt. Anschließend lagern sich zyttoplasmatische Adapterproteine, wie beispielsweise FADD (bindet an Fas-Rezeptor) oder TRADD (bindet an TNF-Rezeptor) an und können den NF- κ B-Signalweg einleiten. Über mehrere Zwischenschritte wird intrazellulär der DISC (death inducing signaling complex) gebildet, der die Initiator-Caspase-8 aktiviert und die Caspasen-Kaskade startet (LAVRIK et al., 2005). Die aktivierte Caspase-8 aktiviert wiederum die Exekutions-Caspasen, die sich bei hoher intrazellulärer Konzentration zusätzlich autokatalytisch aktivieren können (DI PIETRO, ZAULI, 2004). Weitere Liganden des FADD-Adapterproteins sind Caspase-10, ein weiterer Apoptose-Induktor, und der Proteasom-Inhibitor cFLIP (cellular FLICE inhibitory protein), der die Apoptose-Induktion unterbindet (ELMORE, 2007; KISCHKEL et al., 1995).

2.5.3 Nekrose

Bei der Nekrose gehen die Zellen aufgrund externer Einflüsse zugrunde. Dies beruht auf umfassenden Zellschäden, die zum Untergang der Membranintegrität führen. Sie findet in der Regel nicht programmiert statt und resultiert in einem Zellschaden oder Infiltration durch Pathogene. Es führt zu einer Entzündungsreaktion, die durch die Immunzellen getriggert wird und eine gesteigerte Durchblutung, durch die die Entzündungsmediatoren schneller an den Ort der Entzündung gelangen. Die Mitochondrien schwellen an und es kommt zur vollständigen Zelllyse. Anders als bei der Apoptose werden keine Vesikel abgeschnürt.

2.5.4 Nekroptose

Die Nekroptose ist eine programmierte und regulierte Form der Nekrose. Sie wird in zwei Phasen eingeteilt: Signalphase und zelluläre Zersetzungsphase. Zu Beginn werden Todesrezeptoren (TNF) stimuliert, wodurch RIPK1- (receptor-interacting serine-threonine

Proteinkinase 1) und TRADD (TNFR1-associated death domain) einen Komplex miteinander eingehen, der für die Aktivierung von NF κ B essenziell ist. In der zweiten Phase werden die mitochondriale und lysosomale Membran und die Plasmamembran zersetzt, welches zum Zelltod führt. Dabei spielen reaktive Sauerstoffradikale (ROS, engl. reactive oxygen species) eine große Rolle (GALLUZZI et al., 2018). Es handelt sich um eine Caspase-unabhängige Form des Zelltods.

2.5.4.1 Signalwege der Nekroptose

Die Nekroptose kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, beispielsweise durch Bindung von TNF- α an TNF-R oder TRAIL an Todesrezeptoren (death receptor 3 and 4) (FEOKTISTOVA, LEVERKUS, 2015). Nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kommt es zur Komplexbildung von TRADD (TNF-associated death domain), TRAF2 (TNF-associated factor 2), cIAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2) und RIP1 (receptor-interacting serine-threonine Protein 1). Eine cIAP1 und cIAP2 vermittelte Ubiquitinierung von RIP1 stabilisiert den Komplex. In der Regel geht RIP1 einen Komplex mit FADD (Fas-associated death domain) und der Caspase-8 ein. Dieser verhindert die Aktivierung von RIP3 und hemmt FADD. Da der Komplex jedoch durch die Ubiquitinierung stabilisiert wurde, kann die Procaspase-8 nicht aktiviert werden. RIP1 aktiviert stattdessen RIP3 und es entsteht das sogenannte Nekrosom (Komplex-IIb) (GALLUZZI et al., 2018). Nach Autophosphorylierung von RIP3 wird das Effektorprotein der Nekroptose MLKL (mixed-lineage-kinase-domain-like) aktiviert (XIE et al., 2013; ZHAO et al., 2012). Dieses führt nach Autophosphorylierung zur Aktivierung von c-JUN-N-terminalen Kinasen (JNK) und über Freisetzung von ROS (reactive oxygen species) letztendlich zur Nekroptose (MURPHY et al., 2013).

2.6 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Das GBM ist der aggressivste und tödlichste Tumor des ZNS. Durch die Tumorerogenität ist die bisherige Behandlung nach einem kurativen Behandlungsansatz unmöglich. Alternative, vielversprechende Behandlungsmöglichkeiten, wie z.B. die onkolytische Virotherapie müssen dringend untersucht werden. Da die onkolytischen Viren als Therapieoption die Fähigkeit besitzen, selektiv in Tumorzellen zu replizieren um diese anschließend abzutöten, verfolgte diese Arbeit das Ziel, die komplexen Zelltodformen nach Einzel- und Doppelinfektion zweier verschiedener Glioblastomzelllinien mit variierenden Virustitern zu charakterisieren. Auf Basis der ermittelten Daten soll ein besseres Verständnis für die zugrunde liegenden Mechanismen gewonnen und die Erfolgsaussichten einer kombinierten OV-Therapie abgeschätzt werden.

Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Lässt sich ein onkolytischer Effekt in den verwendeten Viren RV, PV und NDV bei Einzel- und Doppelinfektion nachweisen und wenn ja eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen?
2. Welche Zelltodarten gehen die Glioblastomzellen nach Einzel- und Doppelinfektion ein? Lässt sich eine Zeitabhängigkeit nachweisen?
3. Gehen die Glioblastomzelllinien bei Kombination zweier Viren andere Zelltodarten ein als nach Einzelinfektion?
4. Hat die kombinierte Infektion mit zwei Viren einen gewinnbringenden onkolytischen Effekt im Vergleich zur Einzelinfektion?
5. Zu welchen Zeitpunkten lassen sich die Effektorcaspasen 3 und 7 als Zeichen der Apoptose-Einleitung nachweisen?
6. Sind die beobachteten Effekte zelllinienspezifisch?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
AB-serum human	Sigma Aldrich (München)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Life Technologies (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Schnelldorf)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich (Schnelldorf)
Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Ethanol, 70 %	Sigma Aldrich (Seelze)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG (Berlin)
Iodixanol	Progen Biotechnik (Heidelberg)
Isopropanol	Otto Fischar GmbH & Co KG (Saarbrücken)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-formazan)	Sigma Aldrich (Schnelldorf)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR (Heverlee)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich (München)

Penicillin/Streptomycin (P/S) (10.000 U/10 mg/ml)	Sigma Aldrich (Schnelldorf)
Salzsäure (HCl)	Zentrales Chemikalienlager (Homburg)
Triton-X-100	Sigma Aldrich (Schnelldorf)
Vectashield, Eindeckmedium	Biozol Diagnostica (Eching)
Virugard	Bode Chemie GmbH (Hamburg)
Vivaspin	Sartorius (Göttingen)
Alle weiteren Chemikalien	Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe)

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACSCanto™ Flow Zytometer	BD Biosciences (USA)
Brutschrank	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG (Verl)
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories (Feldkirchen)
Inkubator	WTB Binder Labortechnik GmbH (Tuttlingen)
Inkubator, Hera Cell 150	Thermo Electron Corporation (Langenselbold)
LightCycler 480 II	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar)
Mikroskop, CH2	Olympus (Japan)
Mikroskop DMI 6000B	Leica (Wetzlar)

Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories (Feldkirchen)
Neubauer-Zählkammer 0,100 mm; 0,0025 mm²	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen)
pH-Meter, pH 211	HANNA Instruments (USA)
VICTOR Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer (Rodgau)
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories (Feldkirchen)
Real-time-PCR Gerät, LightCycler® 480 II	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Sterilbank, EuroFlow Serie Typ EF/S	Clean Air Technik B.V. (Woerden)
Sterilbank, Hera Safe	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories
Tube Sealer, 4806C	Beckman Instruments (USA)
Ultrazentrifuge, Optima L-90 K	Beckman Coulter (USA)
Vortex Genie	Bender & Hobein AG (Schweiz)
Wasserbad	Memmert GmbH + Co KG (Schwabach)
Zellhomogenisator (Douncer)	B. Braun (Melsungen)
Zentrifuge, Centrifuge 5804	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, Minifuge RF	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)

3.1.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
bisBenzimide Hoechst 33342 trihydrochloride	Sigma Aldrich (München)
Propidium-iodide solution (1 mg/ml in water)	Sigma Aldrich (München)
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific (USA)

3.1.4 Antikörper

Zielstruktur	Primärantikörper	Sekundärantikörper
b-Aktin	Monoklonales Anti-b-Aktin in Maus hergestellte Antikörper (Sigma Aldrich, München)	Anti-mouse-igG-Peroxidase in Kaninchen hergestellte Antikörper (Sigma Aldrich, München)
Caspase-3	Caspase 3 Antibody (CellSignaling, USA)	Anti-rabbit-IgG-Peroxidase in Ziege hergestellter Antikörper (Sigma Aldrich, München)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cellstar® Zellkulturplatten (24-, 48-, 96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)

Eppendorfgefäße, 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Fluoreszenz-Mikroplatte	Perkin Elmer (Rodgau)
Kanülen (0,9 mm x 40 mm)	BD Microlance (Spanien)
Kryoröhrchen, CryoPure 1,6 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Immobilon-NC Transfer Membran (Nitrocellulose—Membran)	Merck (Darmstadt)
Objekträger	Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm, Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging (USA)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml (FACS-Röhrchen)	Corning Science (Mexiko)
Quick-Seal-Röhrchen Centrifuge Tubes	Beraneck Laborgeräte (Weinheim)
Spritze (1 ml)	Braun (Bad Arolsen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Versiegelungsfolien (für Mikrotiterplatten)	Axygen UC-500 (USA)
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.6 Viren

Name		Stock	Titer	Bezugsquelle
Reovirus Stamm Dearing	Typ III,	17.2	4,2 x 10 ⁶ cp/µl	ATCC (USA)
		18.1	Nicht verwertbarer Titer	

	18.3	$5,6 \times 10^4$ cp/ μ l	
	18.4	$4,9 \times 10^4$ cp/ μ l	
Parvovirus, Stamm H1	17.1	$3,4 \times 10^6$ cp/ μ l	Prof. Rommelaere (DKFZ Heidelberg)
Newcastle-Disease Virus, Stamm Hitchner B1	14.3	$1,9 \times 10^6$ cp/ μ l	Friedrich-Löffler-Institut (Riems)
	15.1	$3,3 \times 10^8$ cp/ μ l	

3.1.7 Kultivierte Zellen

Zellen	Hersteller
NBK-Zellen	DKFZ (Heidelberg)
U87 Humane Glioblastom-Zelllinie	ATCC (USA)
U373 Humane Glioblastom-Zelllinie	Thermo Fisher
Verozellen	ATCC (Wesel)

3.1.8 Kits

Kits	Hersteller
CaspaseGlo-3/7	Promega Corporation
Annexin-V Binding Buffer	Invitrogen (by Thermo Fisher Scientific)

3.1.9 Zellkulturmedien

Medium zur Kultivierung der Tumorzellen

DMEM

10 % FKS

1 % P/S

3.1.10 Puffer und Lösungen

Einfriermedium

30 % FKS

10 % DMSO

In jeweiligem Zellkulturmedium

MTT-Arbeitslösung

0,5 mg/ml MTT

In PBS gelöst

PBS

10 g/l NaCl

0,25 g/ö KCl

1,44 g/l Na₂HPO₄

Ad 1 l Aqua dest.

pH 7,4

Trypsin

10 % Trypsin

In PBS

vTE1%Tritonx100

50 mM Tris-Base

0,5 mM EDTA-Lösung

1 % Tritonx100

HCl

pH 8,9

3.2 Methoden

3.2.1 Computer-Software

Zur Textverarbeitung diente das Programm Microsoft Word. Zur Erstellung der Tabellen und Grafiken wurden Microsoft Excel und Graphpad Prism 8.0 verwendet. Die Auswertung der RT-PCR wurde mit der LightCycler Software (Version 3.5 Roche) durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit ImageJ (Wayne Rasband) bearbeitet und ausgewertet. Die statistische Auswertung wurde mit Graphpad Prism 8.0 durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurden die Daten zunächst auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Anschließend erfolgte bei nachgewiesener Normalverteilung eine Varianzanalyse und bei ausbleibender Normalverteilung ein Kruskal-Wallis-Test.

3.2.2 Allgemeine Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In diesem Projekt wurden die humanen Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 verwendet. Alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der durchflusszytometrischen Aufbereitung der infizierten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Das Kulturmedium der Zelllinien wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Hierzu diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), welchem zehnpromzentiges fetales Kälberserum (FKS) und einpromzentiges Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde.

3.2.2.2 Vermehren und Passagieren der Zellen

Das Wachstum der Tumorzellen wurde im Lichtmikroskop beurteilt. Bei einer Besiedlung bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Hierfür wurde der Inhalt der Zellkulturflasche im ersten Schritt in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß gegossen. Die adhärennten Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und ebenso in das Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die adhärennten Zellen durch die Zugabe von 2,5 ml von zehnpromzentigem Trypsin und Inkubation für 3 mins im Brutschank vom Zellboden gelöst und das Trypsin mit 2,5 ml Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde sodann in das Reaktionsgefäß pipettiert. Ein erneuter Spülvorgang mit PBS diente dazu, die restlichen Zellen in das Reaktionsgefäß zu überführen. Nach Zentrifugation für 5 mins bei 400 G wurde der

Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet mit 5 ml Medium gelöst. Die Zellen wurden im gewünschten Verhältnis in die Zellkulturflasche ausgesät und mit Medium verdünnt.

3.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Hierfür wurde von den Zellen nach dem Passagiervorgang eine 1:10-Verdünnung erstellt. Anschließend wurden 100 µl der Verdünnung in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Diese besteht aus 2 x 4 Quadranten, die je in 4 x 4-Kleinquadrate gegliedert sind. Nach Ermittlung des Mittelwerts der Zellen in den Quadranten der Neubauer-Zählkammer wurde mit folgender Formel die Zellanzahl pro ml ermittelt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{Zellanzahl in Quadranten}}{8} \right) \times \text{Verdünnungsverhältnis der Zellen} \\ \times \text{Verdünnungsfaktor der Zählkammer}$$

Verdünnungsfaktor der Zählkammer = 10^4

3.2.2.4 Zellen aussäen

Für die Infektion wurden die Tumorzellen in einer vorher definierten Menge auf 24-Well-, 48-Well- und 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Zur Berechnung der erforderlichen Menge diente folgende Formel:

$$\text{Benötigtes Volumen der Zellsuspension [ml]} = \frac{\text{gewünschte Zellanzahl}}{\frac{\text{berechnete Zellanzahl}}{\text{ml}}}$$

Nach Aussaat der Zellen in die 96-Well- und 48-Well-Mikrotiterplatten wurde jede Vertiefung mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Die 24-Well-Mikrotiterplatten wurden mit Medium auf 1 ml aufgefüllt.

Ein 160-200 µl PBS-Ring diente dazu, dass die ausgesäten Zellen durch die Brutschrankwärme nicht verdunsten.

3.2.2.5 Kryokonservierung der Zellen

Zu Beginn wurden die Zellen der Zelllinien U87 und U373 analog zum regulären Passagiervorgang von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte

eine Zentrifugation für 5 mins bei 400 G ohne Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nach zweimaligem Waschvorgang mit 5 ml PBS für 5 mins bei 400 G ohne Bremse zentrifugiert. Den Zellen wurden dann 1,5 ml Einfriermedium zugesetzt und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zur Schonung schrittweise heruntergekühlt. Zuerst für 2h bei -20 °C, dann über Nacht bei -80 °C. Zum Schluss wurden die Zellen für die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.2.6 Auftauen der Zellen

Die Zellen in den Kryoröhrchen wurden mit heißem Wasser aus einem Wasserhahn aufgetaut. Danach wurde der Inhalt der Kryoröhrchen in ein steriles Reaktionsgefäß mit 45 ml Medium überführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann bei 400 G für 5 mins ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit 5 ml Medium aufgelöst. Daraufhin wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche ausgesät und 13 ml Medium hinzugegeben.

3.2.3 Viren

Die Reoviren, Parvoviren und Newcastle Disease Viren wurden mit den folgenden Methoden produziert.

3.2.3.1 Reovirus – Produktion und Aufreinigung

Die Reovirus-Produktion gliederte sich in drei Schritte: Implementation, Ultrazentrifugation und Gradientenzentrifugation.

Für die Virus-Implementation wurden im ersten Schritt Verozellen in zwölf 125 cm² Zellkulturflaschen mit Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu 60 % Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen mit einem Aliquot des produzierten Reovirus Stocks infiziert und erneut für in der Regel 4-5 Tage kultiviert, bis ein zytopathischer Effekt sichtbar war. 12-15h nach Infektion wurde das Medium gewechselt.

Für die Ultrazentrifugation wurden alle Arbeiten mit dem Virus auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und in Reaktionsgefäßen gesammelt. Dann wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C für 8 mins und 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in weiteren Reaktionsgefäßen gesammelt und auf Eis gestellt. Dem Zellpellet wurden 6 ml vTE-Puffer mit 1 % TritonX-100 zugegeben. Nach Resuspension

wurden die Zellen mit einem Douncer aufgebrochen und erneut bei 4 °C für 8 mins und 3.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in den für die Zentrifugation verwendeten Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Zugabe von 3 ml 1 % TritonX-100 und anschließende Resuspension des Zellpellets erleichterte die Trennung der Viren von der Zytoplasmamembran. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C für 4 mins bei 4.000 rpm wurde der Überstand in den bekannten Reaktionsgefäßen gesammelt und das Zellpellet verworfen. Der virushaltige Überstand wurde für die weitere Aufreinigung in Quick-Seal-Röhrchen überführt. Das Gewicht der Reaktionsgefäße wurde nun für die Ultrazentrifugation mit Medium auf einer Waage austariert, versiegelt und schließlich bei 4 °C für 4h bei 50.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml PBS mit einem Douncer homogenisiert, mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 1: Rezept für vTE1 % TritonX-100-Puffer nach M. Alkassar (2012)

50 mM TRIS-Base
0,5 mM EDTA-solution
HCl bis pH 8,3
1 % TritonX-100-Lösung

Im letzten Schritt der Virusaufreinigung wurde die homogene Flüssigkeit über einen vorher angefertigten Succrose-Gradienten von 40 %, 25 % und 15 % bei 4 °C für 3h bei 50.000 rpm zentrifugiert. Um den Zucker von der entstandenen Virusschicht zu trennen (diese befand sich an der Grenze der 40 % haltigen Succrose-Phase), wurde die virushaltige Schicht zuerst mit einer Pipette in Reaktionsgefäße überführt und am nächsten Tag nach Zugabe von PBS bei 4 °C für 2h bei 50.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurde erneut PBS hinzugegeben und die Reaktionsgefäße bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Das entstandene Pellet wurde ein letztes Mal auf Eis mit einem Douncer mechanisch aufgebrochen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C für 3 mins und 3.000 rpm zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde mit PBS aufgefüllt, anschließend in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C kryokonserviert.

Die Konzentration der aufgereinigten Viren wurde mithilfe einer quantitative real-time PCR (RT-PCR) bestimmt. Zum Vergleich diente eine Reovirus-Produktion mit einem bereits

bekanntem Titer (17.2). Anschließend wurde ein MTT durchgeführt, um einen onkolytischen Effekt der neuen Reovirus-Produktion (18.2) nachzuweisen und diesen mit einer bereits bekannten Reovirus-Produktion (17.2) auf Tumorzellen zu vergleichen.

Die RNA der Reoviren wurde zur Vorbereitung der RT-PCR isoliert. Zuerst wurden 100 µl des Virus in 400 µl NaCl resuspendiert und 400 µl Lyse-Puffer pipettiert. Es wurden dann magnetische Silica-Kügelchen hinzugegeben, um selektiv RNA-Moleküle zu extrahieren. Danach wurde die RNA mehrfach gewaschen, um reine RNA für die Versuche vorliegen zu haben.

3.2.3.2 Newcastle-Disease Virus – Produktion und Aufreinigung

Die Newcastle-Disease Viren wurden in spezifisch pathogenfreien (SPF) und befruchteten Hühnereiern produziert. Sie wurden für elf Tage im Brutschrank bei 37 °C und 50-65 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Vitalitätsprüfung der Hühnerembryonen mit einer Schierlampe wurden unbefruchtete Eier ausgeschlossen.

Zur Virusvermehrung wurde die Allantois-Höhle der befruchteten Eier mit 100 µl Viruslösung beimpft, für weitere drei Tage bebrütet und ihre Vitalität nach 24h und 48h evaluiert. Sofern die Embryonen noch nach 72h lebten, wurden sie spätestens durch Lagerung im Kühlschrank über Nacht bei 4 °C abgetötet. Die Embryonen, die nach 48h und 72h starben, wurden für die spätere Ernte im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Embryonen, die nach 24h starben, wurden verworfen. Für die Ernte der Allantois-Flüssigkeit wurde die Eierschale am stumpfen Pol angeschlagen und mit einer sterilen Pipette entfernt. Daraufhin konnte die Allantois-Flüssigkeit mit einer Pipette in ein Gefäß überführt und 1 % P/S und 150 ml Polyethylenglycol (PEG)-PBS hinzugegeben werden.

Für die Virusaufreinigung wurde die virushaltige Amnionflüssigkeit in zuvor mit 70 % Ethanol desinfizierten und mit PBS gespülten Quick-Seal-Röhrchen bei 4 °C für 4h bei 40.000 rpm ultrazentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde über Nacht mit 2 ml PBS bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag nach erneuter Zugabe von PBS mit einem Douncer homogenisiert. Der gesamte Inhalt der Quick-Seal-Röhrchen wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Ein Saccharose-Dichtegradient ermöglichte die Virusisolation durch eine erneute Ultrazentrifugation, da sich die Virussuspension in 40 % Saccharose-Schicht ansiedelte. Es wurde zur Unterscheidung der verschiedenen Saccharose-Schichten die äußeren 60 % und 20 % Saccharose-

Schichten mit Phenolrot angefärbt. Nun wurde die virushaltige 40 % Saccharose-Schicht abpipettiert und für eine erneute Ultrazentrifugation in Quick-Seal-Röhrchen überführt, um reines virushaltiges und zuckerfreies Material zu isolieren. Das daraus entstandene Pellet wurde in PBS gelöst, mit einem Douncer homogenisiert und in Eppendorfgläsern aliquotiert.

3.2.3.3 Parvovirus – Produktion und Aufreinigung

Zur Produktion der PVs dienten NBK-Zellen. Diese wurden bis zu einem konfluenten Zellwachstum in 75 cm² Schalen angezüchtet und anschließend mit 100 µl Viruslösung beimpft. Nach 4-5 Tagen war eine ausgeprägte Zytolyse zu erkennen, sodass die Virusernte erfolgen konnte. Dafür wurde der gesamte Inhalt der Schale unter Verwendung eines Zellschabers in einem Reaktionsgefäß gesammelt und für 5 mins bei 1000 G zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 6 ml vTE-Puffer vermischt und in 3-4 Frier- und Tauzyklen aufgebrochen. Nun erfolgte die Entfernung grober Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 15 mins bei 3.000 rpm. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde für die weitere Virusaufreinigung mit dem nun neu entstandenen Überstand vermengt.

Die produzierten Viren wurden zur Aufreinigung in Quick-Seal-Röhrchen für 4h bei 40.000 rpm ultrazentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 5 ml PBS resuspendiert und mit einem Douncer homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde ein Dichtegradient mit 15 %-, 25 %-, 40 %- und 60 %-Iodixanol-Lösung angesetzt und die 25 %- und 60 %-Phase mit Phenolrot gefärbt. Anschließend wurde die Lösung mit der aufzureinigenden Virussuspension überschichtet und für 12h bei 40.000 rpm ultrazentrifugiert. Mit einer sterilen Spritze konnte aus der 40 %-Bande das Virusmaterial entnommen werden. Die Viren wurden durch eine Zentrifugations-Diafiltration in Vivaspin 15-Röhrchen vom Iodixanol getrennt und die Viruskonzentration mit RT-PCR erhoben.

Die in dem Projekt verwendeten Newcastle-Disease- und Parvoviren wurden von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors produziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.4 RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht, Rückschlüsse auf die Menge der Ausgangssubstanz zu ziehen, indem eine exponentielle Vermehrung von cDNA erfolgt. Hierbei werden drei Phasen zyklisch durchlaufen: Denaturierung, Annealing

und Elongation. Nach der Denaturierung des genetischen Materials folgt das Annealing. In dieser Phase werden kurze Oligonukleotid-Sequenzen (Primer) hybridisiert, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Nach dem Andocken des Primers erfolgt die Elongation. Sie findet an der freien 3'-OH-Gruppe des Primers durch eine spezifische Polymerase (Taq-DNA-Polymerase) statt.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten RT-PCR handelt es sich um eine Form der PCR (real-time detection PCR), die die Amplifikation in Echtzeit ermöglicht. Dafür wurden fluoreszenzmarkierte Taqman-Sonden verwendet. Diese besitzen zwei Fluoreszenzfarbstoffe und docken während der Annealing-Phase an eine spezifische Sequenz der Ausgangsnukleinsäure zwischen den beiden Primern an. Durch einstrahlendes Licht in einer definierten Wellenlänge werden die Fluoreszenzfarbstoffe erregt und emittieren Licht in einer messbaren Wellenlänge. Am 5'-Ende bindet der sogenannte Reporterfarbstoff (to report = berichten), am 3'-Ende der Quencherfarbstoff (to quench), die beide auf dem gleichen Oligonukleotid der Taqman-Sonde lokalisiert sind. Bei räumlicher Nähe zueinander hemmt der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters. In der Elongationsphase nähert sich die Taq-DNA-Polymerase dem Oligonukleotid, auf dem sich die fluoreszierenden Farbstoffe befinden. Durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität wird die Sonde hydrolysiert. Dadurch wird das Reportersignal freigesetzt. Mit steigender Amplifikation nimmt das freigesetzte Fluoreszenzsignal zu.

Die Polymerase-Kettenreaktion bedingt das Vorliegen von DNA. Daher muss die virale RNA mittels reverser Transkription durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in der vierten Phase der RT-PCR in lesbare cDNA umgeschrieben werden.

Die RT-PCR wurde mit einem Light-Cycler durchgeführt. Vorab wurde ein Mastermix nach den Herstellerangaben angesetzt. Dieser setzte sich zusammen aus einem Forward- und einem Reverse-Primer, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), Polymerase, Taqman-Sonden, Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) und Puffer (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-PCR

Reagenz	Volumen
25x RT-PCR Enzym-Mix ABI	1 μ l
2x RT-PCR Puffer	12,5 μ l

Primer-Sonden-Mix (virusspezifisch)	1,5 µl
-------------------------------------	--------

Für die RT-PCR wurden von den beiden Reovirus-Produktionen 17.2 und 18.1 Verdünnungsreihen (1:1 bis 1:1000) angesetzt und U87 Zellen anschließend mit diesen infiziert. H₂O diente als Negativkontrolle und virusspezifische Standards in einer Verdünnungsreihe von 10³ bis 10⁶ Genomkopien pro µl als Referenz.

Vorab wurde der LightCycler wie folgt konfiguriert: Initialdenaturierung 1 Zyklus für 10 mins bei 95 °C, Amplifikation 40 Zyklen für 8 s bei 95 °C, Cooling für 45 s bei 60 °C, reverse Transkription 15 mins bei 50 °C.

Das Programm LightCycler Software Release 1.5.0 zeichnete die detektierte Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl auf. Dadurch konnten zum einen RVs nachgewiesen, zum anderen anhand der berechneten Kurven durch die bekannte Viruskonzentration der Virusstandards Rückschlüsse auf die verwendeten RV-Titer gezogen werden.

3.2.5 Virusinfektion

Die Zelllinien U87 und U373 wurden mit den OV RV, PV und NDV infiziert. Nach Aussaat der Zellen auf Mikrotiterplatten erfolgte die Infektion mit verschiedenen Virus-Konzentrationen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (0,00001 cp/c bis 1000 cp/c) aus dem Virus-Stock erstellt.

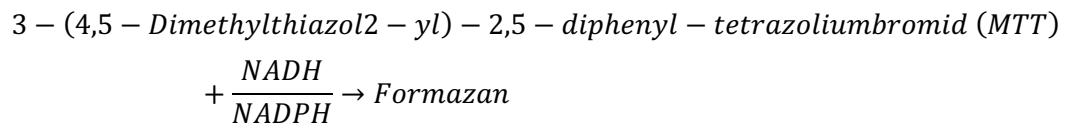
Für die Doppelinfectionen wurden zwei Viren in einem Verhältnis von 0,5:0,5 miteinander kombiniert, deren addierte Viruskonzentration der gewünschten Gesamtkonzentration entsprach.

3.2.6 Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Mittels des MTT-Assays wurden die Stoffwechselaktivität und die Viabilität der infizierten Tumorzellen untersucht. Es handelt sich um eine kolorimetrische Methode, bei der nach Zugabe des gelben, wasserlöslichen Reagenz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in vitalen Zellen die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH umgesetzt werden und dabei blau-violettes, wasserunlösliches Formazan entsteht. Durch Messung des Formazans kann die Anfälligkeit der Tumorzellen auf das produzierte Virus untersucht und Rückschlüsse auf seine Funktionsfähigkeit und den Metabolismus der Tumorzellen

gezogen werden. Die Menge des umgesetzten Farbstoffes entspricht dabei der Stoffwechsellaktivität.

Dafür liegt die folgende Reaktionsgleichung zugrunde:



Weiterhin wird MTT zu einem geringen Anteil auch von Succinat in den Mitochondrien reduziert (MOSMANN, 1983)

3.2.6.1 Durchführung

Zuerst wurden die Tumorzellen mit einer Dichte von 1×10^4 c/well auf Mikrotiter-Platten ausgesät. Die Infektion erfolgte mindestens 2h nach Aussaat, nachdem unter dem Mikroskop eine Zelladhärenz am Boden jeder zellhaltigen Vertiefung sichergestellt wurde. 72h nach Infektion wurden 100 μl des Überstands verworfen und 100 μl MTT auf die Zellen pipettiert. Nach 2h wurde der gesamte Zellüberstand verworfen und 100 μl Isopropanol zur Lyse der Zellen zugesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Klebefolie verschlossen und bei RT für 20 mins bei 500 rpm auf den Rüttler gestellt, um den von den Zellen aufgenommenen Farbstoff in Lösung zu bringen. Danach wurden die Mikrotiterplatten entweder bis zur Messung bei -20° Celsius gelagert oder unmittelbar mit dem Perkin Elmer 2030 Plate Reader und dem Programm Workout 2.5 ausgewertet. Die photometrische Darstellung der Absorption des MTT erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm).

3.2.6.2 Auswertung

Die Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen wurden in aufsteigender Viruskonzentration in einem Graphen aufgetragen.

3.2.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

3.2.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine zellbiologische Methode, die mittels Laser-Technologie die simultane Messung multipler Parameter ermöglicht. Beispielsweise können Zellen in einer

heterogenen Flüssigkeit nach ihrer Größe und Granularität typisiert, sortiert und gezählt werden.

FACS steht für fluorescence-activated cell sorting und ist eine durchflusszytometrische Labormethode, bei der die Zellen einzeln nacheinander eine Kapillare passieren. Ein Laserstrahl wird in einer bestimmten Wellenlänge und Frequenz ausgesendet und erregt die vorbeiziehende Zelle. Das emittierte Licht wird von Detektoren (PMT = photomultiplier tubes) nach der Intensität und der Wellenlänge aufgeschlüsselt. Es handelt sich um einen Argon-Laser, der Fluoreszenzfarbstoffe stimuliert und das entstehende Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm absorbiert. Die Detektoren befinden sich im BD FACSCantoTM Flow Zytometer. Das emittierte Licht wird an zwei Stellen gemessen - am forward scatter und am side scatter. Vom forward scatter werden alle Strahlen detektiert, die aus der gleichen Richtung wie der Laserstrahl stammen (Vorwärtsstreulicht). Der side scatter detektiert alle Strahlen, die im 90°-Winkel zum Laserstrahl emittieren (Seitwärtsstreulicht). Die Intensität des Vorwärtsstreulichts wird von der Zellgröße und die des Seitwärtsstreulichts von der Zellgranularität beeinflusst. Durch die Verwendung von Spiegeln und Filtern gelangen Strahlen zu einem für ihre Wellenlänge spezifischen Detektor. Die vom BD FACSCantoTM Flow Zytometer detektierte Fluoreszenz wird in elektrische Signale konvertiert und in einem Dot-Plot aufgetragen. Der Messbereich leitet sich aus dem Vorliegen von 1024 Kanälen ab. Die Verwendung von Farbstoffen und spezifischen Antikörpern eröffnet dieser Methode ein weites Spektrum an Untersuchungen. Beispielsweise ermöglicht es den Nachweis über das Vorliegen bestimmter Proteine und Zellphasen.

Mithilfe der Zellkontrollen, die nicht mit Fluoreszenz markiert sind, lassen sich autofluoreszierende Stoffe wie NADPH, FAD etc. herausrechnen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Zelltods (Apoptose, Nekroptose oder Nekrose) nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und NDV mit verschiedenen Virus-Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Hierfür wurden die infizierten Zellen mit PI und Annexin-V angefärbt.

PI interkaliert Nukleinsäuren (DNS und RNS) und kann die Zellmembran nicht durchdringen. Dies ermöglicht die Differenzierung lebender von sterbenden und toten Zellen. Das Fluoreszenzexcitationsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 535 nm und das

Emmissionsmaximum bei 617 nm. Annexin-V ist ein humanes Antikoagulant und bindet Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserin. Dieses befindet sich in vitalen Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran und wird während der Apoptose auf die äußere Seite der Zellmembran transloziert und kann dadurch gemessen werden. Das Fluoreszenzexcitationsmaximum liegt bei 494 nm und das Minimum bei 518 nm.

3.2.7.2 Durchführung der FACS-Analyse

3.2.7.2.1 Kalibrierung der FACS-Durchflusszytometrie

Um die Durchflusszytometrie für die anstehenden Analysen zu kalibrieren, wurden Zellen mit einem möglichst starken Virus infiziert, in unserem Fall mit NDV. Hierfür wurden Zellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ c/well auf eine 2 x 3-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und am nächsten Tag mit 10 cp/c infiziert. Zur Kalibrierung wurde eine Vertiefung ausschließlich mit Medium befüllt. Eine weitere wurde mit Medium und infizierten Zellen ohne Zugabe von Farbstoff ausgestattet. Zwei Vertiefungen wurden mit Medium, infizierten Zellen und jeweils Annexin-V oder PI Zusatz am Tag der Messung befüllt. Die Messung erfolgte nach 24h.

Für den Versuch wurden die Zellen der Linie U87 in eine 6 x 4-Well-Mikrotiterplatte mit 250.000 c/well ausgesät und für 3h im Brutschrank inkubiert. Die anschließenden Einzel- und Doppelinfektionen mit RV, NDV und PV erfolgten mit einer Viruskonzentration von 1 cp/c, 10 cp/c und 100 cp/c. Auf die RV-Infektion mit 100 cp/c wurde zugunsten eines ökonomischen Virusgebrauchs verzichtet. Es erfolgte eine Messung 4h, 8h und 24h nach der Infektion.

3.2.7.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Messung

Zuerst wurden die infizierten Zellen mit PBS gewaschen. Dann erfolgten die Trypsinierung und Überführung der vom Mikrotiterplattenboden gelösten Zellen in FACS-spezifische Reagenzgläser. Die Vertiefungen wurden ein zweites Mal gewaschen und der restliche Inhalt in die jeweiligen FACS-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden zweimal bei 1.400 rpm für 6 mins zentrifugiert und die Überstände verworfen. Ein Bindepuffer wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. angesetzt und die Zellen mit 1,5 ml dieser Mischung gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurde mit 100 μl Bindepuffer resuspendiert, 5 μl Annexin-V pro Röhrchen zugesetzt und die Röhrchen für 15 mins bei RT dunkel gestellt. In einem erneuten Waschvorgang mit Bindepuffer wurde ungebundenes Annexin-V entfernt.

In einem letzten Schritt wurden 200 µl Bindepuffer und 5 µl PI in jedes FACS-Röhrchen pipettiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte innerhalb von 4h.

3.2.7.3 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse erfolgte in einem Balkendiagramm im fold change. Hierfür wurden die einzelnen Werte auf die Zellkontrolle normiert (fold change = Wert der Probe/Zellkontrolle). Der fold change der Zellkontrolle entsprach dem Wert 1. Die unterschiedliche Bindung durch Annexin-V und PI ermöglichte die Charakterisierung des zugrunde liegenden Zellsterbens. Zur Auswertung wurde folgende Einteilung angenommen:

Annexin-V +/PI -	Apoptose
Annexin-V +/PI +	Nekroptose
Annexin-V -/PI +	Nekrose

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung mit Hoechst und PI

3.2.8.1 Allgemeines/Prinzip

Abbildung 4.3 aus
Schmitz S, Desel C (2018).
Der Experimentator Zellbiologie. 1. Auflage.
In (Springer Spektrum), p. 89

Abbildung 1: schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops (SCHMITZ, DESEL, 2018)

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, die die Darstellung von fluoreszenzmarkierten Zellbestandteilen vor dunklem Hintergrund ermöglicht (Abbildung 1). Es

können durch die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen intra- und extrazelluläre Strukturen dargestellt und Rückschlüsse auf Funktion, Metabolismus und Beschaffenheit von Proteinen gezogen werden. Wird ein Farbstoff von einer Lichtquelle bestrahlt, so wird dieses Licht absorbiert und der Farbstoff in einen energiereicheren Zustand überführt. Bei Rückkehr vom energiereichen in den energiearmen Ausgangszustand wird Energie freigesetzt, die als sichtbares Licht im Mikroskop erkennbar ist (Emission). Als Lichtquelle können LEDs oder Gasentladungslampen verwendet werden. Das Licht wird über einen Lichtleiter in das Mikroskop geführt und bestrahlt die Probe von oben oder unten (Auflichtmikroskop, Epi-Fluoreszenzmikroskop). Zu den Aufgaben des Objektivs des Fluoreszenzmikroskops gehören einerseits die Bündelung des Anregungslichts und andererseits Aufnahme und Fortleitung des emittierten Lichts. Ein wichtiger Bestandteil stellt der Filterblock dar, mit dem die zu untersuchende Anregungswellenlänge und der Bereich des Lichtspektrums definiert wird (Exzitations- und Emissionsfilter). Zusätzlich ist im Filterblock ein dichromatischer Spiegel verbaut, der den Lichtstrahl teilt. Er bewirkt, dass das Anregungslicht zur Probe reflektiert wird und das emittierte, langwelligere Licht das Okular passieren kann. Die Verwendung von Filtern mit verschiedenen Eigenschaften ermöglicht es, mehrere Fluorochrome darzustellen. Als Exzitations- und Emissionsfilter dienen Interferenzfilter, die spezifische Wellenlängenspektren durchlassen und blockieren können. Sie werden abhängig der Strahlen, die sie reflektieren und passieren lassen in shortpass (kurze Wellenlängen passieren, lange Wellenlängen werden reflektiert), longpass (lange Wellenlängen passieren, kurze Wellenlängen werden reflektiert) und bandpass (nur durchlässig für einen bestimmten Wellenlängenbereich) unterteilt. Um ein Ausbleichen der verwendeten Farbstoffe vorzubeugen, wurde zwischen den Messungen während der Datenspeicherung ein Shutter vor die Lichtquelle geschoben.

In dieser Arbeit wurden die direkt fluoreszierenden Nukleinsäureinterkalatoren Hoechst (Emissionsmaximum 460 nm) und PI (Emissionsmaximum 636 nm) verwendet, die aufgrund ihrer Eigenschaften die Zelle markieren. Hoechst interkaliert DNA und kann Zellmembranen überwinden. Es weist alle vorliegenden Zellen (vital, sterbend und tot) nach. PI kann die Zellmembran nicht passieren und stellt einen Marker für den Zelltod durch Nekrose dar.

3.2.8.2 Durchführung

Für die Immunfluoreszenz wurden U87 und U373 Zellen auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen in einer Menge von 15×10^4 c/well ausgesät. Die Virusinfektion erfolgte am Folgetag mit 1 cp/c und 10 cp/c.

Es wurde eine Farbstofflösung für die Zellfärbung angesetzt, die sich bei Dunkelheit im Kühlschrank bei 4 °C für drei Tage lagern ließ. Dafür wurde eine in Aqua dest. gelöste 5 µg/ml PI Lösung und 10 µM Hoechst mit PBS angesetzt. Pro Vertiefung wurde 0,02 µl Hoechst, 0,5 µl PI und 0,48 µl PBS pipettiert.

Vor der Messung der infizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 24h, 48h und 72h wurden zuerst 100 µl Medium von jeder Vertiefung der 96-Wells-Mikrotiterplatte verworfen und anschließend 1 µl/well der Färbelösung hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann geschwenkt und für 5 mins bei RT in Dunkelheit gestellt. Dann wurde das Medium vorsichtig unter Berücksichtigung der am Boden adhärenen, infizierten Zellen entfernt und 100 µl PBS hinzugegeben. Die Messung der Zellen erfolgte innerhalb 1h.

3.2.8.3 Auswertung

Es wurde mit dem 10-fach Objektiv ein für die Vertiefung repräsentativer Bildausschnitt unter dem Mikroskop eingestellt und nach Anpassung der Belichtung gespeichert.

Da das zum Mikroskop zugehörige Programm lediglich Schwarzweißbilder erstellen konnte, wurden sie nachträglich entsprechend dem unter dem Mikroskop gesehenen Originalbild mit dem Programm ImageJ Fiji gefärbt. Mit Hoechst interkalierte Zellen wurden blau und mit PI interkalierte Zellen wurden rot gefärbt. Danach wurde aus den gefärbten Einzelbildern mit Fiji ein Overlay-Bild erstellt. Die mit Hoechst blau gefärbten Zellen wurden mit dem Programm Fiji automatisch gezählt und zusätzlich manuell nachgezählt. Hoechst interkalierte, apoptotische Zellen wurden manuell gezählt. Die mit PI und Hoechst doppelt positiv gefärbten Zellen wurden mithilfe des entstandenen Overlays manuell gezählt.

3.2.9 Western Blot

3.2.9.1 Prinzip des Western Blots

Der Western Blot ermöglicht den immunologischen Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen. Dafür werden sie zuerst in einer Gelelektrophorese nach Größe, Ladung und Struktur aufgetrennt. Dann werden sie auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das nachzuweisende Protein bindet an einen spezifischen Primärantikörper. An diesen bindet wiederum spezifisch ein Sekundärantikörper, der ein messbares Licht emittiert.

Der Western Blot diente als Vorversuch zum Caspase-Assay, um die Zeitpunkte zu identifizieren, zu der die Caspase exprimiert wird und den Zelltod induziert.

3.2.9.2 Vorbereitung und Durchführung des Western Blots

Die U87 Zellen wurden nach dem bekannten Schema mit einer Dichte von 1×10^6 c/well in eine 2 x 6-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Auswertung der Einzelinfektionen mit RV, PV und NDV mit einer Viruskonzentration von 10 cp/c erfolgte nach einer Inkubationszeit von 4h, 8h und 24h.

Zu Beginn wurde der Überstand in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zunächst in Reaktionsgefäßen gesammelt. Die adhärennten Zellen wurden gespült, trypsiniert, bei 37 °C inkubiert und ebenso in die Reaktionsgefäße überführt. Es wurde bei 1.400 rpm für 6 mins zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Schließlich wurde für die SDS-Elektrophorese zweifach konzentrierter Probenpuffer (siehe Tabelle 2) in jedes Reaktionsgefäß gegeben, resuspendiert und der gesamte Inhalt in 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben mithilfe von Ultraschall für 2 x 5 s denaturiert und anschließend 10 mins bei 100 °C im Wasserbad inkubiert. Die anschließende Probenlagerung erfolgte bis zur Messung bei -20 °C.

Tabelle 2: Probenpuffer

Probenpuffer
6 ml SDS Stammlösung 10 %
2,5 ml Sammelgelpuffer
1 ml Mercaptopropandiol

1,05 ml Glycin 10 %
Bromphenolblau

Für die anstehende Messung wurden die Proben 5 mins lang bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in frische Eppendorfgefäße gegeben. Damit für die Gelelektrophorese in jeder Probe 15 µg Proteine enthalten waren, wurde die enthaltene Konzentration am Nanodrop gemessen und das für 15 µg benötigte Volumen mit der Formel: Volumen (für 15 µg) = $3,2/OD_{280}$ errechnet. OD_{280} kennzeichnet die Proteinkonzentration beim Absorptionsmaximum von 280 nm. Zuvor wurde für die Messung am Nanodrop eine 1:100-Verdünnung mit 0,1 M Natronlauge erstellt. Die berechneten Probenvolumina wurden mit destilliertem Wasser austariert.

Für die SDS-Elektrophorese wurden je 18 µl der Probe mit 10 µl des prestained Markers zugesetzt.

Zuerst wurden die Gele gegossen. Ein Sammelgel diente zur genaueren Bandentrennung, indem es die verschiedenen Proteine in den Proben im großporigen Sammelgel konzentrierte und ein Trenngel zur Auftrennung der Bestandteile. Diese setzten sich aus den in Tabelle 3 aufgezählten Substanzen zusammen. Die Gele wurden nacheinander gegossen. Nachdem das Trenngel gegossen wurde, wurde es bis zum Auspolymerisieren mit Isopropanol überschichtet. Erst nach erfolgter Auspolymerisation wurde das Isopropanol entfernt und schließlich das Sammelgel gegossen. Es wurde ein Plastikkamm für 20 bis 30 mins eingesetzt, der die Probenaschen bis zur Verfestigung des Sammelgels formte. Im Anschluss wurden die Gele in die SDS-Elektrophorese-Laufkammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer (siehe Tabelle 4) befüllt. Nachdem die vorbereiteten Proben in die Taschen der SDS-Kammer pipettiert wurden, wurden die Proteine für die Gelelektrophorese in einer „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ (BioRad), mit einer Stromstärke von 10 mA (bei 45 V) für 30 mins gesammelt und anschließend für das 25 mA (bei 220 V) für 1h nach der Molekularmasse aufgetrennt.

Tabelle 3: Trenn- und Sammelgel

Reagenz	Trenngel (10 %)	Sammelgel
H ₂ O	4,15 ml	3,075 ml

1,5 M Tris HCl pH 8,8/ 0,4 % SDS	2,5 ml	
0,5 M Tris HCl/ pH 6,8 / 0,4 % SDS (Upper Gel Stock)		0,625 ml
30 % Acrylamide/0,8 % Bisacryl	3,35 ml	0,750 ml
10 % APS	50 μ l	45 μ l
Temed	5 μ l	5 μ l

Tabelle 4: Laufpuffer

Laufpuffer
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

3.2.9.2.1 Proteintransfer

Das Gel wurde für den semi-dry Proteintransfer auf eine stabilere Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 μ m) von den Glasplatten extrahiert. Dann wurde es in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet: Filterpapier, Gel, Nitrocellulose und Filterpapier in Transferpuffer (siehe Tabelle 5). Die Proteinbanden wurden auf die Nitrocellulosemembran bei 15 Volt für 30 mins transferiert.

Tabelle 5: Transferpuffer

Transferpuffer
25 mM Tris

192 mM Glycin
0,1 % SDS
20 % Methanol (v/v)

3.2.9.2.2 Blocken und Antikörperinkubation

Es wurden die auf der Nitrocellulosemembran transferierten Proteinbanden mit PBS-Tween + 5 % Magermilch für 1h bei RT geblockt, um die Entstehung unspezifischer Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Lösung abgossen und die Membran mit 5 ml PBS-Tween +5 % Magermilch und abhängig vom nachzuweisenden Haushaltgen beziehungsweise der nachzuweisenden Caspase-3 mit primären b-Aktin oder Caspase-3 Antikörper 1:5000 verdünnt bei 4 °C über Nacht auf einem Drehrad geschwenkt. Dann wurde die Membran drei Mal für 5 mins mit PBS-Tween gewaschen, um die überschüssige Magermilch auszuspülen. Daraufhin wurde die Nitrocellulosemembran in 5 ml PBS-Tween + 5 % Magermilch und dem sekundären Antikörper Anti-Mouse POX für das Haushaltgen oder anti-rabbit POX für die Caspase-3 1:5000 verdünnt für 1h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Zum Schluss wurde mit PBS für jeweils 5 mins gewaschen, um überschüssiges PBS-Tween zu entfernen. Alle Arbeitsschritte wurden unter kontinuierlichem Taumeln der Proben durchgeführt.

Nachfolgend erfolgte die Detektion mit Thermo SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat am ChemiDoc (BioRad).

3.2.10 Caspase-Assay

3.2.10.1 Prinzip des CaspaseGlo 3/7-Assays

Der CaspaseGlo 3/7-Assay ist ein Apoptose-sensitiver Assay, der die Aktivität der Caspasen-3/7 in Lumineszenz misst. Diese stellen Effektor-Caspasen dar und sind bei Einleitung des Zelltods unentbehrlich.

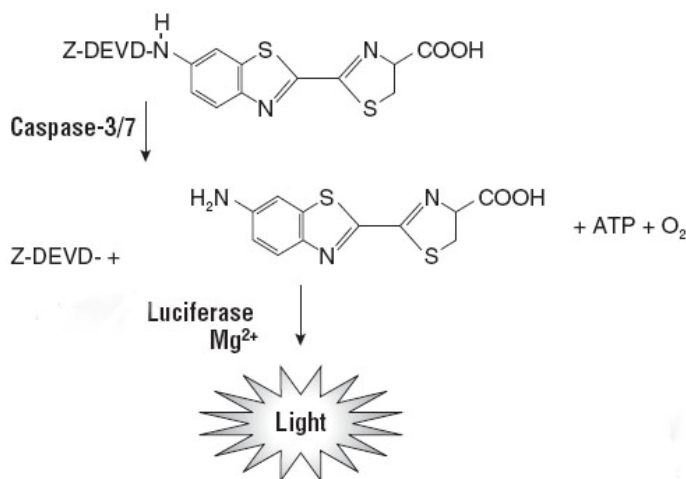


Abbildung 2: schematische Darstellung des Prinzips des Caspase 3/7-Assays (PROMEGA, 2018)

Sobald die Caspasen -3 und -7 nach Induktion des Zelltods exprimiert werden, spalten sie das CaspaseGlo 3/7 Substrat in Aminoluciferin. Bei Anwesenheit von ATP, O₂ und Mg²⁺ dient Aminoluciferin als Substrat für die im Kit enthaltene, thermostabile Luciferase und produziert Licht (Abbildung 2). Die Lumineszenz kann von einem Luminometer detektiert werden und ist proportional zur Caspase-Aktivität. Die maximale Signalstärke wird nach 1h erreicht. Aufgrund der hohen Sensitivität des Assays wurde eine Positiv- und Negativkontrolle vorbereitet. Folglich kann mit diesem Assay der caspase-abhängige Zelltod durch Apoptose ermittelt werden.

3.2.10.2 Vorbereitung und Durchführung

Der Assay wurde in zwei zeitlich voneinander getrennten Schritten durchgeführt: 1. Schritt - Aussäen, Infektion und Kryokonservierung 2. Schritt - Messung.

3.2.10.2.1 Aussäen, Infektion und Kryokonservierung

Zuerst wurden Zellen der Linie U87 auf einer 48-Wells-Mikrotiterplatte im Dreifachansatz mit je 20.000 c/well à 100 µl ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Infektionszeitpunkte so abgestimmt, dass eine Kryokonservierung 4h, 8h und 24h nach Infektion mit 10 cp/c erfolgen konnte.

Der Überstand jeder befüllten Mikrotiterplattenvertiefung wurde in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit je 200 µl PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin pro Vertiefung abgelöst. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂

wurde die Reaktion mit 300 µl Medium gestoppt und der gesamte Inhalt in die Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss wurde erneut mit 100 µl PBS gespült. Nun wurden die Reaktionsgefäße bei 1.000 rpm für 10 mins zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde gründlich mit 100 µl Medium aufgelöst und bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.10.2.2 Messung

Die Volumina in den Eppendorfgefäßen wurden in eine weißwandige Luminometer-kompatible 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Als Negativkontrolle diente Medium und als Zellkontrolle nichtinfizierte Zellen. Es wurden 100 µl CaspaseGlo-Reagenz (1:1 Verhältnis) in jede befüllte Vertiefung pipettiert. Nach einer Lagerung für 1h bei RT im Dunkeln erfolgte die Messung am Perkin Elmer 3000 mit einem vom Labor zur Verfügung gestellten Setting. Zur Vorbereitung des CaspaseGlo-3/7 Reagenz wurde Caspase-Glo-Substrat in CaspaseGlo-3/7 Puffer gelöst und zwischen den Messungen bei 4 °C gelagert.

Die Vorbereitung und Messung erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

3.2.10.2.3 Auswertung

Der Mittelwert der Negativkontrollen wurde von allen Messergebnissen subtrahiert und unter Berechnung der Standardabweichungen und Mittelwerte in einem Balkendiagramm aufgetragen. Die Ergebnisse wurden im fold change dargestellt, indem die einzelnen Werte auf die Zellkontrolle normiert wurden ($\text{fold change} = \text{Wert der Probe} / \text{Zellkontrolle}$). Der fold change der Zellkontrolle wurde mit 1 definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Unterschiede zwischen einer Einzelinfektion und einer Doppelinfektion mit onkolytischen Viren

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die onkolytische Wirksamkeit der OV nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und NDV in Glioblastomzelllinien zu untersuchen und anschließend die zugrunde liegenden Arten des Zelltods zu charakterisieren und diese miteinander zu vergleichen. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über den Projektaufbau.

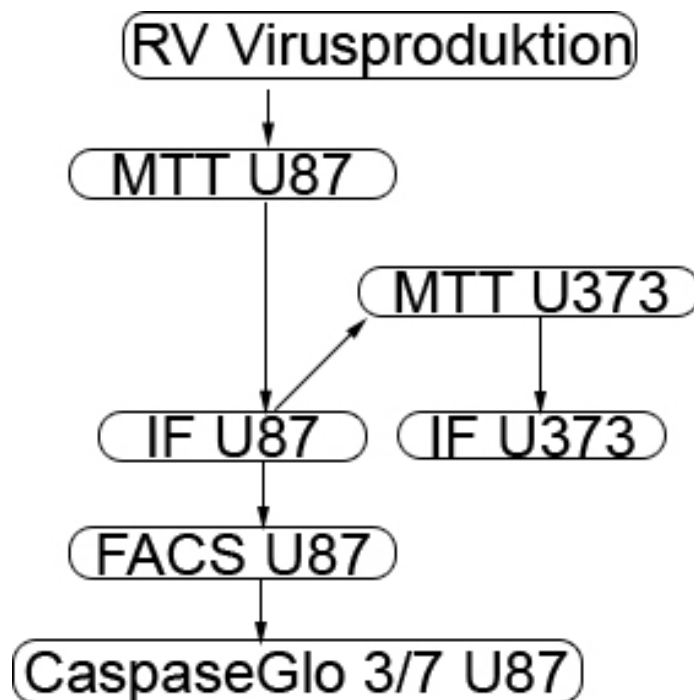


Abbildung 3: Übersicht über die Chronologie und den Zusammenhang der Ergebnisse des Dissertationsprojekts

4.2 Titration und Charakterisierung der produzierten RV-Charge 18.1

Zur Bestimmung des Virustiters der neu produzierten RV-Charge 18.1 wurde eine RT-PCR durchgeführt. Der Vergleich mit der bereits vorhandenen Produktion mit der Chargennummer 17.2 diente der Entscheidungsfindung über die zu verwendende Produktionsreihe für die anschließenden Versuche des Dissertationsprojekts.

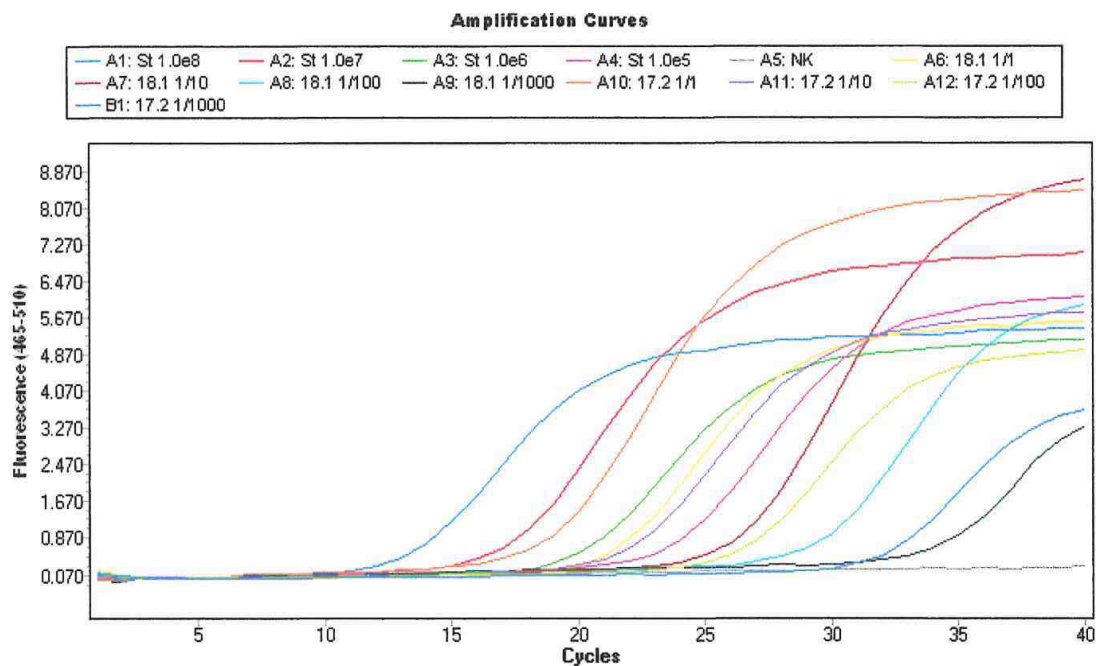


Abbildung 4: Ermittelte Titrationskurven der Standardproben, der neu produzierten RV-Probe 18.1 und der bekannten RV-Probe 17.2 mittels RT-PCR. Darstellung der Fluoreszenzintensität (y-Achse) mit zunehmender Zyklenzahl (x-Achse) für die Standards (A1-A4), die Negativkontrolle (A5), die unverdünnten (A6) sowie die 1:10 (A7), 1:100 (A8) und 1:1000 (A9) verdünnten RV 18.1-Proben und unverdünnten (A10), 1:10 (A11), 1:100 (A12) und 1:1000 (B1) verdünnten 17.1-Proben.

Die beiden Virus-Chargen wurden unverdünnt und in den Verdünnungsverhältnissen 1:10, 1:100 und 1:1000 untersucht. Als Referenz dienten eine Negativkontrolle aus Medium und vier Standardproben mit vorbekanntem Titer (10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Genomkopien pro μl). Der LightCycler detektierte die von den Taqman-Sonden emittierte Fluoreszenz. Die Software berechnete aus den Daten Amplifikationskurven, siehe Abbildung 4. In A1 bis A4 sind die Titrationskurven der bekannten Standardproben aufgetragen, A5 stellt die Negativkontrolle dar. Letztere besitzt einen weitgehend horizontalen Verlauf. A6 bis A9 zeigen die Titrationskurven der neuen Virusproduktion und A10 bis B1 die Titrationskurven der vorbekannten Virus-Charge RV 17.2 jeweils in den Titern 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 Genomkopien pro μl dar. Die Kurven A1 bis A12 und B1 besitzen einen triphasischen Verlauf, der sich in eine lineare Phase, eine Exponential-Phase und eine Plateau-Phase einteilen lässt. In der ersten Phase der Kurven lag die gemessene Fluoreszenz als Maß des Virustiters bei 0,07. Mit Zunahme der Amplifikationszyklen nahm die detektierte Fluoreszenz exponentiell zu. Bei niedrigeren Viruskonzentrationen war für einen exponentiellen Anstieg eine höhere Anzahl an

Amplifikationszyklen erforderlich. Die Plateau-Phase wurde nach 23 bis 40 Zyklen erreicht. Ab einer Virusverdünnung von 1:1000 nahm die Fluoreszenz in allen drei Phasen der RT-PCR deutlich niedrigere Werte an.

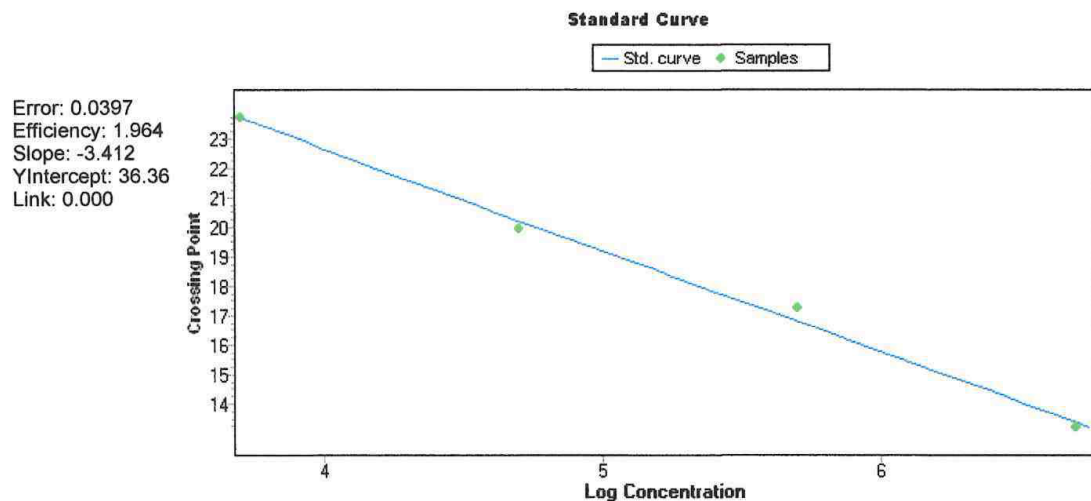


Abbildung 5: Ermittelte Standardkurve aus den mitgeführten Standardproben der RT-PCR. Darstellung der ermittelten CP-Werte (Crossing-Point) der Standardproben gegen die logarithmischen Konzentrationen. Der CP-Wert definiert die Zyklenzahl, bei der die exponentielle Phase der PCR-Amplifikation der Proben erreicht wird. Aus der daraus entstandenen Regressionsgerade können die Konzentrationen der untersuchten RV-Proben ermittelt werden. Die Fehlerrate beträgt 0,0397, eine PCR-Effizienz von 1,964, eine berechnete Geradensteigung von -3,412 und den Schnittpunkt mit der Y-Achse bei 36,36.

Durch die mitgeführten Standards mit bekanntem Titer konnte mit der Computer-Software die Standardkurve in Abbildung 5 erstellt werden. Über die gemessenen Fluoreszenzen konnten so Rückschlüsse auf die Konzentrationen der verwendeten RV-Produktionschargen gezogen werden. Der CP-Wert (Crossing Point) entspricht dem Fluoreszenzsignalwert, bei dem die exponentielle Phase der RT-PCR beginnt. Abbildung 5 zeigt die entstandene Regressionsgerade, auf der die logarithmischen Werte der Viruskonzentration (Log Concentration) aufgetragen sind. Eine höhere Viruskonzentration ging mit niedrigeren CP-Werten einher, welches Kennzeichen für einen früheren Beginn der exponentiellen Phase der RT-PCR war. Alle ermittelten Probenkonzentrationen befanden sich innerhalb der Titrationskurven der Standardproben, welches wichtig für die präzise Bestimmung der Konzentration der produzierten RV-Charge war.

Tabelle 6: Ermittelte Probenkonzentration durch die RT-PCR. Dargestellt werden die Amplifikationskurven (A1-A8), der Probenname, die jeweiligen ermittelten CP-Werte (Crossing Point) und ermittelte Konzentration (cp/ μ l).

Amplifikationskurve	Probe	Crossing Point (CP)	Ermittelte Konzentration (cp/ μ l)
A1	Standard 5×10^6	13,23	$5,63 \times 10^6$
A2	Standard 5×10^5	17,25	$3,72 \times 10^5$
A3	Standard 5×10^4	19,96	$5,97 \times 10^4$
A4	Standard 5×10^3	23,74	$5,00 \times 10^3$
A5	Negativkontrolle	-	-
A6	RV 18.1 1/1	21,19	$2,64 \times 10^4$
A7	RV 18.1 1/10	26,51	$8,93 \times 10^2$
A8	RV 18.1 1/100	29,64	$1,39 \times 10^2$
A9	RV 18.1 1/1000	34,27	$1,06 \times 10^1$
A10	RV 17.2 1/1	19,06	$1,10 \times 10^5$
A11	RV 17.2 1/10	21,98	$1,57 \times 10^4$
A12	RV 17.2 1/100	26,27	$1,03 \times 10^3$
B1	RV 17.2 1/1000	31,76	$4,15 \times 10^1$

Eine Zusammenstellung der CP-Werte ist in Tabelle 6 zu finden. Die CP-Werte der vier Standardproben A1 bis A4 lagen zwischen 13,23 und 23,74. Mit Zunahme der Standardkonzentrationen wurden niedrigere CP-Werte ermittelt. Die gemessenen Konzentrationen der Standardproben betragen für A1 $5,63 \times 10^6$ cp/ μ l, für A2 $3,72 \times 10^5$ cp/ μ l, für A3 $5,97 \times 10^4$ cp/ μ l und A4 $5,00 \times 10^3$ cp/ μ l und wichen von den tatsächlichen Konzentrationen ab. Für die Amplifikationskurve A, der Negativkontrolle, wurde kein CP-Wert ermittelt, was darauf schließen lässt, dass die Negativkontrolle tatsächlich DNA-frei und nicht mit Virus kontaminiert war.

Die Amplifikationskurven A6 bis A9 stellen die PCR-Ergebnisse der verschiedenen getesteten Viruskonzentrationen der neuen RV-Charge 18.1 dar. Hier zeigte sich mit Zunahme der Viruskonzentration eine Abnahme der CP-Werte. Bei der unverdünnten RV-Charge 18.1 wurde ein CP-Wert von 21,19 bei einer Konzentration von $2,64 \times 10^4$ cp/ μ l ermittelt. Die 1:10-Verdünnung ergab eine Konzentration von $8,93 \times 10^2$ cp/ μ l bei einem CP-Wert von 26,51. Die gemessene Anzahl der Genomkopien unterschied sich um den Faktor 100. Die anschließenden 1:100- und 1:1000-Verdünnungen nahmen CP-Werte von 29,64 und 34,27 bei $1,39 \times 10^2$ und $1,06 \times 10$ cp/ μ l ein.

Die Amplifikationskurven A10 bis B1 zeigen die PCR-Ergebnisse der RV-Produktion 17.2 in den bekannten Verdünnungen. Die unverdünnte Virusprobe ergab einen CP-Wert von 19,06 bei $1,10 \times 10^5$ cp/ μ l. Die anschließenden 1:10 und 1:100 Verdünnungen ergaben CP-Werte von 21,98 und 26,27 mit $1,57 \times 10^4$ und $1,03 \times 10^3$ cp/ μ l. Eine Verdünnung um den Faktor 10 ergab auch eine gemessene Konzentrationsenkung um den Faktor 10. Die 1:1000-Verdünnung der 17.2-Charge ergab einen CP-Wert von 31,76 bei einer ermittelten Konzentration von $4,15 \times 10$ cp/ μ l. Bei der Verdünnung der Virus-Charge 17.2 um einen Verdünnungsfaktor von 10 von 1:100 auf 1:1000 wurde ein Konzentrationsunterschied um den Faktor 100 gemessen.

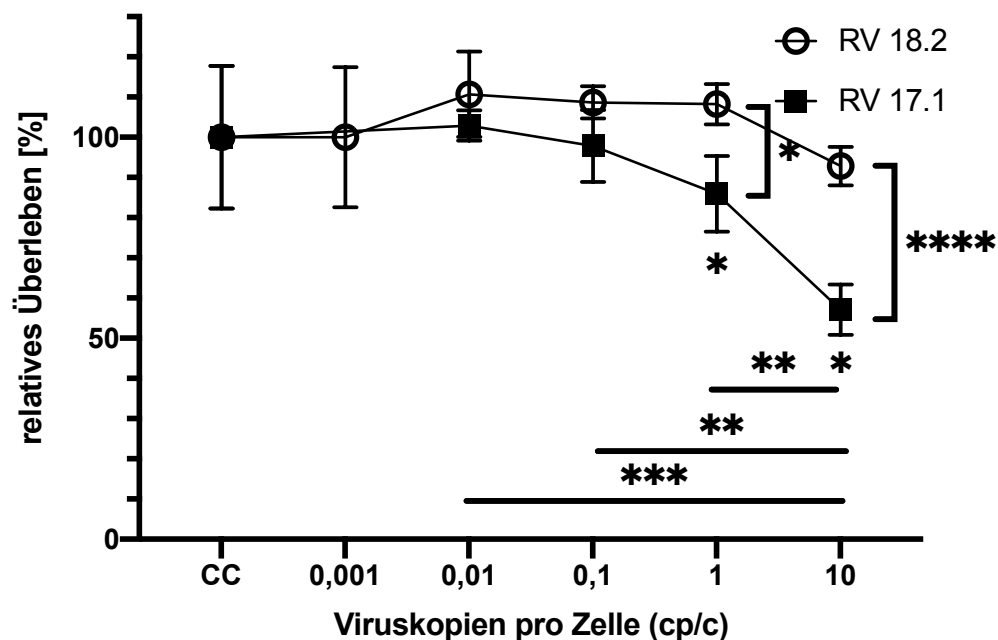


Abbildung 6: Vergleich des relativen Überlebens der U87-Glioblastomzelllinie 72h nach einer Infektion mit RV 18.1 und RV 17.2. Dargestellt wird der Anteil lebender U87-Zellen 72h

nach einer Infektion mit der neu produzierten RV-Probe 18.1 und RV 17.2 in steigenden Konzentrationen von 1/1000 cp/c bis 10 cp/c relativ zur nicht infizierten Zellkontrolle. Die ermittelten Werte setzen sich aus den Mittelwerten der Einzelwerte zusammen (n=6). Die Standardabweichungen werden zur Darstellung des mittleren Fehlers der Mittelwerte mitgeführt. Varianzanalyse *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Die RT-PCR ermöglichte den quantitativen Virusgenom-Nachweis der RV-Produktion. Um auch die zytotoxische Wirkung der neu produzierten Virus-Charge 18.1 zu überprüfen, wurde der Einfluss der Virusinfektion auf die Viabilität der Glioblastomaffenzelllinie U87 mit einem MTT-Assay gemessen. Zum Vergleich diente ein MTT-Assay der RV-Charge 17.2. Die Ergebnisse des MTT-Assays beider Virusproduktionen 72h nach Infektion sind in Abbildung 6 dargestellt. Sie zeigen, dass bei der RV-Produktion 18.1 ein nennenswerter zytotoxischer Effekt auf die U87-Tumorzellen ausblieb. Bei der 1/100 cp/c und 1 cp/c Viruskonzentration wurde eine Zunahme der Zellzahl beobachtet. Lediglich bei einer Infektion mit 10 cp/c war eine Abnahme der Zellzahl um ~7,2 % zu verzeichnen. Die Standardabweichungen (SD) der Zellkontrolle betrug $\pm 16,2$ % und bei den verschiedenen Virustitern je $\pm 3,6$ % und $\pm 15,9$ %.

In den Ergebnissen der RV-Produktion 17.2 wurden für die 1/1000 bis 1/10 cp/c Viruskonzentrationen keine nennenswerten Einflüsse auf das relative Überleben der Tumorzellen beobachtet. Die Differenz betrug für beide Konzentrationen lediglich ± 2 % mit Standardabweichungen von $\pm 3,4$ und $\pm 8,1$. Ab einer 1 cp/c Konzentration war eine Reduktion der Zellanzahl auf ~86 % im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Bei einer 10 cp/c Konzentration ließ sich eine deutliche Reduktion auf 57 % messen. Die Standardabweichung für die beiden Konzentrationen betrug $\pm 8,6$ % und $\pm 5,7$ %. Der direkte Vergleich der beiden Virus-Chargen zeigt, dass RV 18.1 einen schwächeren zytotoxischen Effekt hatte. Den stärksten Einfluss auf das Zellsterben besaß die RV-Charge 18.1 bei einer Infektion mit 10 cp/c mit einer Abnahme der Zellanzahl um 7,1 %. Vor dem Hintergrund der Differenz zwischen der gemessenen und gewünschten Konzentration der RV 18.1 Charge wurden die folgenden Experimente mit der RV-Charge 17.2 und im Verlauf mit 18.3 und 18.4 mit bereits bekanntem Virustiter durchgeführt.

4.3 Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve und Identifikation der optimalen Konzentrationen 72h nach basaler OV-Infektion von U87 und U373

Der MTT-Assay wurde mit den OV RV, PV und NDV nach Einzel- und Doppelinfektionen der Glioblastomzelllinien U87 und U373 durchgeführt, um optimale Viruskonzentrationen für die Folgeversuche und eine Dosis-Wirkungskurve zu ermitteln. Es wurden die Virus-Chargen RV 18.3, PV 17.1 und NDV 15.1 für die Einzelinfektionen verwendet und für die NDV-Doppelinfektionen die Produktionsreihe 14.3. Die Messung erfolgte 72h nach Infektion der Zellen mit 1 cp/c und 100 cp/c.

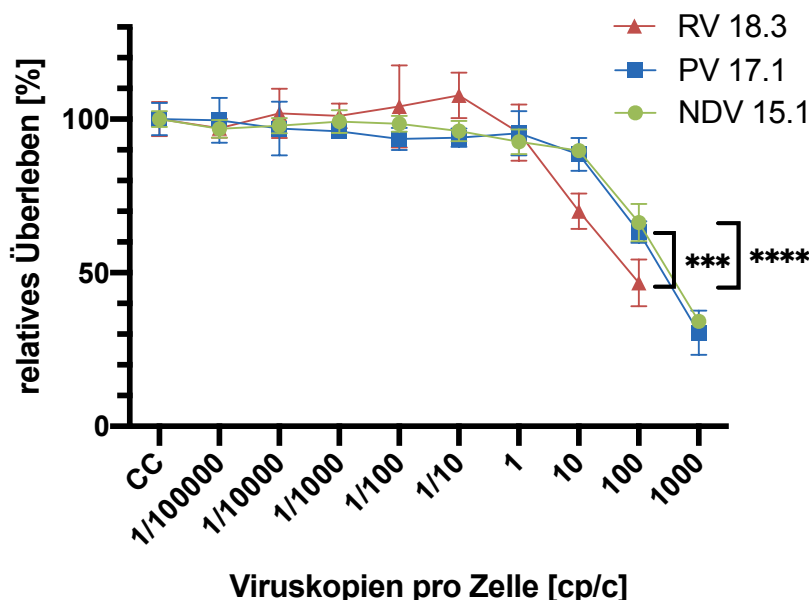


Abbildung 7: Vergleich des relativen Überlebens der U87-Glioblastomzelllinie 72h nach einer Infektion mit RV 18.3, PV 17.1 und NDV 15.1. Dargestellt wird der Anteil lebender U87-Zellen 72h nach einer Infektion mit der neu produzierten RV-Probe 18.3, den PV-Proben 17.1 und NDV-Proben 15.1 in steigenden Konzentrationen von 1/1000 cp/c bis 10 cp/c relativ zur nicht infizierten Zellkontrolle. Die ermittelten Werte setzen sich aus den Mittelwerten der n=6 Einzelwerte. Die Standardabweichungen sind dargestellt. Varianzanalyse *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Die Ergebnisse der Einzelinfektion der U87 sind in Abbildung 7 in einem Kurvendiagramm veranschaulicht. Dem Graphen ist ein biphasischer Verlauf zu entnehmen. Nach Infektion mit den Viruskonzentrationen zwischen 1/100000 bis 1 cp/c waren fast 100 % der Zellen vital. Maximal 4,35 % der mit RV 1 cp/c infizierten Zellen starben (SD ±8,35 %). Nach Infektion mit den Viruskonzentrationen zwischen 1/10000 und 1/10 cp/c stieg der Anteil lebender Zellen

auf über 100 % an. Die Standardabweichung für diese Konzentrationen bewegte sich in einem Wertebereich zwischen $\pm 3,65$ % und $\pm 12,2$ %. Nach PV-Infektion war eine maximale Reduktion der Zellanzahl um 6,4 % bei einem Virustiter von 1/100 cp/c und einer SD von $\pm 3,3$ % zu verzeichnen. Nach NDV-Infektion ließ sich ein onkolytischer Effekt auf die U87-Zellen ab einem Virustiter von 1 cp/c mit einem Zellsterben um 7,3 % und einer SD von $\pm 3,7$ % nachweisen. Mit zunehmender Viruskonzentration nahm auch der onkolytische Effekt der drei Viren zu. Ab einer RV-Konzentration von 10 cp/c sank der Anteil lebender Zellen auf 70 % (SD $\pm 5,2$ %). Bei einer höheren 100 cp/c Konzentration ging der Anteil weiter zurück auf 46,7 % lebende Zellen (SD $\pm 6,95$ %). Dieser Effekt war statistisch signifikant stärker als die Einzelinfektionen mit PV und NDV (p-Wert $< 0,001$). Die Infektion der U87 mit 10 cp/c PV zeigte einen Abfall der relativen Zellzahl auf 88,5 % (SD $\pm 4,85$ %). Auch in den höheren Konzentrationen 100 cp/c und 1000 cp/c sank die Rate der lebenden Zellen von 63,2 % (SD $\pm 3,2$ %) auf 30,5 % (SD $\pm 6,6$ %). Es zeigte sich, dass PV- und NDV- Einzelinfektionen in der höchsten verwendeten Konzentration 1000 cp/c nach 72h auch den stärksten zytotoxischen Effekt besaßen. Die Kurvenverläufe der MTT-Assays der PV- und NDV-Einzelinfektionen ähnelten einander. Die Rate überlebender Zellen nach Infektion mit 10 cp/c NDV sank auf 89,8 % (SD ± 2 %). Nach Infektion mit 100 cp/c überlebten 66,4 % der Zellen (SD $\pm 5,6$ %). Dieser Anteil halbierte sich nahezu bei einem höheren Virustiter von 1000 cp/c auf 34,1 % überlebende Zellen (SD $\pm 1,65$ %).

Im Vergleich der Virusinfektionen mit 100 cp/c untereinander besaß die RV-Infektion mit einer Differenz von mindestens 16,5 % den stärksten zytotoxischen Effekt unter allen Einzelinfektionen. Erst Infektionen mit höheren PV- und NDV-Titern wiesen mit einer Abnahme der Zellzahl um mehr als 10 % einen stärkeren onkolytischen Effekt auf.

Die Ergebnisse der Einzelinfektion von U87 zeigten, dass der zytotoxische Effekt der drei Viren ab einer Infektion mit einer Viruskonzentration von 1 cp/c bereits nachweisbar und ab einer Konzentration von 100 cp/c besonders ausgeprägt war. Im Folgenden wurden die Versuche für eine höhere Repräsentativität (n=3) mit diesen Infektionstitern wiederholt.

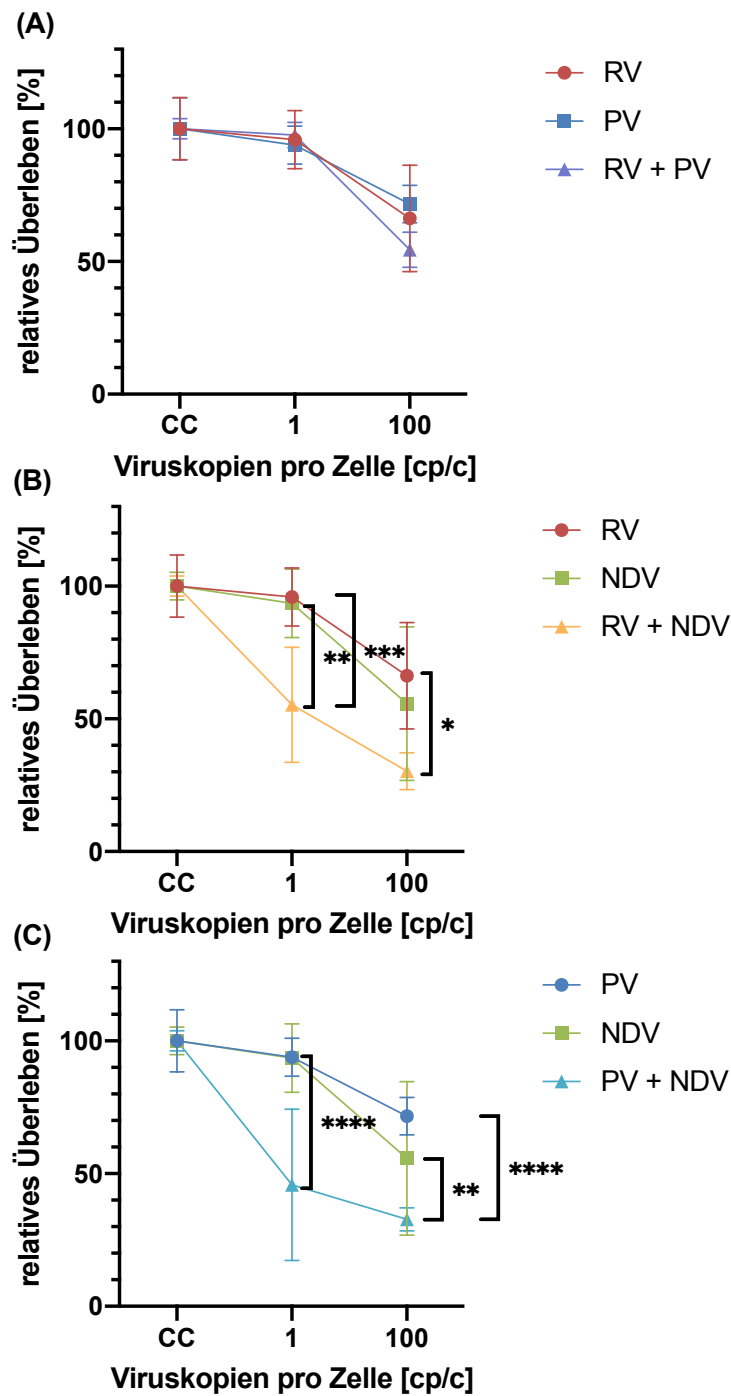


Abbildung 8: Relatives Überleben von U87-Glioblastomzellen 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV, RV + PV, (B), RV, NDV, RV + NDV und (C) PV, NDV, PV + NDV. Die Infektion erfolgte mit 1 cp/c und 100 cp/c. Die Ermittlung der Werte erfolgte relativ zur nicht infizierten Zellkontrolle und setzen sich aus n=18 Einzelwerten aus 3

Versuchsansätzen zusammen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Eine Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Standardabweichungen werden mitangegeben. Kruskal-Wallis-Test * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die Ergebnisse der RV- und PV- Einzel- und Doppelinfektionen sind in Abbildung 8A dargestellt. Die Kurven zeigen sowohl nach Einzel- als auch nach Doppelinfektion in steigender Viruskonzentration eine Abnahme des Zellüberlebens. Eine ausgeprägte Tumorzelllyse war erst nach Einzelinfektion mit 100 cp/c zu erkennen. RVs besaßen eine ausgeprägtere onkolytische Wirksamkeit als PVs. Eine Doppelinfektion in gleicher Viruskonzentration war zytotoxischer als die Einzelinfektion mit dem jeweiligen Virus. Es zeigte sich demnach ein stärkerer onkolytischer Effekt nach Doppelinfektion, der bei hier vorliegender Normalverteilung in der Varianzanalyse bei 100 cp/c statistisch signifikant war (p-Wert (RV + PV vs. RV) = 0,0235, p-Wert (RV + PV vs. PV) = 0,0001). Die Infektionen mit 1 cp/c induzierten ein gleichwertiges Zellsterben. Dennoch überlebten fast alle Zellen mit einem maximalen Zellsterben von 6,1 % und einer maximalen Standardabweichung von $\pm 13,0$ %. Die Doppelinfektion mit RV und PV mit 100 cp/c erzielte einen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelinfektionen (RV: 66,2 %, SD ± 20 %; PV: PV 100 cp/c 71,7 %, SD $\pm 7,1$ %) stärkeren onkolytischen Effekt (54,4 %, SD $\pm 6,7$ %). Die NDV-Einzelinfektion wies die höchste Zytotoxizität auf. Darauf folgte die RV-Einzelinfektion. Die PV-Einzelinfektion wies den geringsten zytotoxischen Effekt auf.

In Abbildung 8B werden die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektionen von RV und NDV einander gegenübergestellt. Dieser ist ein insgesamt stärkerer zytotoxischer Effekt der Viren nach Doppel- als nach Einzelinfektion zu entnehmen. Bereits bei einem Virustiter von 1 cp/c überlebten nur noch 55,3 % der Zellen (SD $\pm 21,7$ %). Damit starben mit 40 % signifikant mehr U87 Zellen als nach NDV- (p-Wert = 0,0018) und RV-Einzelinfektion (p-Wert = 0,001) in gleicher Viruskonzentration. Nach NDV-Einzelinfektion mit 100 cp/c überlebten 55,7 % der Tumorzellen (SD $\pm 28,9$ %). Im Vergleich überlebten 66,2 % nach RV-Einzelinfektion (SD ± 20 %), welches einer absoluten Differenz von 10,5 % entspricht. Nach Doppelinfektion mit gleicher Viruskonzentration überlebten im Vergleich zu den RV- und NDV-Einzelinfektionen mit 30,2 % halb so viele Tumorzellen (SD $\pm 6,9$ %). Nach Doppelinfektion von RV mit NDV bei 1 cp/c war das Zellsterben fast genauso ausgeprägt wie nach NDV-Einzelinfektion mit 100 cp/c. Die synergistische Tumorzytotoxizität durch die Kombination zweier Viren war für jede Viruskonzentration signifikant höher als eine RV-Einzelinfektion (p-Wert mindestens $< 0,05$). Ein signifikant erhöhtes Zellsterben nach Doppelinfektion gegenüber der NDV-

Einzelinfektion konnte bei einer Viruskonzentration von 1 cp/c nachgewiesen werden (p-Wert = 0,0018). Zwar war die Doppelinfektion mit RV und NDV auch bei 100 cp/c am stärksten, jedoch war dies nicht signifikant gegenüber einer NDV-Einzelinfektion in gleicher Viruskonzentration.

Abbildung 8C vergleicht die Ergebnisse der PV und NDV Einzel- und Doppelinfektion miteinander. Nach Doppelinfektion starben mehr Zellen als nach Einzelinfektion. Bei einer Infektion mit 1 cp/c überlebten 45,8 % der Zellen (SD \pm 28,6 %). Im Vergleich überlebten nach RV- und PV-Einzelinfektionen mit 1 cp/c noch mindestens 93,6 % der Tumorzellen. Dies entsprach einem Unterschied von 47,8 % zur Doppelinfektion mit PV und NDV und war statistisch signifikant (p-Wert = 0,0001). Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch nach Infektion der U87 Zellen mit 100 cp/c ab. Hier überlebten nach Doppelinfektion mit PV und NDV mit 32,7 % (SD \pm 4,3 %) der niedrigste Anteil an U87 Zellen. Nach NDV-Einzelinfektion überlebten 55,7 % (SD \pm 28,9 %) und nach PV-Einzelinfektion 71,7 % (SD \pm 7,1 %) der Tumorzellen. Die onkolytische Wirksamkeit der Doppelinfektion war signifikant höher als die der PV-Einzelinfektion (p-Wert < 0,0001).

Die Ergebnisse des MTT nach Doppelinfektionen von RV mit NDV und PV mit NDV zeigten synergistische und stärkere onkolytische Effekte in allen verwendeten Viruskonzentrationen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelinfektionen. Bei einer Infektionstiter von 1 cp/c war dies auch stets signifikant (p-Wert \leq 0,0018). Darüber hinaus war die kombinatorische Gabe von RV mit NDV in allen Fällen zwar stärker als die Kombination aus PV mit NDV, jedoch war dies nicht statistisch signifikant. Die Differenz betrug 9,5 % bei 1 cp/c und 2,5 % bei 100 cp/c. Eine Doppelinfektion mit RV und PV war am schwächsten. Eine statistisch signifikant erhöhte Wirksamkeit der RV- und NDV-Doppelinfektion gegenüber der RV- und PV-Doppelinfektion konnte nach Infektion mit 1 cp/c nachgewiesen werden (p-Wert = 0,0014).

Im nächsten Schritt wurde der MTT-Assay mit einer weiteren humanen U373 Glioblastomzelllinie und einer zusätzlich mitgeführten Viruskonzentration 50 cp/c durchgeführt. Die Ergebnisse des MTT-Assay wurden auf eine potenzielle Zellspezifität geprüft.

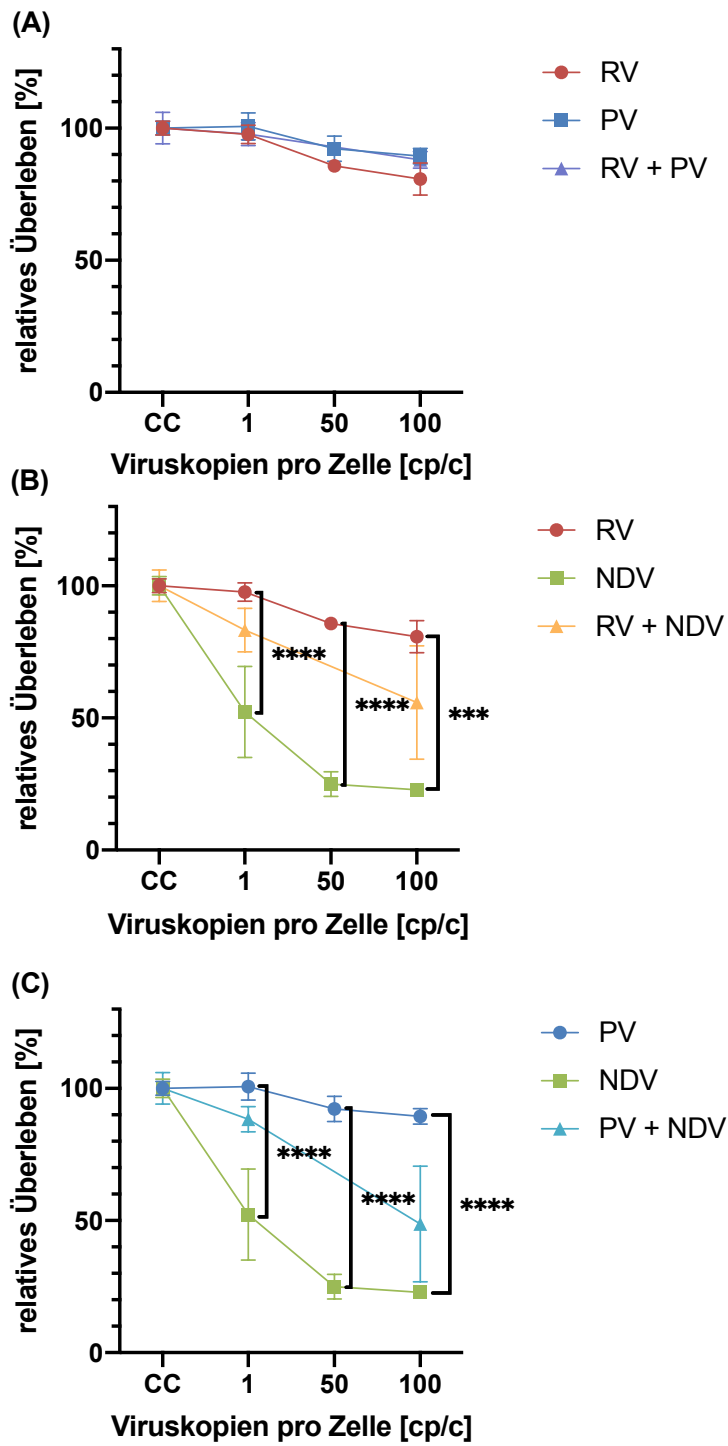


Abbildung 9: Relatives Überleben von U373-Glioblastomzellen 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV, RV + PV, (B), RV, NDV, RV + NDV und (C) PV, NDV, PV

+ **NDV**. Die Infektion erfolgte mit 1 cp/c und 100 cp/c. Die Ermittlung der Werte erfolgte relativ zur nicht infizierten Zellkontrolle und setzen sich aus n=18 Einzelwerten aus 3 Versuchsansätzen zusammen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Eine Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Standardabweichungen werden mitangegeben. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

In Abbildung 9A werden die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektionen mit RV und PV dargestellt. Der Doppelinfektion war kein synergistischer onkolytischer Effekt zu entnehmen.

Nach Doppelinfektion von RV mit PV war ein geringfügiges Zellsterben mit einem relativen Überleben von 97,8 % bei 1 cp/c und 88 % bei 100 cp/c zu beobachten. Dieser Effekt war jedoch auch bei steigendem PV-Infektionstiter mit über 90 % lebenden Zellen schwach ausgeprägt.

Nach RV-Einzelinfektion mit 1 cp/c zeichnete sich ein geringer onkolytischer Effekt ab, da mit 97,6 % (SD \pm 3,5 %) fast alle Tumorzellen überlebten. Die Rate überlebender U373 Zellen pendelte sich auf einen Wertebereich zwischen 85,8 % bei 50 cp/c (SD \pm 2,3 %) bis 82,6 % (SD \pm 9,6 %) bei 100 cp/c ein. Es zeigte sich weiterhin eine konzentrationsabhängige onkolytische Wirksamkeit. Nach RV-Einzelinfektion mit 50 cp/c war der prozentuale Zuwachs an Zellsterben ausgehend von den Werten der Virusinfektion mit 1 cp/c höher (-11,8 %), als zwischen 50 cp/c und 100 cp/c, dort betrug die Differenz 3,2 %.

Nach NDV-Einzelinfektion von U373 mit allen verwendeten Viruskonzentrationen (Abbildung 9B) starben signifikant mehr Zellen als nach RV-Einzelinfektion (p-Wert < 0,001). Bereits bei 1 cp/c starb fast die Hälfte der Tumorzellen (47,8 %, SD \pm 17,2 %). Mit höherer Konzentration (50 cp/c) sank der prozentuale Anteil lebender Zellen um die Hälfte auf 25 % (SD \pm 4,7 %) ab. Nach NDV-Infektion mit 100 cp/c war die Überlebensrate der U373 mit 22,8 % (SD \pm 1,8 %) geringfügig niedriger als nach Infektion mit 50 cp/c. Die Dosis-Wirkungskurve nahm ab 50 cp/c einen asymptotischen Verlauf an. Der onkolytische Effekt der Doppelinfektion mit RV und NDV war in jeder Viruskonzentration stärker als nach RV-Einzelinfektion. In der niedrigen 1 cp/c Konzentration starben mit einer Differenz von 14,3 % mehr Zellen als nach RV-Einzelinfektion, allerdings war dies nicht signifikant (p-Wert = 0,1857). Bei 100 cp/c überlebten 55,8 % der Zellen und damit 22,6 % weniger als nach RV-Einzelinfektion (82,6 %, SD \pm 9,6 %). Die Ergebnisse der Doppelinfektion mit 100 cp/c wiesen eine hohe Standardabweichung von \pm 21,5 % auf. Im Vergleich starben nach NDV-Einzelinfektion mehr Zellen als nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV und PV.

In Abbildung 9C sind die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektionen mit PV und NDV dargestellt. Ihr ist zu entnehmen, dass der onkolytische Effekt einer Doppelinfektion mit PV und NDV in allen Konzentrationen stärker war als nach PV-Einzelninfektion, jedoch war dies nicht statistisch signifikant (p -Wert $> 0,05$). Bei Doppelinfektion mit 1 cp/c überlebten 88,4 % (SD $\pm 4,8$ %) und mit 100 cp/c 48,6 % der U373 Zellen. Bei letzterer war eine hohe Standardabweichung von 21,9 % zu verzeichnen. Die NDV-Einzelninfektion mit allen Virus-konzentrationen war signifikant stärker als die PV-Einzelninfektion (p -Wert $< 0,0001$).

Im Vergleich erwies sich die RV- und NDV-Doppelinfektion von U373 mit 1 cp/c als zytotoxischer und somit effektiver als die PV- und NDV-Doppelinfektion. Diese Annahme ändert sich bei einer Infektion mit 100 cp/c, da die PV- und NDV-Doppelinfektion ein größeres Zellsterben verursachte als die RV- und NDV-Doppelinfektion.

Die MTT-Ergebnisse nach Infektion der Zelllinien U87 und U373 unterschieden sich. Während eine Doppelinfektion mit RV und PV ein ähnliches Zellsterben auch bei U373 verursachte, ließ sich nach NDV-Einzelninfektion ein stärkeres Zellsterben beobachten als nach Doppelinfektion. Sobald eine kombinierte Gabe mit NDV erfolgte, starben mehr Tumorzellen als nach jeweiliger RV- und PV- Einzelninfektion. Weiterhin zeigte sich, dass die onkolytische Wirksamkeit einer NDV-Einzelninfektion von U373 höher war als eine kombinierte Gabe von RV mit PV und eine RV- und PV-Einzelninfektion.

In den folgenden Versuchen wurde die Zelltodinduktion nach OV-Infektion aus weiteren Perspektiven untersucht, um Zellsterben fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können und die zugrundeliegende Art des Zelltods zu charakterisieren.

4.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Zelltodinduktion nach OV-Infektion von U87 und U373

Da der MTT-Assay lediglich Aussagen über den Einfluss einer OV-Infektion auf die Stoffwechselaktivität der Zellen erlaubte, wurden OV infizierte Zellen mit Fluoreszenz angefärbt, um die Zelltodeinleitung beziehungsweise das Zellsterben durch OV unter dem Mikroskop nachzuweisen und zu charakterisieren. Die Färbung der Tumorzellen durch die Nukleinsäureeinterkalatoren Hoechst 33342 und Propidiumiodid ermöglichte den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis und die Identifizierung von Zellen in der späten Apoptose- und Nekrosephase 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfection und die Differenzierung dieser von lebenden Zellen.

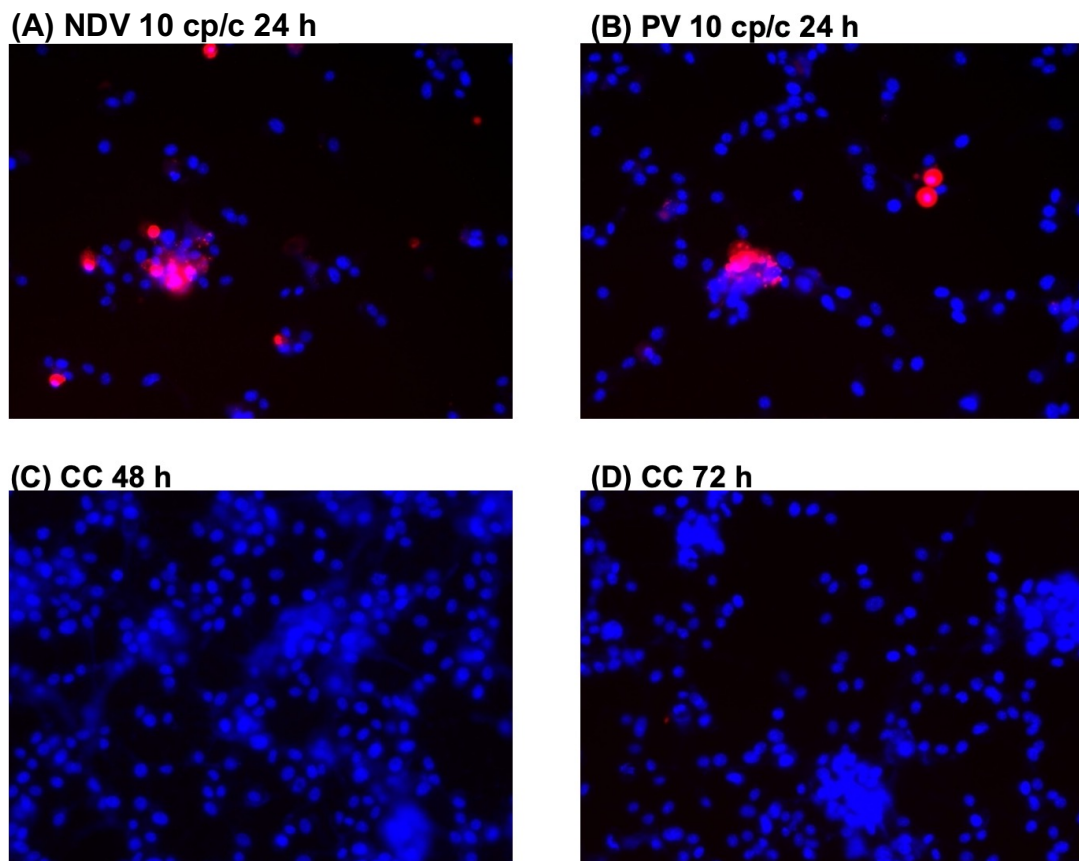


Abbildung 10: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse 24h, 48h und 72h nach OV-Infektion von U87. Dargestellt sind repräsentative Overlay-Bilder der Immunfluoreszenz nach Einzelinfektion mit (A) NDV 10 cp/c 24h, (B) PV 10 cp/c 24h, (C) nicht infizierte Zellkontrolle 48h und (D) nicht infizierte Zellkontrolle 72h. Hoechst diente zur Darstellung der Zellkerne aller

Zellen und PI der Darstellung sterbender Zellen mit nicht intakter Zellmembran. Vergrößerung: 10x, PI = rot. Hoechst = blau.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 10A-D zeigen eine deutliche Neigung der U87 zur Verklumpung, die die quantitative Auswertung erschwerte. Daher wurden die Einzelinfektion mit der Glioblastomzelllinie U373 durchgeführt (Abbildung 11A-D).

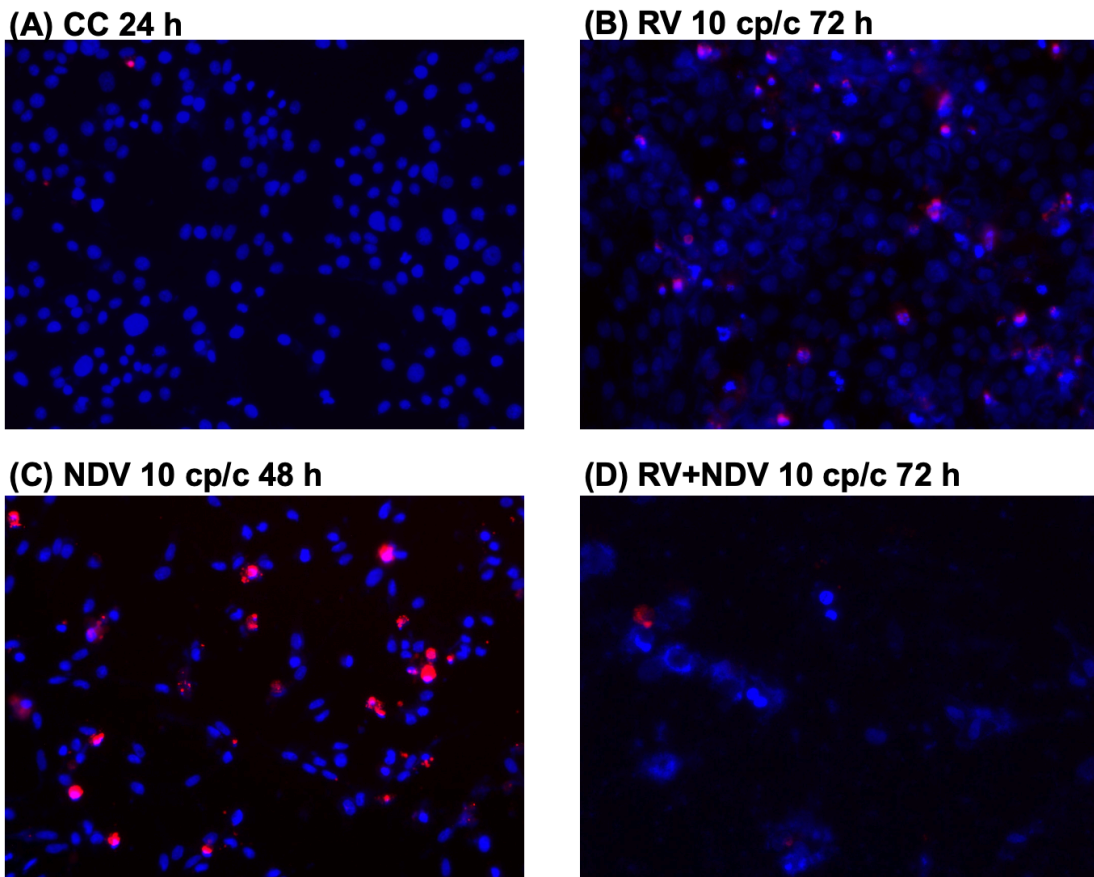


Abbildung 11: Immunhistologische Fluoreszenzanalyse 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion von U373. Dargestellt sind repräsentative Overlay-Bilder der Immunfluoreszenz nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) nicht infizierte Zellkontrolle 24h, (B) RV 10 cp/c 72h, (C) NDV 10 cp/c 48h und (D) RV+NDV 10 cp/c 72h. Hoechst diente zur Darstellung der Zellkerne aller Zellen und PI der Darstellung sterbender Zellen mit nicht intakter Zellmembran. Vergrößerung: 10x, PI = rot. Hoechst = blau.

In den Abbildungen 12 und 13 sind die Auswertungen der Immunfluoreszenz 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV und PV in zunehmender Viruskonzentration (1 cp/c und 10 cp/c) dargestellt.

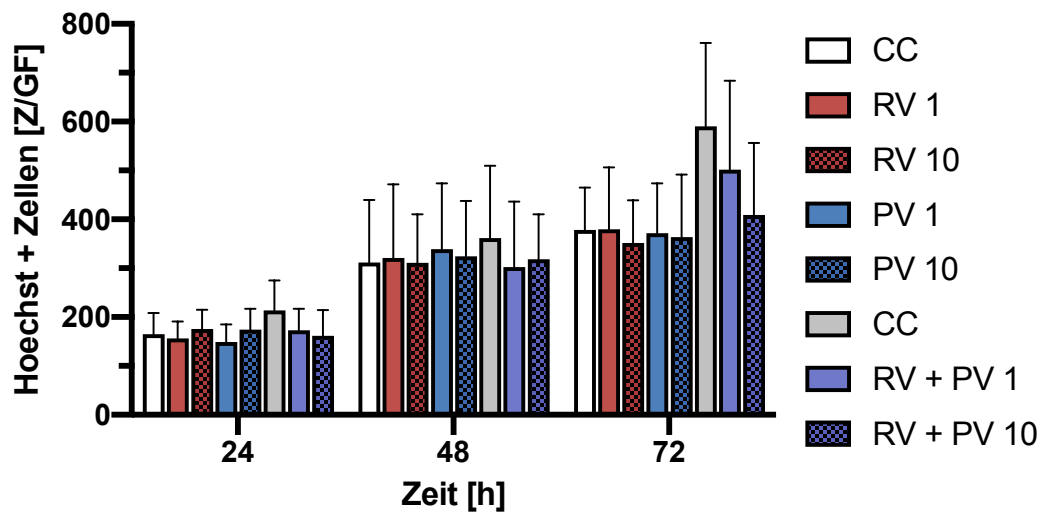


Abbildung 12: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfection mit RV, PV und RV + PV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen. Die Standardabweichungen sind mitangegeben.

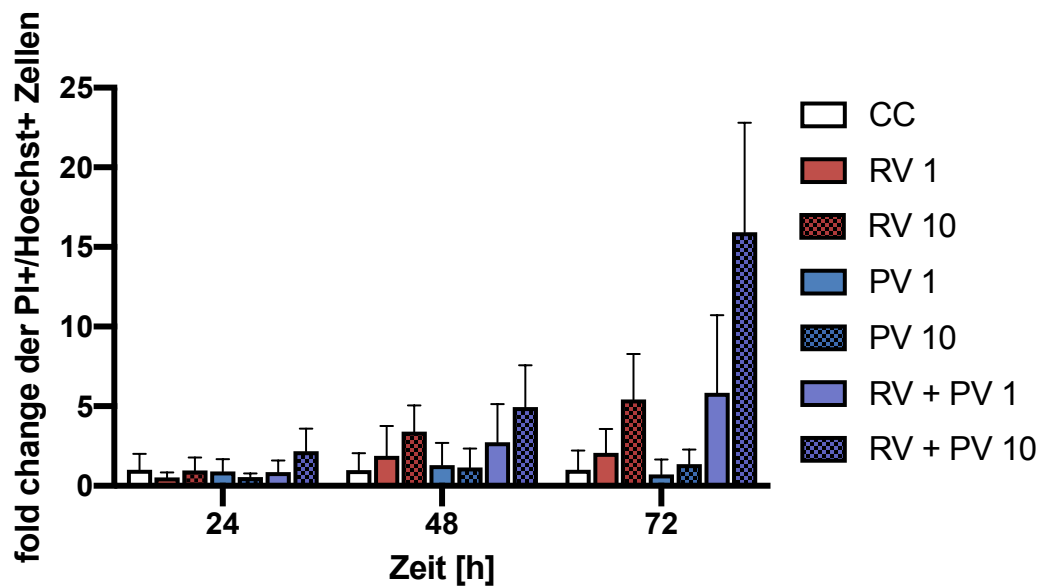


Abbildung 13: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfection mit RV, PV und RV + PV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

Abbildung 12 zeigt die Anzahl der mit Hoechst interkalierten Zellen und somit die Gesamtanzahl der U373 Zellen nach OV-Infektion im zeitlichen Verlauf. Ihr ist zu entnehmen, dass die Anzahl der Hoechst-positiven Zellen 24h nach RV-Einzelfektion mit 1 cp/c bei 156,4 Z/GF (SD \pm 34,7) und mit 10 cp/c bei 175,4 Z/GF (SD \pm 39,8) lag. Nach einer Infektion mit einer höheren Viruskonzentration (10 cp/c) waren mehr Zellen nachweisbar als in der Zellkontrolle. Nach Infektion mit 1 cp/c nahm die Zellzahl gegenüber der Zellkontrolle ab. Insgesamt wich die Gesamtzellzahl nach RV-Infektion in den drei untersuchten Zeitpunkten nicht wesentlich von der Zellkontrolle ab. Eine ähnliche Beobachtung zeichnete sich auch nach PV-Einzelfektion ab. Nach Infektion mit 1 cp/c waren 148,9 Z/GF (SD \pm 36,1) und bei 10 cp/c 174,6 Z/GF (SD \pm 42,5) mit Hoechst angefärbt.

24h nach Doppelfektion nahm mit ansteigendem Infektionstiter die Gesamtzellzahl ab. Bei 1 cp/c waren 172,7,8 Z/GF (SD \pm 44,2) und bei 10 cp/c 161,3 Z/GF (SD \pm 52,7) Zellen im Gesichtsfeld des Mikroskops mit Hoechst angefärbt. Damit sank die Gesamtzellzahl nach Doppelfektion im Vergleich zur Einzelfektion.

Eine vergleichbare Tendenz wurde auch 48h und 72h nach der Zellinfektion gemacht, denn nach einer RV- und PV-Doppelfektion mit 1 cp/c und 10 cp/c nahm die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld im Vergleich zur Zellkontrolle ab.

In Abbildung 13 werden die Auswertungen der PI und Hoechst doppelt interkalierten Zellen 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelfektion mit RV und PV dargestellt. Diese kennzeichnen sterbende Zellen.

Mit Ausnahme der Einzelfektion mit PV 1 cp/c nahm mit Zunahme des Inkubationszeitraums nach Infektion der Anteil sterbender Zellen zu. Weiterhin wurden nach einer Doppelfektion unabhängig vom Infektionstiter ein höherer Anteil sterbender Tumorzellen nachgewiesen als nach Einzelfektion. Der fold change betrug 24h nach Doppelfektion mit 1 cp/c 0,83 und mit 10 cp/c 1,28. Je länger die Infektion zurücklag, desto mehr Zellen befanden sich im Zellsterben sowohl nach RV-Einzelfektion als auch Doppelfektion mit RV und PV. 48h nach Doppelfektion mit 1 cp/c und 10 cp/c war der Anteil sterbender Zellen in später Apoptose beziehungsweise Nekrose 2,7- und 4,9-mal so hoch wie in der Zellkontrolle. Der Anteil der Hoechst und PI doppelt positiven Zellen nahm 48h nach RV-Infektion zu. Bei einer Infektion mit 1 cp/c betrug der fold change 1,88 und bei 10 cp/c 3,42. Somit war eine

konzentrations- und zeitabhängige Zunahme von Zellsterben zu beobachten. Der Anteil sterbender Zellen 48h nach RV- und PV-Doppelinfection war höher als nach jeweiliger Einzelinfection. Der Anteil sterbender Tumorzellen nach PV-Infektion nahm geringfügig zu. Er betrug 1,3 bei 1 cp/c und 1,2 bei 10 cp/c. 72h nach Doppelinfection starben doppelt so viele Zellen als nach RV-Einzelinfection (1 cp/c = 2,1, 10 cp/c = 5,4).

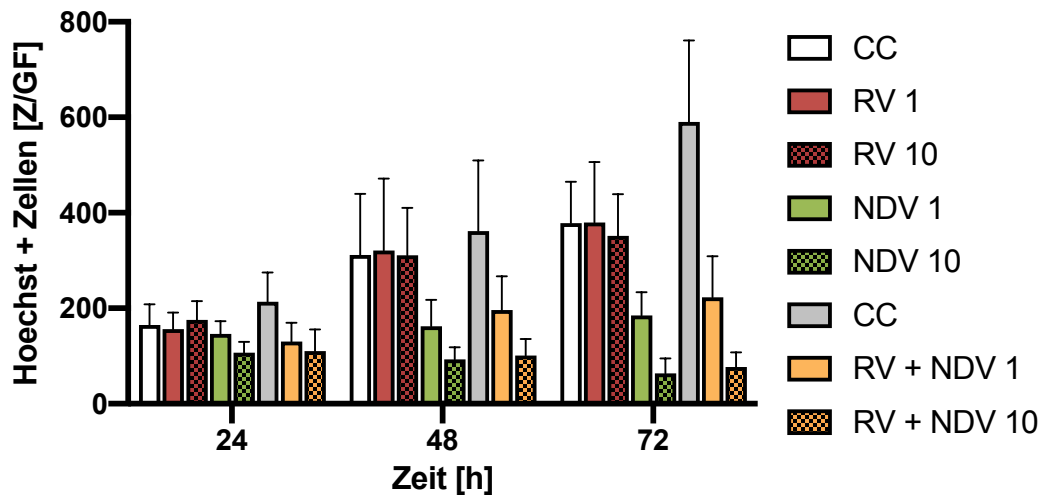


Abbildung 14: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfection mit RV, NDV und RV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten dar, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

Abbildung 14 stellt die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung der Hoechst-positiven U373 Zellen nach Einzel- und Doppelinfection mit RV und NDV dar. Eine RV-Infektion in den untersuchten Zeiträumen wirkte sich nicht wesentlich auf die Gesamtzellzahl aus. Sie nahm lediglich nach Infektion mit 10 cp/c geringfügig ab. Mit Zunahme des NDV-Infektionstiters und späteren Untersuchungszeitpunkt nahm die Gesamtzellzahl bei gleichzeitiger Zunahme sterbender Zellen ab. 24h nach Infektion mit 1 cp/c waren 146,4 Z/GF und 107,3 Z/GF nach Infektion mit 10 cp/c Hoechst positiv. Nach 48h waren 162,5 Z/GF bei 1 cp/c und 92,8 Z/GF bei 10 cp/c Hoechst positiv. Ein solcher Verlauf zeichnete sich auch nach 72h ab, da bei einer Viruskonzentration von 1 cp/c 185,1 Z/GF und bei 10 cp/c 63,6 Z/GF nachweisbar waren. Im Vergleich zur Zellkontrolle und der Doppelinfection war die Gesamtzellzahl nach NDV-Einzelinfection zu allen Messzeitpunkten niedriger. 72h nach NDV-

Infektion mit 10 cp/c betrug die Gesamtzellzahl 16,8 % (absolut: 63,6 Z/GF) des Werts der Zellkontrolle. Die Gesamtzellzahl 72h nach NDV-Einzelfektion mit 10 cp/c war geringfügig niedriger als nach Doppelinfektion.

Zu allen Messzeitpunkten nach Doppelinfektion war die Gesamtzellzahl niedriger als in der Zellkontrolle. Bei 10 cp/c nahm die Gesamtzellzahl mit Zunahme des untersuchten Zeitraums ab. Anders war dies nach Doppelinfektion mit 1 cp/c, da dort die Gesamtzellzahl in den späteren Messzeitpunkten zunahm.

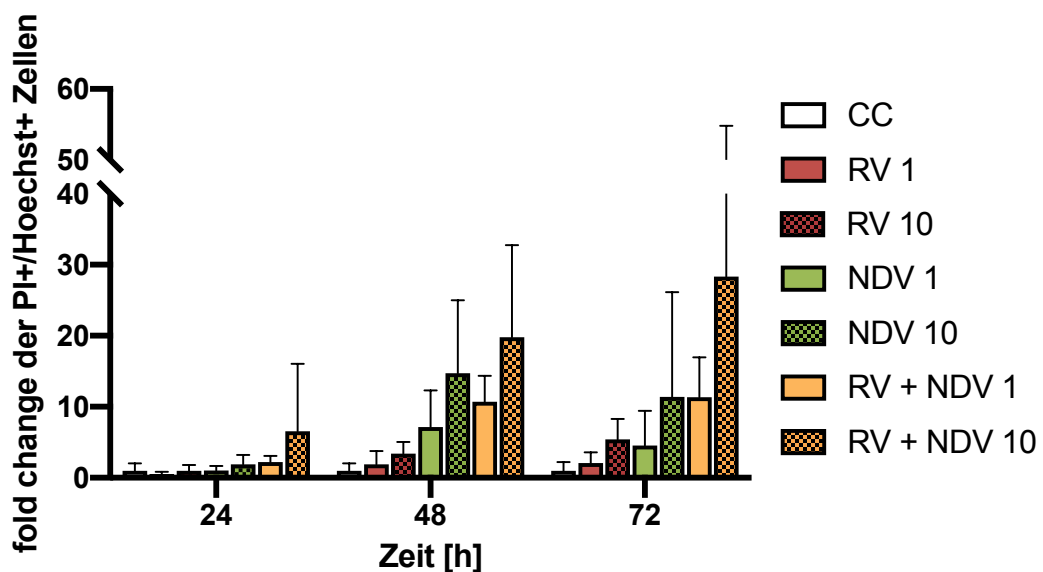


Abbildung 15: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten dar, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

In Abbildung 15 wurde die Auswertung der Hoechst und PI doppelt positive Zellen 24h, 48h, und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV und NDV im Verhältnis zu Hoechst positiven Zellen gesetzt und im fold change dargestellt. Dabei zeigte sich, dass RV und NDV doppelt infizierte Zellen nach 24h starben und der Anteil sterbender Zellen zunahm, je länger die Infektion zurücklag und je höher die Viruskonzentration war. Ab 48h nach RV-Einzelfektion konnten sterbende Zellen nachgewiesen werden. Nach 48h betrug der fold change bei 1 cp/c 1,9 und bei 10 cp/c 3,4. Dieser Anteil nahm nach 72h mit einem fold change von 2,1 bei einer 1 cp/c Viruskonzentration und bei 10 cp/c mit 5,4 zu. Einzeln mit NDV

infizierte U373 Zellen starben nach einer Infektion mit 10 cp/c bereits nach 24h. Sowohl nach 48h als auch nach 72h nahm die Anzahl sterbender U373 Zellen zeitabhängig zu. 48h nach Zellinfektion mit 1 cp/c betrug der fold change 7,2. Bei 10 cp/c verdoppelte er sich auf 14,7. Nach 72h nahm die Anzahl Hoechst/PI doppelt positiver Zellen ab und betrug für 1 cp/c 4,5 und 10 cp/c 11,4. Damit war der Anteil sterbender Zellen nach NDV-Infektion am höchsten.

Nach Doppelinfektion starben zu allen drei Zeitpunkten mehr Zellen als nach Einzelinfektion. 72h nach Infektion mit 10 cp/c waren die meisten Zellen Hoechst/PI doppelt positiv, welches sich in einem fold change von 28,3 manifestierte. In niedriger 1 cp/c Konzentration glich die Anzahl Hoechst/PI positiver Zellen dem der Einzelinfektion mit 10 cp/c (≈ 11). Insgesamt wurde nach RV- und NDV-Doppelinfektion quantitativ gesehen mehr und über einen längeren Zeitraum Zellsterben nachgewiesen als nach Einzelinfektion.

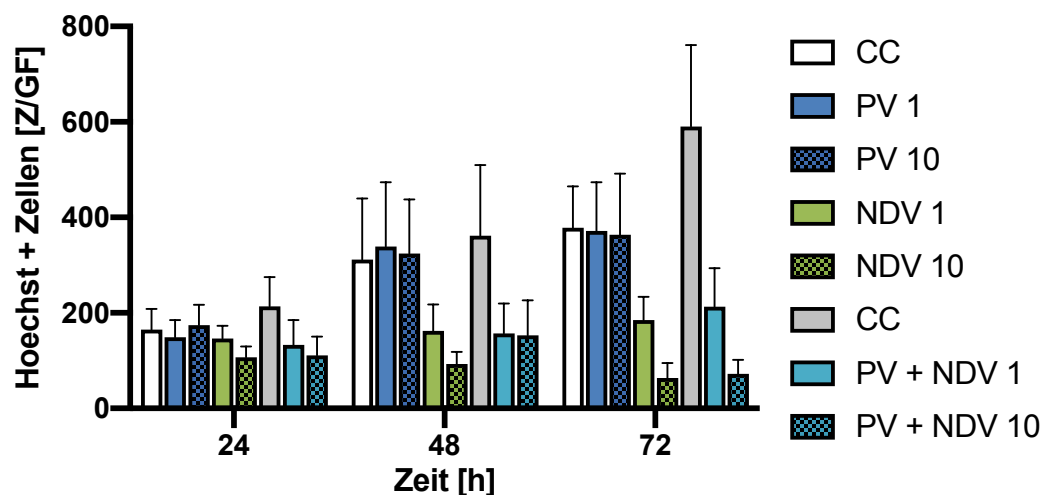


Abbildung 16: Auswertung der Hoechst-positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten dar, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

Nach U373 Doppelinfektion mit PV und NDV starben bereits zu einem früheren Zeitpunkt und quantitativ mehr Zellen als nach Einzelinfektion (Abbildung 16). Die Gesamtzellzahl war nach 24h um fast die Hälfte (1 cp/c = 133 Z/GF, 10 cp/c = 111 Z/GF) zurückgegangen. Im Vergleich waren nach NDV-Einzelinfektion insgesamt weniger Zellen vorhanden als nach Doppelinfektion mit PV und NDV. Unter Berücksichtigung der hohen Anzahl der Hoechst

positiven Zellen in der Kontrolle, war ein stärkerer Abfall der Gesamtzellzahl zu verzeichnen als nach NDV-Einzelfektion. 72h nach Infektion mit 10 cp/c waren 72 Z/GF Hoechst positiv. Dies entsprach einem Anteil von 12 % der Menge in der Zellkontrolle.

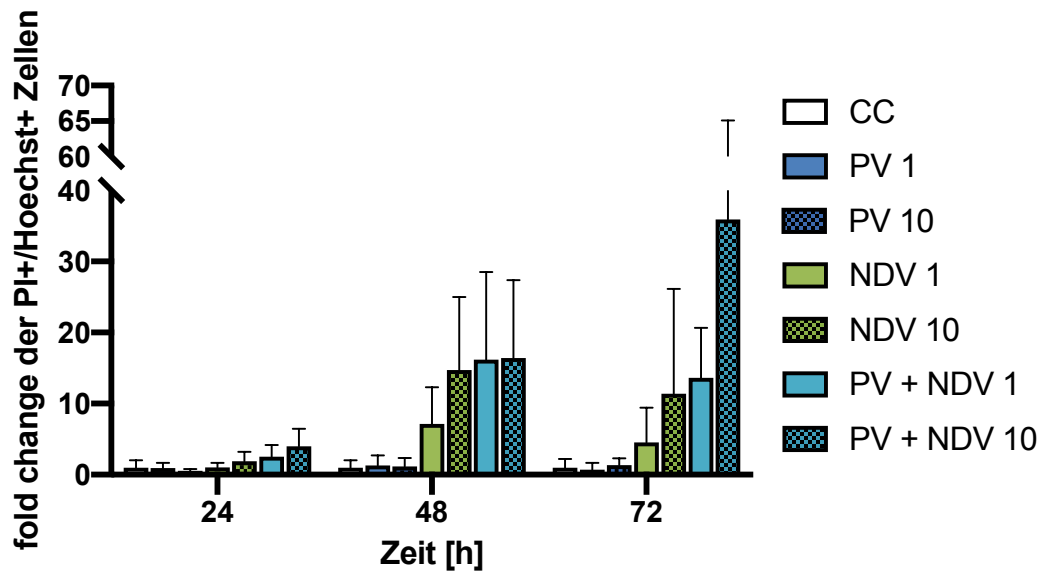


Abbildung 17: Auswertung der Hoechst- und PI doppelt positiven Zellen pro Gesichtsfeld 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelfektion mit PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten dar, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

Abbildung 17 zeigt, dass nach Doppelfektion im Verhältnis mehr Zellen starben als nach NDV-Einzelfektion, während die Gesamtzellzahl nach NDV-Einzelfektion in den beobachteten Zeiträumen weiterhin geringfügig niedriger war. Der Anteil sterbender Zellen nahm dennoch bereits nach 24h konzentrationsabhängig zu (1 cp/c = 2,5, 10 cp/c = 4,0). 48h nach Doppelfektion mit PV und NDV befanden sich in beiden Viruskonzentrationen mit einem fold change von 16 fast gleich viele Zellen im Zellsterben. Nach 72h betrug der fold change der sterbenden Zellen nach Infektion mit 10 cp/c 36, welches einem Dreifachen von dem nach NDV-Einzelfektion mit 10 cp/c entsprach.

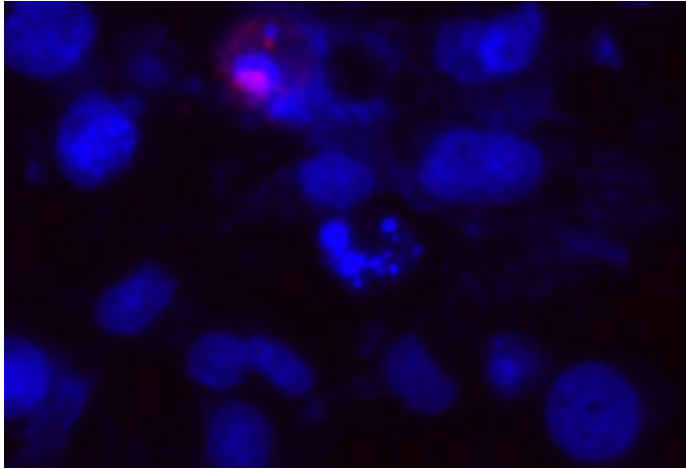


Abbildung 18: repräsentatives Beispiel einer Hoechst einzeln positiven, apoptotischen Zelle nach Immunfluoreszenzfärbung. Dieses Beispiel entstammt einer NDV-Einzelninfektion mit 1 cp/c nach 48h.

Nach der Auszählung der Hoechst positiven Zellen wurde der Anteil der apoptotischen Zellen der Hoechst einzeln positiven Zellen anhand der apoptotischen Körper (Beispiel in Abbildung 18) manuell ausgezählt. Diese erlaubte die Differenzierung apoptotischer Zellen.

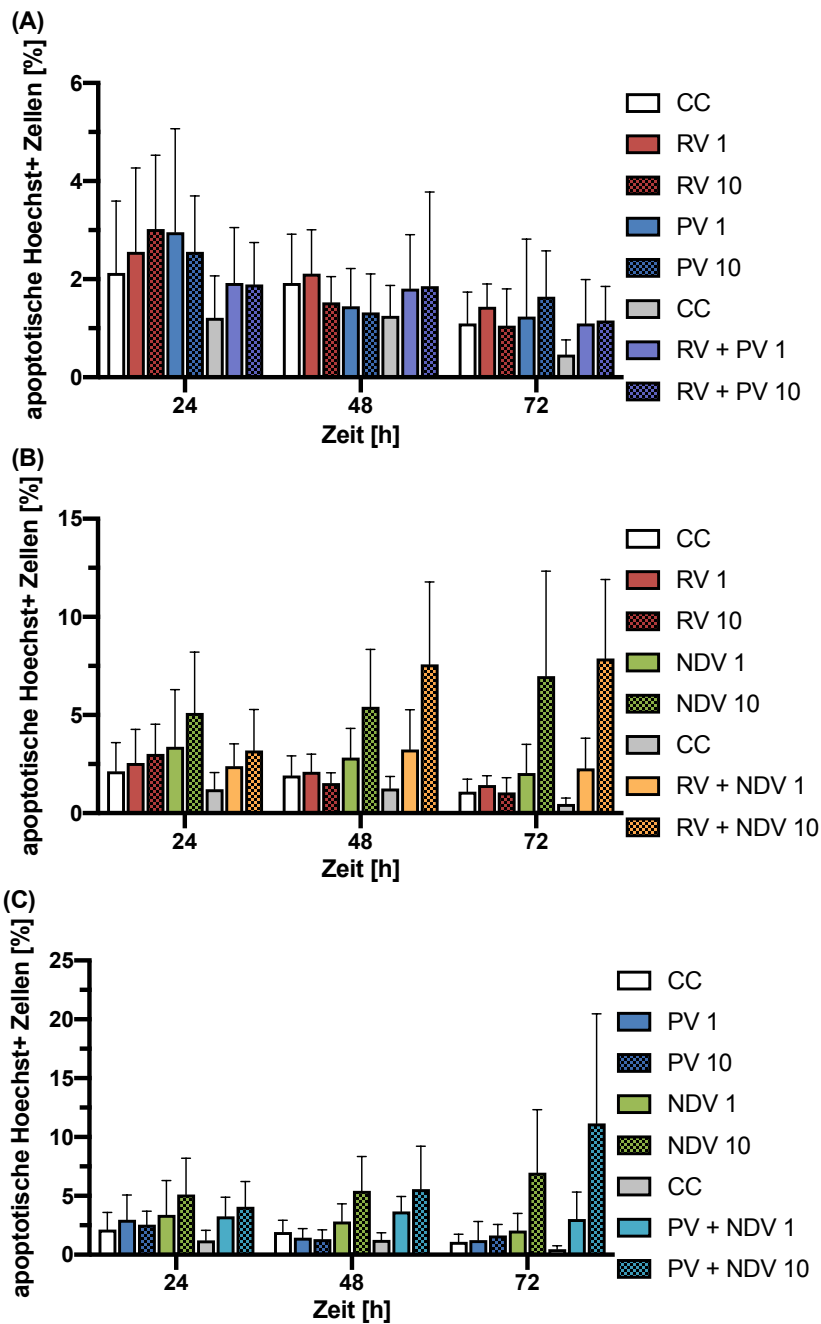


Abbildung 19: Auswertung der Hoechst einzeln positiven apoptotischen Zellen 24h, 48h und 72h nach Einzel- und Doppelinfection mit (A) RV, PV und RV + PV (B) RV, NDV, und RV + NDV, (C) PV, NDV und PV + NDV mit 1 cp/c und 10 cp/c in immunhistologischer Fluoreszenz. Die aufgeführten Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 17 Einzelwerten dar, die drei Durchführungen mit je 5-6 Ansätzen entstammen.

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse dar, die keine relevanten noch signifikanten Anteile an apoptotischen Zellen nachweisen ließ. Der Anteil apoptotischer Zellen war insgesamt niedrig, jedoch nach NDV-Einzelfektion oder Kombination von NDV mit einem weiteren Virus am höchsten.

Die Immunfluoreszenz bestätigte eine OV-vermittelte Zelltodinduktion und wies Zellsterben nach. Darüber hinaus wurden erste Hinweise über die Art des induzierten Zelltods gewonnen. Zusammenfassend zeigte sich ein zeit- und viruskonzentrationsabhängiges Zellsterben. Zudem war der Anteil sterbender Zellen nach Doppelfektion mit zunehmender Inkubationszeit und zunehmender Viruskonzentration nicht signifikant höher als nach Einzelfektion.

Im nächsten Schritt diente die FACS-Analyse dazu, die Art des Zelltods näher zu charakterisieren.

4.5 Untersuchung der Apoptose-, Nekroptose- und Nekrose-rate nach OV-Infektion von U87

Die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) unter Verwendung von PI und Annexin-V diente zum Abgleich der ermittelten Zelltodarten in der Fluoreszenzmikroskopie mit weiteren zelltodspezifischen Markern und die weiterführende Ermittlung einer OV-induzierten Nekroptose. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches apoptotische Zellen auf der Außenseite der noch intakten Zellmembran exprimieren. Es erfolgte eine Untersuchung der Apoptose-, Nekroptose- und Nekrose-rate 24h und 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 mit einem Virustiter von 10 cp/c.

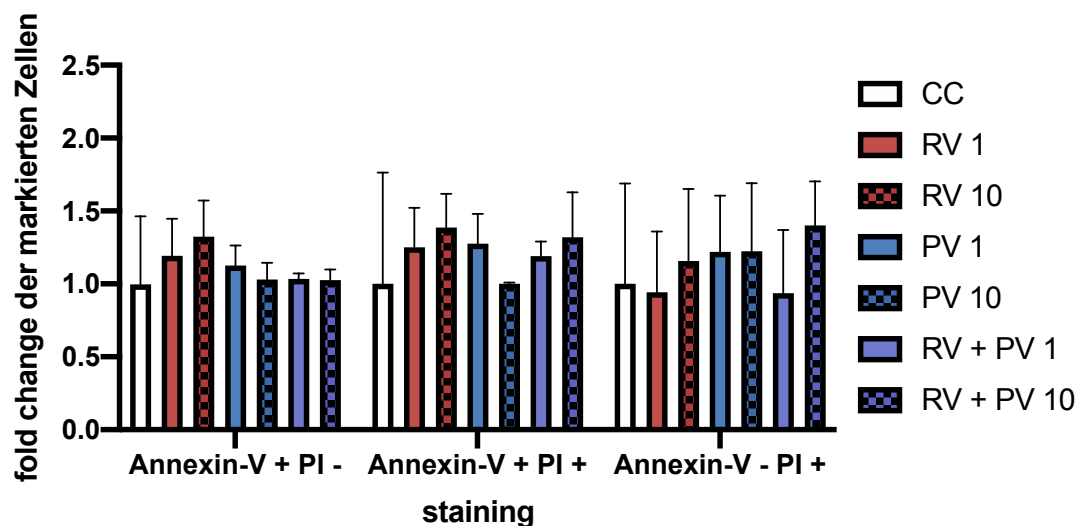


Abbildung 20: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, PV und RV + PV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Virus-Konzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV und PV mit 1 cp/c und 10 cp/c sind in Abbildung 20 dargestellt.

Nach RV-Einzelfektion mit beiden Viruskonzentrationen wurden die U87 Zellen apoptotisch und nekroptotisch. Dieser Effekt verstärkte sich mit Zunahme der Viruskonzentration, denn nach Infektion mit 1 cp/c betrug der fold change der apoptotischen Zellen 1,2 und bei 10 cp/c 1,3. Der Anteil nekroptotischer Zellen war geringfügig höher. Für 1 cp/c entsprach der fold change 1,25 und für 10 cp/c 1,4. Lediglich nach Infektion mit höherer Viruskonzentration

(10 cp/c) konnte der Nekrose-Zelltod nachgewiesen werden (Annexin-V -/PI +). Nach PV-Infektion der U87 Zellen nekrotisierten sie mit einem fold change von 1,2 in beiden Viruskonzentrationen. Nach Infektion mit einem Virustiter von 1 cp/c wurden weiterhin apoptotische (1,1) und nekroptotische (1,3) Zellen im 24h Beobachtungszeitraum detektiert, wobei der nekroptotische Anteil überwog.

Infizierte man U87 Zellen doppelt mit RV und PV, so konnte nach 24h keine Apoptose nachgewiesen werden. Stattdessen waren die Zellen vorrangig nekroptotisch. Mit Zunahme der Viruskonzentration nahm der fold change nekroptotischer Zellen von 1,2 (1 cp/c) auf 1,3 zu. Darüber hinaus wurden U87 Zellen nach Infektion mit 10 cp/c auch nekrotisch (1,4).

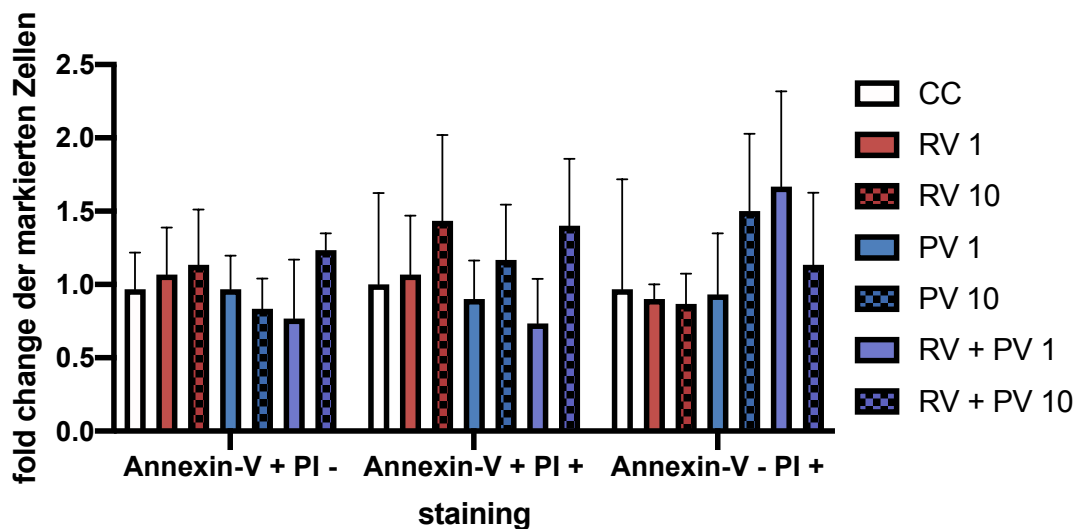


Abbildung 21: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, PV und RV + PV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Virus-Konzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV und PV wird in Abbildung 21 dargestellt. 48h nach RV-Einzelinfektion wurde mit einem fold change von 1,1 weiterhin geringfügig Apoptose nachgewiesen. In hoher Viruskonzentration (10 cp/c) nekroptotisierten die U87 Zellen in einem vergleichbaren Ausmaß wie nach 24h (1,4). Zudem waren weniger Zellen nekrotisch (PI +) als in der Zellkontrolle. Mit PV (10 cp/c) infizierte U87 Zellen waren nach 48h nekroptotisch (Annexin-V +/PI + = 1,2) und deutlich nekrotisch (PI + = 1,5). Bei niedriger Viruskonzentration (1 cp/c) zeigt sich dies nicht.

Zusammenfassend ließen sich 48h nach Doppelinfektion mit einem Virustiter von 10 cp/c am meisten nekroptotische Zellen (1,4) nachweisen. Die Apoptoserate der U87 war geringfügig höher als nach Einzelinfektion (1,2). Zusätzlich war die Nekroserate höher als nach RV- und PV-Einzelinfektion mit 1 cp/c. Lediglich die Nekroserate nach RV- und PV-Doppelinfektion mit 1 cp/c war höher als nach PV-Einzelinfektion mit beiden Virustitern (1,6). 48h nach Doppelinfektion waren mit Zunahme des RV- und PV-Infektionstiters weniger Zellen nekrotisch.

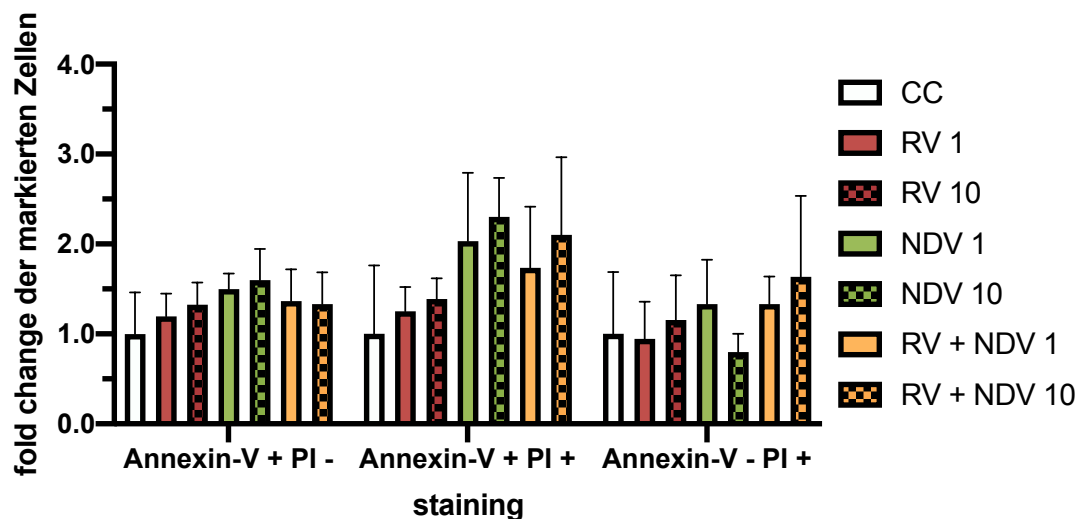


Abbildung 22: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit RV, NDV und RV + NDV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Viruskonzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

24h nach NDV-Infektion dominierte der Anteil nekroptotischer U87 Zellen (Abbildung 22). Nach Infektion mit 1 cp/c betrug der fold change 2 und stieg mit einer Infektion in einer höheren Viruskonzentration auf 2,2 an. Zusätzlich wurden apoptotische Zellen nach Infektion mit 1 cp/c (= 1,5) und 10 cp/c (= 1,6) nachgewiesen. Nach Doppelinfektion mit RV und NDV waren U87 Zellen vermehrt nekroptotisch als auch apoptotisch als nach RV-Einzelinfektion. U87 Zellen nekrotisierten nur bei einem Virustiter von 1 cp/c. Die Aktivität nach Infektion mit 10 cp/c war niedriger als in der Zellkontrolle. Nach RV- und NDV-Doppelinfektion mit beiden Viruskonzentrationen konnten nekroptotische, nekrotische und apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil nekroptotischer Zellen war am höchsten und der Anteil apoptotischer Zellen am niedrigsten. Bei einer Infektion mit 10 cp/c leiteten die meisten Zellen

den Zelltod durch Nekroptose (2,1) ein. Nach Infektion mit einer Viruskonzentration von 1 cp/c betrug die Rate 1,7.

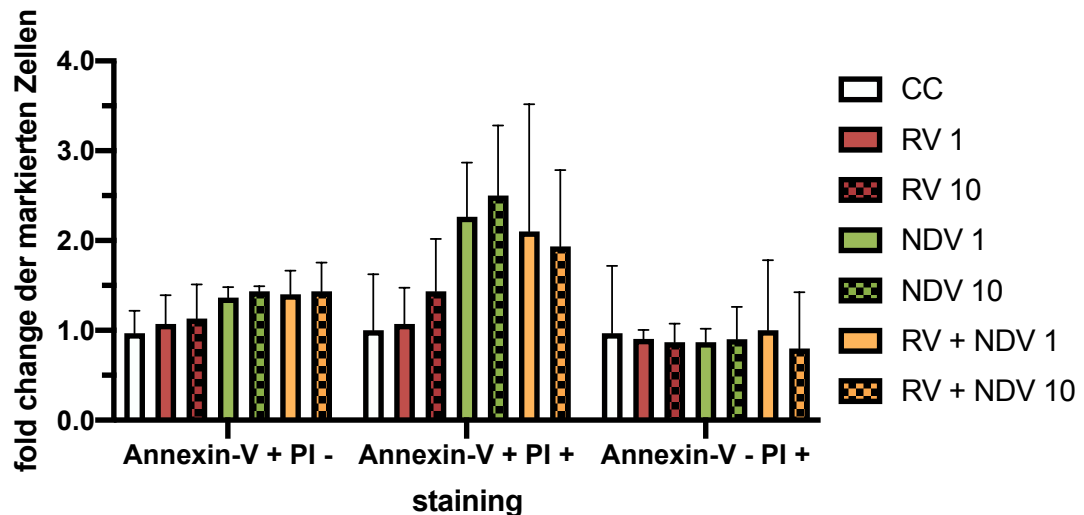


Abbildung 23: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfection von U87 Zellen mit RV, NDV und RV + NDV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Viruskonzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der FACS-Durchflusszytometrie mit RV und NDV in Einzel- und Doppelinfection nach 48h dargestellt. Mit einem fold change von 2,5 für 10 cp/c und 2,2 für 1 cp/c waren die meisten Zellen nach NDV-Einzelinfection nekroptotisch. Den zweitgrößten Anteil nahmen die apoptotischen Zellen mit einer Rate von 1,4 für 10 und 1 cp/c. Es konnte keine erhöhte Nekrose-Aktivität nachgewiesen werden. Nach Doppelinfection mit RV und NDV leiteten die Zellen auch Nekroptose ein. Es fiel auf, dass 48h nach Doppelinfection mit 1 cp/c mit 2,1 eine höhere Nekroptose-Aktivität vorlag als nach einer Infektion mit 10 cp/c. Weiterhin konnte nach Infektion mit beiden Viruskonzentrationen eine gleichwertige Apoptose-Aktivität nachgewiesen werden. Die Nekrose-Aktivität der Doppelinfection unterschied sich bei 1 cp/c nicht von der Zellkontrolle. Alle anderen Infektionen besaßen eine niedrigere Nekrose-Aktivität.

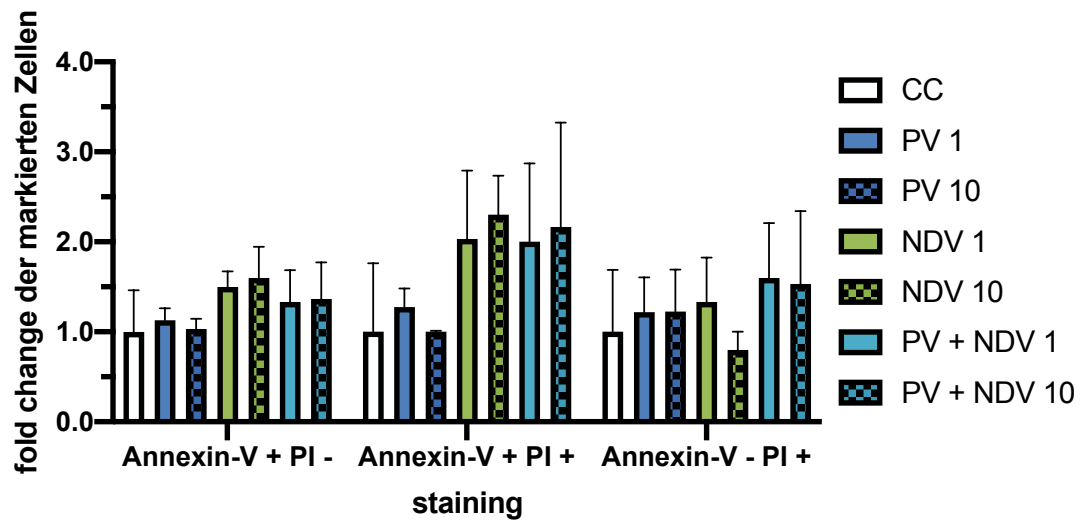


Abbildung 24: Auswertung der FACS-Analyse 24h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit PV, NDV und PV + NDV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Virus-Konzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

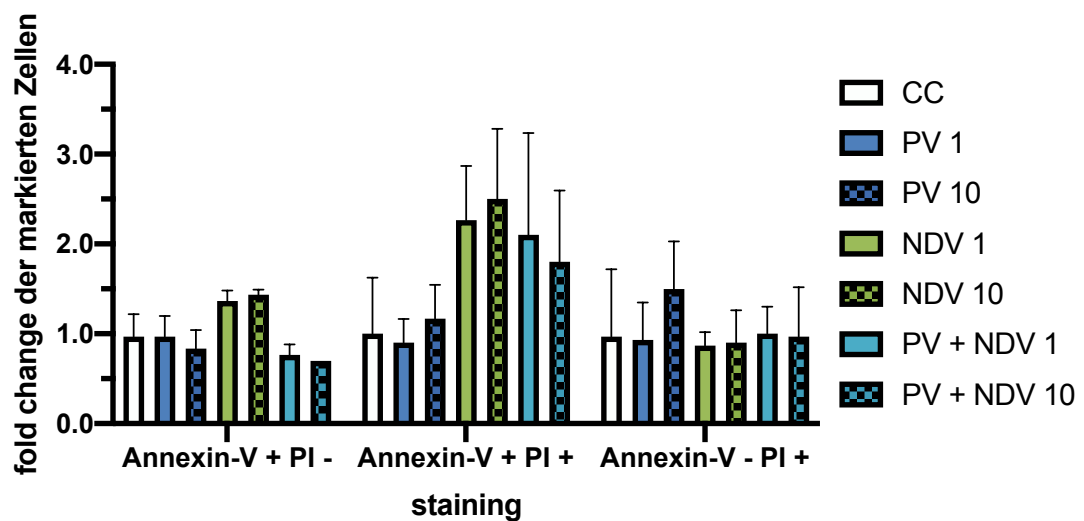


Abbildung 25: Auswertung der FACS-Analyse 48h nach Einzel- und Doppelinfektion von U87 Zellen mit PV, NDV und PV + NDV. Es wurden 10.000 Zellen detektiert. Die Virus-Konzentration betrug 1 cp/c oder 10 cp/c. Infektion mit zwei Viren erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Es wurden Annexin-V und PI verwendet, um die Art des induzierten Zelltods nach Virusinfektion zu charakterisieren. Die Standardabweichungen werden mitangegeben.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der FACS-Durchflusszytometrie der U87 Zellen 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV und NDV dargestellt. Ihr ist zu entnehmen, dass U87 Zellen nach Doppelinfektion alle drei untersuchten Arten des Zelltods eingingen. Dabei

war der nekroptotische Anteil am höchsten. Nach Infektion mit 10 cp/c betrug die Nekroptose-Rate 2,2 und bei 1 cp/c 2. Bei 1 cp/c nekrotisierten mit einer Aktivität von 1,6 geringfügig mehr Zellen als bei 10 cp/c (= 1,5). Nach Doppelinfektion wurden die wenigsten Zellen apoptotisch (1 cp/c = 1,3; 10 cp/c = 1,4).

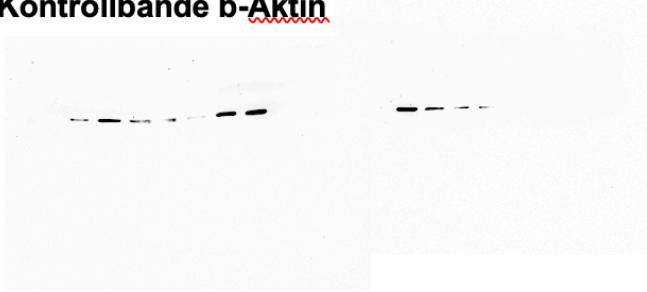
48h nach Doppelinfektion waren die doppelt infizierten Zellen hauptsächlich nekroptotisch (Abbildung 25). Denn bei einer OV-Infektion mit 1 cp/c war die Aktivität (2,1) höher als mit 10 cp/c (= 1,8). Mit einer Aktivität von 0,8 (1 cp/c) bzw. 0,7 (10 cp/c) befanden sich nach Doppelinfektion weniger Zellen in Apoptose als in der Zellkontrolle. Mit zunehmender Viruskonzentration sank die Rate weiter ab.

Nach RV- und PV-Einzelinfektion wurde primär Apoptose nachgewiesen, während die Tumorzellen nach Doppelinfektion primär nekrotisierten. Die gleiche Beobachtung zeigte sich für die Doppelinfektion von RV mit NDV und PV mit NDV.

Zusammengefasst konnte in der FACS-Analyse nach Doppelinfektion keine gegenüber der Einzelinfektion vermehrte Zelltodaktivität nachgewiesen werden. Die ermittelten Zelltode nach Doppelinfektion unterschieden sich von denen nach Einzelinfektion, denn nach Doppelinfektion wurde der Zelltod hauptsächlich mittels Nekrose und Nekroptose induziert. Die Glioblastomzellen starben nach RV- und NDV- sowie PV- und NDV-Doppelinfektion im zeitlichen Verlauf hauptsächlich durch Nekroptose und zu einem geringeren Anteil durch Apoptose, während 24h nach Infektion der Zelltod primär durch Nekroptose und Nekrose eingeleitet wurde. Anhand der FACS-Analyse konnte das in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Zellsterben auf das Vorliegen von Nekroptose und Apoptose zurückgeführt werden.

4.6 Elektrophoretischer Nachweis der Caspase-3/7 zur Ermittlung von Infektionszeitpunkten

(A) Kontrollbande **b-Aktin**



(B) Caspase-3-Bande

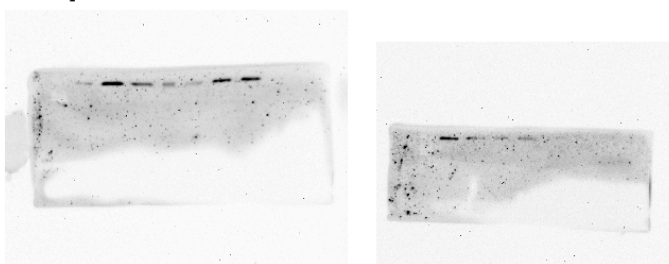


Abbildung 26: Darstellung der (A) b-Aktin Kontrollbande und (B) Caspase-3-Bande im Western Blot nach Einzelinfektion mit NDV 10 cp/c. Die beta-Aktin-Kontrollbanden sind unterschiedlich stark, sodass keine valide Aussage über den Zeitpunkt getroffen werden kann, an dem die Caspase-3 im Rahmen der Apoptose nachweisbar ist.

Der Western Blot verfolgte das Ziel mittels einer kosteneffektiven Labormethode die Zeitpunkte der Caspase-3/7-Expression als Indikator der Apoptose-Einleitung nach OV-Infektion mit 10 cp/c für den anschließenden CaspaseGlo-3/7 Luciferase-Versuch zu ermitteln. Aufgrund unterschiedlich intensiv gefärbter Proteinbanden in der Proteinkontrolle (Haushaltsgen, siehe Abbildung 26) konnte eine verlässliche Auswertung nicht erfolgen, sodass eine empirische Bestimmung der Inkubationszeiten anhand der gegenwärtig verfügbaren Literatur erfolgte.

4.7 Intrazellulärer Nachweis der Caspase-Aktivität als Zeichen der Apoptose-Induktion nach OV-Infektion von U87

In den vorangegangenen Experimenten konnte die Einleitung des Zelltods durch OV aus verschiedenen Perspektiven untersucht und entsprechende Erkenntnisse über die Art des Zelltods nach OV-Infektion gewonnen werden. Nun diente der CaspaseGlo-3/7-Assay dazu, die spezifische Aktivität und den Nachweiszeitpunkt der Effektor-Caspasen-3 und -7 als Indikator der Apoptose 4h, 8h und 24h nach OV-Infektion zu charakterisieren und zu quantifizieren. Die Viren wurden für die Doppelinfektion im Verhältnis 0,5:0,5 auf die Zellen gegeben.

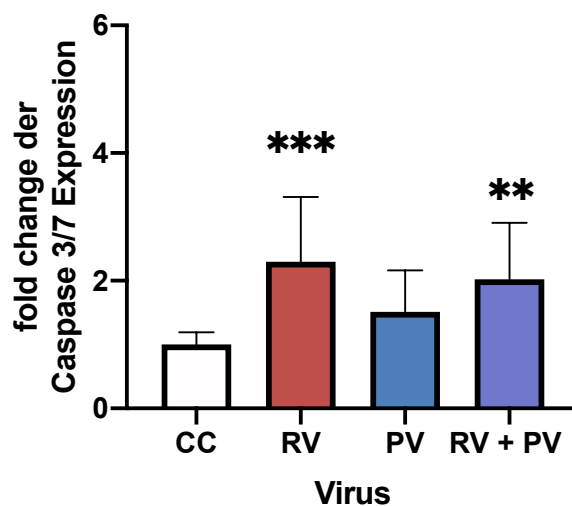


Abbildung 27: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

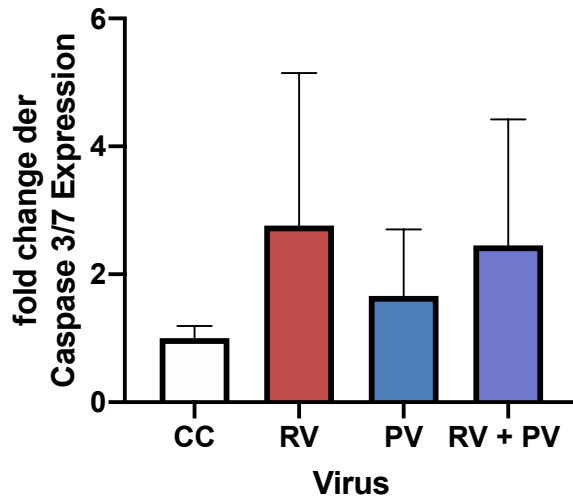


Abbildung 28: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

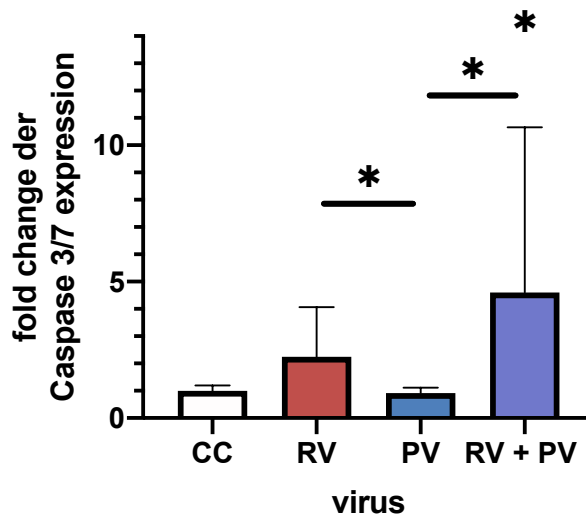


Abbildung 29: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und RV + PV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

In den Abbildungen 27, 28 und 29 sind die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektion mit RV und PV im zeitlichen Vergleich dargestellt.

Bereits nach 4h exprimierten die infizierten U87 Zellen die Effektorcaspasen-3/7 und induzierten Apoptose (Abbildung 27). Die höchste und statistisch signifikante Aktivität wurde nach 4h nach RV-Einzelninfektion (= 2,3) gemessen (p-Wert = 0,0004). Die zweithöchste Caspase-Aktivität wurde nach Doppelinfektion mit RV und PV mit einem fold change von 2,0 nachgewiesen (p-Wert = 0,0018). Nach PV-Einzelninfektion konnten zu allen Zeitpunkten eine geringe und nicht signifikante Apoptose-Aktivität nachgewiesen werden, die ihr Maximum nach 8h mit 1,7 erreichte und nach 4h bei 1,5 lag. 8h nach RV-Einzelninfektion wurden mehr Zellen apoptotisch als vorher, welches sich in einer höheren Caspase-Rate von 2,8 (p-Wert = 0,00549) zeigte (Abbildung 28). Zu diesem Messzeitpunkt war die Apoptose-Aktivität unter allen drei Messzeitpunkten am höchsten.

Die Caspase-Aktivität der Doppelinfektion mit RV und PV war nach 8h mit 2,5 geringfügig niedriger (Abbildung 28). Folglich waren mehr Zellen 8h nach RV-Infektion apoptotisch als nach Doppelinfektion mit RV und PV. Die Apoptose-Aktivität unterschied sich allerdings nicht signifikant voneinander (p-Wert = >0,99). 24h nach RV- und PV-Doppelinfektion war die höchste Caspase-Aktivität nachweisbar (= 4,6), während die Caspase-Aktivität der RV-Einzelninfektion auf 2,3 sank. RV und PV doppelt infizierte Zellen wiesen nach 24h im Vergleich zu den RV- und PV-Einzelninfektionen in allen beobachteten Zeitpunkten die höchste Apoptose-Aktivität auf. Die Caspase-Aktivität der RV und PV doppelt infizierten Zellen war nach 24h statistisch signifikant höher als die Aktivität nach PV Einzelninfektion (p-Wert = 0,0298). Die Caspase-Aktivität der RV und PV einzeln infizierten U87 Zellen nahm nach 24h ab. Die Caspase-Aktivität nach RV-Infektion betrug 2,3 und nahm den gleichen Wert wie schon nach 4h ein. PV infizierte Zellen waren nach 24h nicht apoptotisch (Abbildung 29).

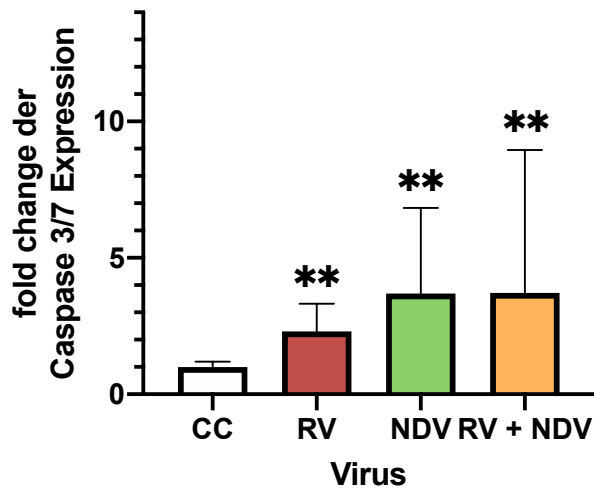


Abbildung 30: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

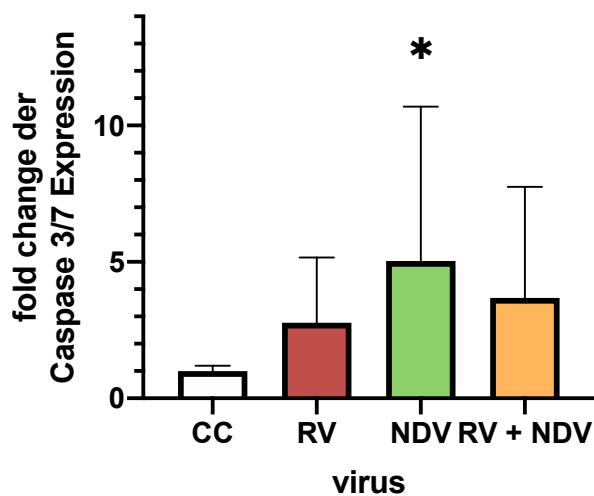


Abbildung 31: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

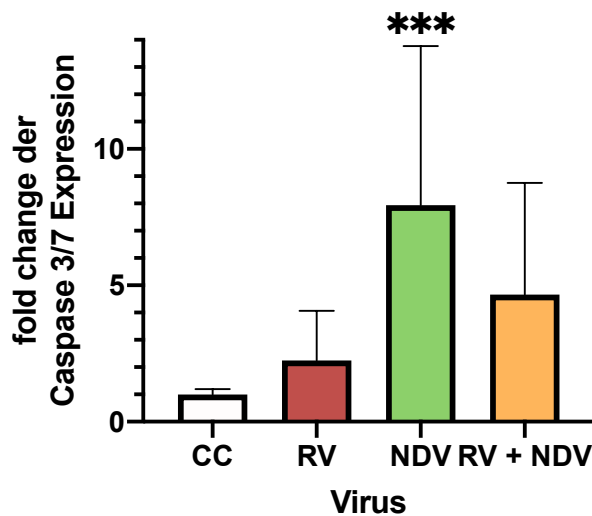


Abbildung 32: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, NDV und RV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

In den Abbildungen 30, 31 und 32 werden die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektion mit RV und NDV im zeitlichen Vergleich dargestellt. Die Caspase-Aktivität betrug 4h nach NDV-Einzel- (p-Wert = 0,0042) und RV- und NDV-Doppelinfektion 3,7 (p-Wert = 0,0075, Abbildung 30). 8h nach NDV-Einzelinfektion war die Caspase-Aktivität höher als nach RV Einzel- und RV- und NDV-Doppelinfektion (Abbildung 31). Die Caspase-Aktivität lag bei 5, die nach Doppelinfektion bei 3,7. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zu den anderen Infektionsmodi, jedoch waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant mehr Zellen apoptotisch (p-Wert = 0,0339). Obwohl die Caspase-Aktivität der RV einzeln infizierten Zellen nach 8h am höchsten war (= 2,8), war diese im Vergleich niedriger als nach NDV-Einzel- und RV- und NDV-Doppelinfektion. 24h nach NDV-Einzelinfektion erreichte die Caspase-Aktivität ihr Maximum mit einer Aktivität von 7,9 (p-Wert = 0,0002, Abbildung 32). Auch die Caspase-Aktivität der doppelt infizierten Zellen erreichte 24h nach Infektion ihr Maximum bei 4,7 und war im Vergleich zur Zellkontrolle statistisch nicht signifikant (p-Wert = 0,0687). NDV infizierte Zellen wiesen in allen beobachteten Zeiträumen eine höhere Apoptose-Aktivität auf als RV einzeln und RV und NDV doppelt infizierte Zellen. Nach Zugabe von NDV

zu RV für die Doppelinfektion war die Caspase-Aktivität an allen Zeitpunkten höher als nach RV-Einzelinfektion. Jedoch waren nach RV- und NDV- Doppelinfektion weniger U87 Zellen apoptotisch als nach NDV-Einzelinfektion. Insgesamt war die Caspase-Aktivität nach Doppelinfektion höher als nach RV-, jedoch niedriger als nach NDV-Einzelinfektion.

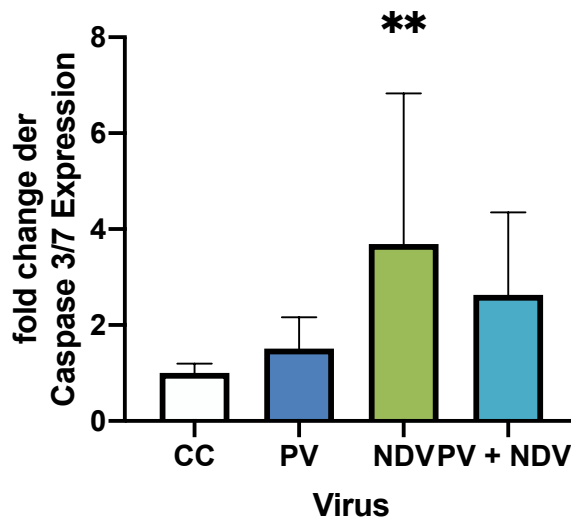


Abbildung 33: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 4h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

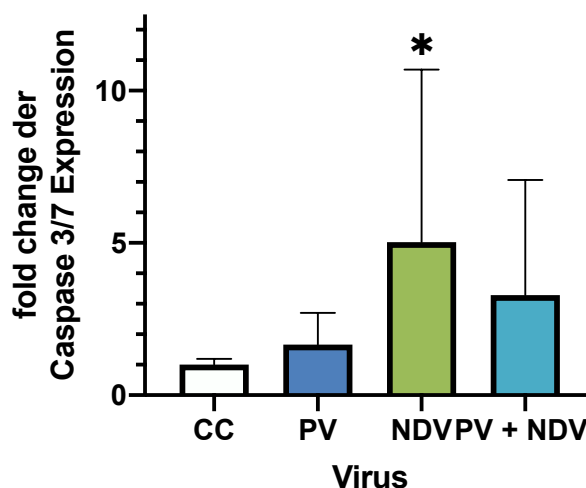


Abbildung 34: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 8h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well.

n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

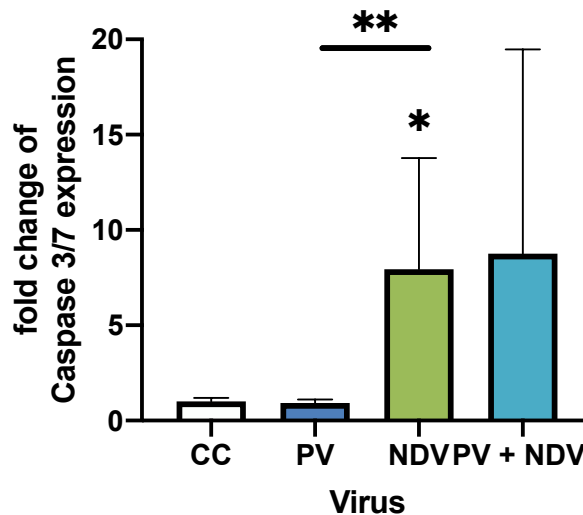


Abbildung 35: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Die Abbildungen 33, 34 und 35 stellen die Ergebnisse der Einzel- und Doppelinfektionen von PV und NDV im zeitlichen Vergleich dar. Je länger die Doppelinfektion zurücklag, desto höher war die Caspase-Aktivität. 4h und 8h nach PV- und NDV-Doppelinfektion wurde die Apoptose durch Nachweis einer erhöhten Caspase-Aktivität nachgewiesen. Die Caspase-Aktivität lag nach 4h bei 2,6 (p-Wert = 0,1478) und stieg nach 8h auf 3,3 an (p-Wert = 0,6156, siehe Abbildungen 33 und 34). Zwar war sie höher als nach PV-Einzelinfektion, jedoch niedriger als nach NDV-Einzelinfektion. Zum 24h Untersuchungszeitpunkt wurde mit einer Caspase-Aktivität von 8,8 die höchste Apoptose-Aktivität nach PV- und NDV-Doppelinfektion nachgewiesen. Diese war nicht statistisch signifikant höher als nach NDV- oder PV-Einzelinfektionen (Abbildung 35). Es deutet dennoch einen synergistischen apoptotischen Effekt durch eine PV- und NDV-Doppelinfektion an. 24h nach NDV-Einzelinfektion waren signifikant mehr Zellen apoptotisch als nach PV-Einzelinfektion (p-Wert = 0,0035).

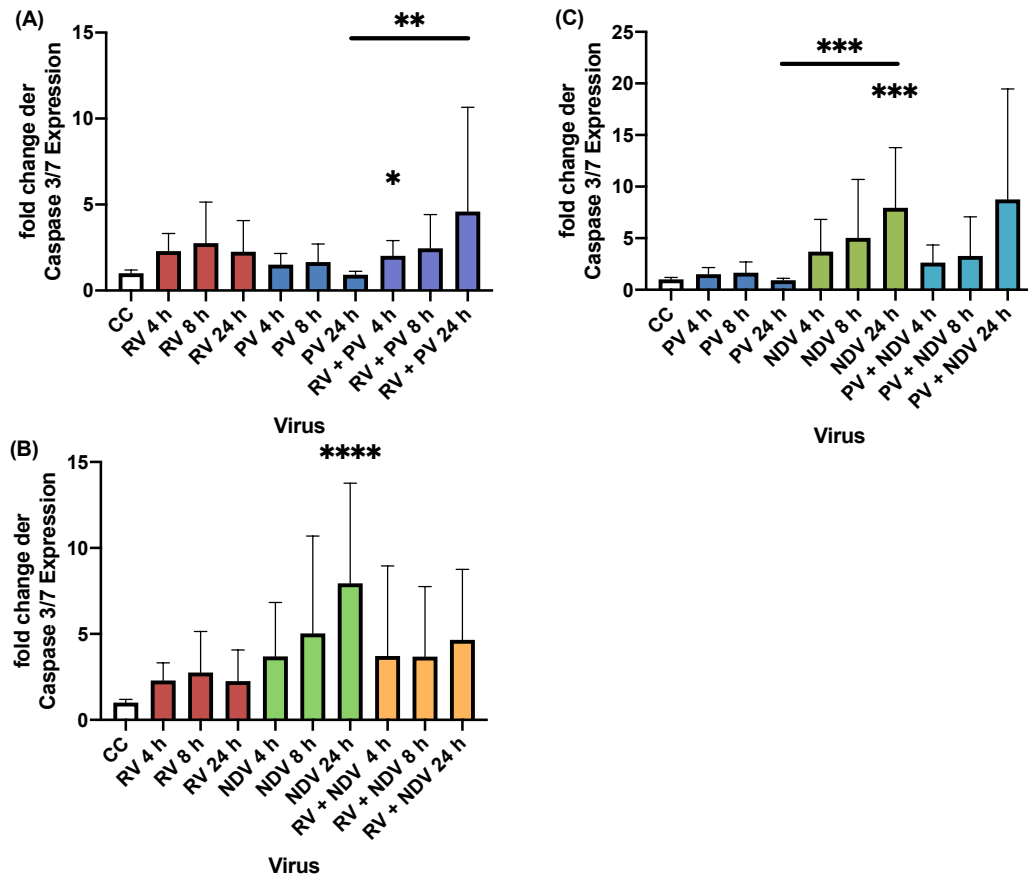


Abbildung 36: Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität 4h, 8h und 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit (A) RV, PV und RV + PV (B) RV, NDV und RV + NDV und (C) PV, NDV und PV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch einen Kruskal-Wallis-Test. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

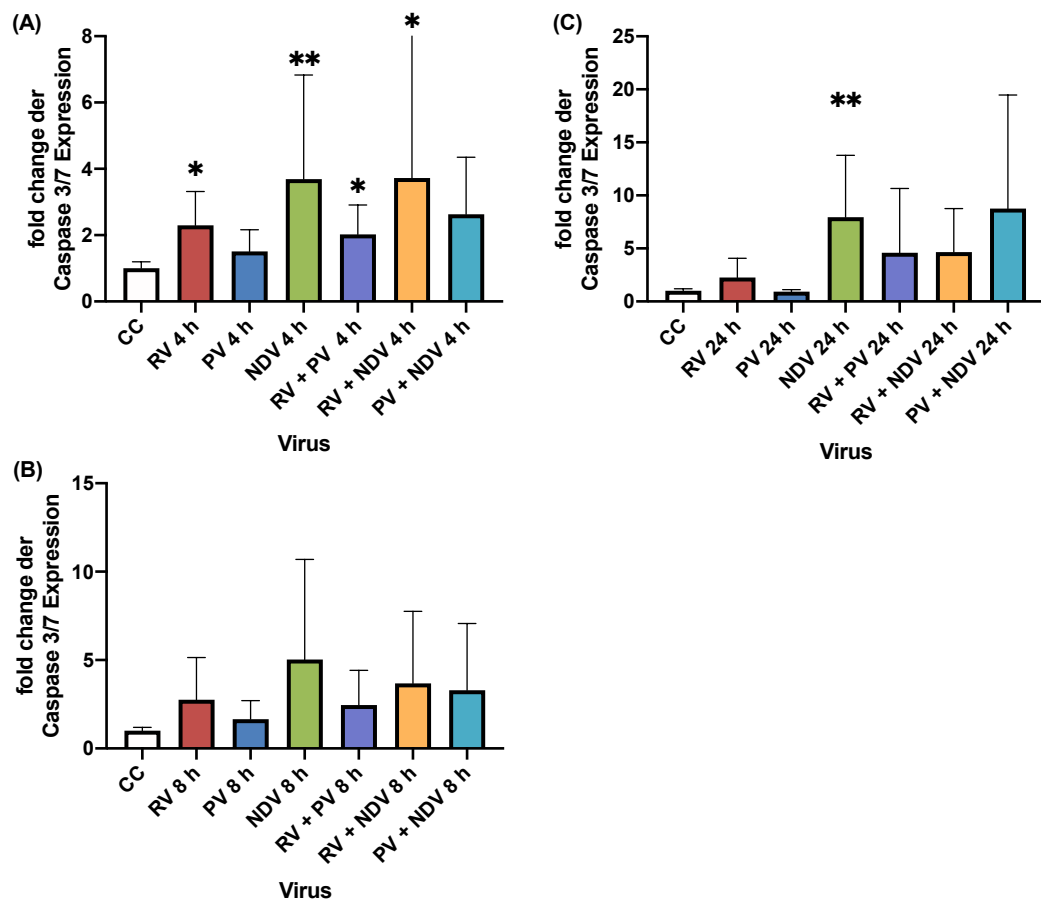


Abbildung 37: Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität (A) 4h, (B) 8h und (C) 24h nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV, NDV, RV + PV, RV + NDV und PV + NDV in Lumineszenz. Viruskopien pro Zelle: 10 cp/c, 20.000 c/well. n = 3 mit je 3-4 Ansätzen. Die Doppelinfektion erfolgte im Verhältnis 0,5:0,5. Die Balken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar. Die Signifikanzen sind mit einem Stern gekennzeichnet und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf die CC. Kruskal-Wallis-Test *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Nach OV-Infektion lag die höchste Caspase-Aktivität 24h nach einer Doppelinfektion mit PV und NDV vor (p-Wert = 0,5414). Darauf folgte die NDV-Einzelinfektion zum selben Zeitpunkt mit einer Rate von 7,9 (p-Wert = 0,0027, Abbildung 36). Nach Doppelinfektion mit RV und PV sowie RV und NDV wurde nach 24h eine fast identische Caspase-Aktivität nachgewiesen. Nach Doppelinfektion exprimierten die U87 Zellen zu jedem Zeitpunkt eine erhöhte Effektorcaspase-Aktivität (>4,6). Zusätzlich war ein synergistischer Effekt nach RV- und PV-Doppelinfektion zu beobachten. Die Rate betrug 4,6, während sie nach Einzelinfektion mit RV bei 2,3 und nach Einzelinfektion mit PV bei 0,9 lag. NDV infizierte Zellen leiteten nach

8h mehr Apoptose (fold change = 5) als die Doppelinfektionen mit RV und NDV (3,7) sowie mit PV und NDV (3,3) ein. Sobald NDV an einer Doppelinfektion beteiligt war, wurde stärker Apoptose induziert als nach alleiniger Gabe von RV oder PV (Abbildung 37). Die Caspase-Aktivitäten nach NDV-Einzelfektion und Doppelinfektion mit RV unterschieden sich nicht voneinander (3,7).

Abschließend bestätigten die Ergebnisse des CaspaseGlo-3/7 Assays die in der FACS-Durchflusszytometrie beobachtete OV-induzierte Apoptose. Weiterhin konnte sie der Caspase-abhängigen Apoptose-Induktion zugeordnet werden. Je nach Viruskombination erreichten die doppelt infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die maximale Caspase-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten – die RV- und PV-Doppelinfektion nach 4h, die PV- und NDV-Doppelinfektion nach 8h und die RV- und NDV-Doppelinfektion nach 24h.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Promotionsprojekts

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Promotionsprojekts tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 7: tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Promotionsprojekts

	Methoden					
Virus	MTT U87 72h	IF U87 24h u. 48h.	MTT U373 72h	IF U373 24h u. 48h	FACS U87 72h	CaspaseGlo-3/7 4h, 8h, 24h
Einzelinfektion (EI)	Ab 100 cp/c ausgeprägter zytotoxischer Effekt	Zellen verklumpten	Ausgeprägter zytotoxischer Effekt nur bei NDV 100 cp/c nachweisbar		Zunahme der untersuchten Zelltodarten bei längerer Inkubationszeit	Nachweis Caspase-abhängiger Apoptose
RV	Onkolyse nachweisbar		Onkolyse nachweisbar	Zellsterben ab 48h Inkubation insbesondere bei 10 cp/c nachweisbar	Nekroptose in beiden Untersuchungszeitpunkten, Apoptose insbes. nach 24h, geringfügig Nekrose bei 10 cp/c nach 24h	Zu allen Untersuchungszeitpunkten nachweisbar, Maximum nach 8h
PV	Onkolyse nachweisbar, schwächste EI		Onkolyse, nachweisbar, schwächste EI	Zellsterben erst ab 72h Inkubation bei 10 cp/c nachweisbar	Primär Nekrose und Nekroptose nach 24h mit Zunahme nach 48h, Nekrose-Aktivität am höchsten	Geringfügige und niedrigste Caspase-Aktivität
NDV	Onkolyse nachweisbar, stärkste EI		Ausgeprägte Onkolyse nur nach NDV-Infektion nachweisbar	Viruskonzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Gesamtzellzahl, bei	Höchste Nekroptose- und Apoptose-Aktivität zu allen untersuchten Zeitpunkten	Zunahme der Caspase-Aktivität mit Zunahme des Inkubationszeitraumes,

				1 cp/c verminderte Zunahme der Gesamtzellzahl im Vergleich zu den anderen Infektionsmodi, Hoechst-positive Zellen nach DI geringfügig höher als nach EI	Nekroptose-Zelltod dominiert. Nach 24h Nekrose nachweisbar	Maximum bei 24h, höchste Aktivität unter allen EIs
Doppelinfection (DI)	DI hat einen stärkeren onkolytischen Effekt als EI		Zelllinienspezifischer und konzentrationsabhängiger onkolytische Wirksamkeit nachgewiesen; kombiniert man einen schwach onkolytischen Virus mit einem stark onkolytischen Virus, so ist ein stärkerer onkolytischer Effekt nachweisbar als nach alleiniger Gabe des	Nach DI waren in allen untersuchten Zeiträumen weniger Hoechst+-Zellen als nach Einzelinfektion; konzentrationsabhängige Zunahme der Hoechst-/PI- doppelt positiven Zellen; je länger der Inkubationszeitraum und die Viruskonzentration,	Nach DI Zunahme von nekroptotischen und ggf. nekrotischen Zelltod; abhängig vom Untersuchungszeitpunkten können die dominierenden Zelltodarten variieren	

			schwach onkolytischen Virus	desto mehr Zellsterben wurde nachgewiesen. Größtes Zellsterben nach RV+NDV- und PV+NDV-DI		
RV + PV	DI stärker als EI		DI stärker als PV-EI	Deutliches viruskonzentrations- und inkubationszeitabhängiges Zellsterben nachweisbar, mehr Zellsterben als nach RV- und PV-EI	Nach 24h Nekrose und Nekroptose bei 10 cp/c nachweisbar; Zunahme nach 48h mit zusätzlicher Apoptose	Caspase-Aktivität nimmt mit längerer Inkubationszeit zu. Nach 24h höchste Caspase-Aktivität.
RV + NDV	DI stärker als EI		NDV signifikant stärker, DI stärker als RV EI	DI verursacht mehr Zellsterben als NDV-EI bei in etwa gleichwertiger Anzahl Hoechstpositiver Zellen, größtes Zellsterben bei 10 cp/c. Zellsterben bei 1 cp/c	Bei 10 cp/c und nach 24h dominiert die Nekroptoseaktivität, zusätzlich Nekrose nachweisbar. Nach 48h hauptsächlich Nekroptoseaktivität, die geringfügig niedriger als nach NDV-EI ist. Nachweisbare niedrige Apoptose-Aktivität	Höchste Caspase-Aktivität nach 8h, Aktivitäten geringfügig niedriger als NDV EI. Höhere Caspase-Aktivität als nach RV-EI.

				äquivalent zu NDV-EI 10 cp/c		
PV + NDV	DI stärker als EI		DI stärker als PV-EI	Gesamtzellzahl äquivalent zu NDV-EI. Fold change sterbender Zellen nach DI hö- her als nach EI bei längerer Inkubati- onszeit und höherer Viruskonzentration.	Nach 24h dominiert Nekroptose- Zelltod, zusätzlich Nekrose- und Apoptoseaktivität, Nekroseakti- vität höher als nach Einzelinfek- tion. Nach 48h hauptsächlich Nekroptose	Höchste Caspase-Aktivität unter allen Infektionen nach 24h. zweithöchste Aktivität nach 4h und 8h im Vergleich mit anderen DIs.

5 Diskussion

5.1 Kombinationstherapie von OV mit anderen antitumoralen Therapiemethoden

In den vergangenen Jahren konnten Erfolge bei der präklinischen und klinischen Anwendung der OV beim GBM verzeichnet werden (RIUS-ROCABERT et al., 2020). Eine vollständige Tumorregression zur kurativen Therapie blieb jedoch bisher aus und eine Verlängerung der Überlebenszeit konnte lediglich in einzelnen Fällen erzielt werden (GESUNDHEIT et al., 2020).

Für die Entstehung der intra- und intertumorale Heterogenität wurden vier Erklärungsansätze erforscht, die alle gemeinsam haben, dass sich innerhalb eines Glioblastoms koexistierende Subtypen entwickeln, die unterschiedlich gut auf die Therapie ansprechen und bis zu einer vollständigen Therapieresistenz führen können (INDA et al., 2014). Dadurch bestehen hohe, leider bisher unüberwindbare Anforderungen an eine erfolgreiche, kurative Glioblastomtherapie. Um diese Herausforderungen möglichst gut im vorliegenden Promotionsprojekt abzubilden, wurden zwei Glioblastomzelllinien unterschiedlicher Genese verwendet und diese einzeln und simultan mit zwei von drei OV infiziert. Im Vergleich zu einer Kombinationstherapie eines onkolytischen Virus mit einer Chemotherapie wird die Tumorzelle durch die Verwendung zweier OV zusätzlich belastet. Denn die Tumorzelle muss nun für die Entwicklung einer Therapieresistenz die natürlichen, überexprimierten Wachstumsfaktoren für die Hemmung der Replikation zweier OV drosseln.

Grundsätzlich verfolgt die Kombinationstherapie das Ziel, die onkolytische Wirksamkeit der OV beim GBM durch einen synergistischen onkolytischen Effekt zu verstärken. In einem aktuellen Review von Terrivel et al. wurde über gute Erfahrungen mit Kombinationstherapiekonzepten von OV mit VEGF-Angiogenesehemmer, Histon-Deacetylase-Inhibitoren, CAR-T-Zell-Therapie und bispezifischen T-Zell-Engagern berichtet (TERRIVEL et al., 2020).

In einer klinischen Phase I/II Studie wurde RV Typ 3 Dearing mit einer Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel bei Kopf-Hals-Tumoren kombiniert. Hier zeigte sich eine gute Verträglichkeit und Aktivität, sodass eine Phase III Studie gestartet wurde (KARAPANAGIOTOU et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Studie sind noch nicht veröffentlicht.

In einer randomisierten Phase II Studie zeigte sich eine höhere antitumorale Aktivität durch die Kombination des onkolytischen Herpes simplex Virus „T-VEC“ mit dem Anti-CTLA4-Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab beim fortgeschrittenen nicht resektablen Melanom (CHESNEY et al., 2018). Die Kombination des RV Pelareorep mit dem PD1-Inhibitor Pembrolizumab nach erfolgter Chemotherapie beim pankreatischen duktalem Adenokarzinom lieferte in einer klinischen Phase Ib Studie erste ermutigende Daten für die Wirksamkeit dieses Therapiekonzepts bei gutem Sicherheitsprofil (MAHALINGAM et al., 2020).

Die Kombination von PV-H1 mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin zeigte beim duktalem pankreatischen Adenokarzinom eine stärkere antitumorale Aktivität als die Monotherapie mit PV-H1 (ANGELOVA et al., 2014). Darüber hinaus geht man davon aus, dass eine Vorbestrahlung 24h vor der PV-H1-Infektion den Anteil der Gliomzellen in der S-Phase erhöht und die Zellen dadurch anfälliger für die anschließende virale Infektion und Replikation werden (GELETNEKY et al., 2010). In einer in vitro Studie konnten Goepfert et al. nach Kombination von PV-H1 mit den Immuncheckpoint-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab einen synergistischen antitumoralen Effekt durch die vermehrte Expression zytotoxischer T-Zellen und erhöhte Aktivität der T-Lymphozyten nachweisen (GOEPFERT et al., 2019).

In ersten klinischen Studien wurden die Verträglichkeit und das Ansprechen von GBM auf eine NDV-Therapie erfolgreich untersucht und bieten somit Anlass für die weitergehende Forschung an diesem Therapieansatz in zukünftigen Studien (FREEMAN et al., 2006).

Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen und den vielversprechenden Ergebnissen der onkolytischen Wirksamkeit der einzelnen Viren konnten in der Vergangenheit im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Graf erste Erfolge mit dem Therapieansatz der OV-Kombinationstherapie –mit RV und PV, sowie RV und NDV - verzeichnet werden. Zudem wurde ein erster in vivo Ansatz im Mausmodell unternommen. Die Experimente folgten der Hypothese, dass die OV verschiedene Mechanismen zur zellulären Infektion und Lyse zunutze machen und diese sich einander ergänzen (ALKASSAR et al., 2011). Anknüpfend an die bisherigen Experimente und Erkenntnisse wurden in diesem Projekt die zugrundeliegenden Zelltypen nach Einzel- und Doppelinfektion in verschiedenen Untersuchungszeitpunkten und Viruskonzentrationen zweier verschiedener Glioblastomzelllinien aus mehreren Perspektiven

charakterisiert, um ein besseres Verständnis für die zugrunde liegenden Mechanismen zu gewinnen und die Erfolgsaussichten einer kombinierten OV-Therapie abzuschätzen.

Weitere Forschende schlossen sich dem Ansatz einer kombinierten Virotherapie an, wie beispielsweise Zhang et al., der eine erhöhte onkolytische Wirksamkeit bei Kombination von Masern- mit Mumpsviren in hämatologischen Tumorzelllinien feststellte (ZHANG et al., 2014). Zudem wurde darüber berichtet, dass die kombinierte OV-Gabe die antivirale angeborene Immunantwort zugunsten der erwünschten antitumoralen Immunantwort verzögert und somit die onkolytischen Wirksamkeit steigert. Dies wird beispielsweise bei NDV zusätzlich dadurch begünstigt, dass es bereits nach einmaliger Gabe im Mausmodell die antitumorale Immunantwort moduliert und vergleichbar mit einer Immungedächtnisbildung die erworbene Antitumor-Immunität nachhaltig stärkt (KOKS et al., 2015).

Im Vergleich zur kombinierten OV-Gabe wird durch die mehrmalige Gabe eines onkolytischen Virus durch die zunehmende antivirale Immunantwort die Virusreplikation und folglich die onkolytische Wirksamkeit limitiert (VAHA-KOSKELA et al., 2015).

5.2 Titration und Charakterisierung der neu produzierten RV-Charge 18.1

Für die Versuche dieses Projekts wurden Reoviren des Typs 3 Dearing produziert und aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.3.1). Mithilfe einer RT-PCR wurde die Qualität der Virus-Produktion ermittelt und der Virustiter bestimmt. Der ermittelte Virustiter der RV-Charge 17.1 lag bei $2,64 \times 10^4$ cp/ μ l und war nicht verwertbar, da die ermittelten Konzentrationen der Standard-Proben niedriger als die tatsächlichen Konzentrationen waren. Gründe für diese Diskrepanz können methodische Fehler beispielsweise beim Pipettieren oder einer unzureichenden Lagerung der Reagenzien sein. In einem anschließenden MTT-Assay wurde die Zytotoxizität der neu produzierten RV gemessen und mit einer vergangenen RV-Virusproduktion verglichen. In dieser zeigte sich eine geringere Wirksamkeit der RV-Produktion 18.1 im Vergleich zu der älteren RV-Produktion 17.2, da in allen Virusverdünnungen von 1/1000 cp/c bis 1 cp/c mit über 100 % mehr Tumorzellen enthalten waren als in der Kontrolle. Erst bei einem Virustiter von 10 cp/c wurde ein Zellsterben von 7,2 % der Tumorzellen verzeichnet. Dies ist damit zu erklären, dass die verwendeten Viruskonzentrationen nicht der tatsächlichen Konzentration entsprachen, da ihre Berechnung auf der Referenzkonzentration der Standard-Proben aufbaute.

Im Vergleich wurde mit der bereits existierenden Virusproduktion RV 17.2 mit bekanntem Virustiter eine gute onkolytische Aktivität erzielt. Ca. 14,1 % der Tumorzellen wurden nach einer Infektion mit einer Viruskonzentration von 1/10 cp/c getötet. Bei einer höheren Konzentration (10 cp/c) wurde eine Tumorzellreduktion um weitere 43 % verzeichnet.

Für die Erklärung der Differenz in der Zytotoxizität der beiden RV-Chargen sind weitere Faktoren denkbar. Beispielsweise kann sich das Alter der infizierten Zellen auf die Replikationsfähigkeit auswirken und so zu einer variierenden Zellviabilität nach Infektion führen (TOMASETTI et al., 2019). Darüber hinaus sind insbesondere behüllte Viren in ihrer Lagerung sehr temperaturempfindlich und unzureichende Bedingungen in der Produktion und Lagerung können die Infektiosität negativ beeinflussen (GREIN et al., 2017). Zudem können unterschiedliche Laborerfahrungen der Mitarbeitenden zu Beginn des Versuchs zu methodischen Fehlern wie beispielsweise bei der Titration führen. Diesem steht jedoch eine sorgfältige Supervision bei der Durchführung der RT-PCR entgegen. Weitere mögliche Gründe für die

Abweichungen der PCR können abgelaufene und verunreinigte Chemikalien und ein hohes Zellalter beim anschließenden MTT-Assay darstellen. Da die ermittelte Konzentration der Standardproben nicht mit den Angaben des Herstellers übereinstimmte und sich beim Wechsel von einem auf den nächsten Verdünnungsschritt statt um eine 10er, um eine 100er Potenz unterschied, sind Pipettierfehler am Anfang des Projekts am wahrscheinlichsten für die fehlende Verwertbarkeit der RT-PCR-Ergebnisse anzunehmen. Um diese Frage dennoch eindeutig beantworten zu können, sollten RT-PCR Untersuchungen derselben Virusproduktion zukünftig unabhängig voneinander wiederholt werden.

Der Umstand der fehlenden Verwertbarkeit der neu produzierten RV-Charge hatte für den weiteren Verlauf des Projekts keine negativen Auswirkungen, da auf existierende RV-Produktionen mit vorher durch die Arbeitsgruppe ermitteltem Titer zurückgegriffen werden konnte. Um die Fehleranfälligkeit für die RT-PCR zukünftig zu reduzieren, ist die Etablierung und routinemäßige Anwendung der RT-PCR von hoher Bedeutung. Darüber hinaus können das Aufsetzen laboreigener Protokolle für die Verwendungsdauer eines Zellstocks, die Dokumentation der Zellpassagieranzahl, der routinemäßige Vergleich der Morphologie und des Wachstumsverhaltens der Tumorzellen mit anderen Mitarbeitenden, die die gleiche Zelllinie verwenden, hilfreich sein und bei der retrospektiven Fehlerevaluation unterstützen. Im Falle von Abweichungen oder Auffälligkeiten im Wachstum kann ein parallel geführter Zellstock der gleichen Zelllinie zur Reserve dienen.

Die RT-PCR ist lediglich dazu in der Lage das Virusgenom zu identifizieren und dieses zu quantifizieren. Eine Beurteilung der Infektiosität der produzierten Virus-Charge ist damit nicht möglich. Eine Möglichkeit, die reinen infektiösen Partikel der produzierten Virus-Charge zu ermitteln, stellt ein Plaque-Assay als direktes Nachweisverfahren dar. Dieser Assay wurde allerdings bereits in der Vergangenheit in der Arbeitsgruppe getestet und wies eine hohe Fehleranfälligkeit auf, sodass die Konzentrationsangabe in der Einheit Viruskopien pro Zelle erfolgte (kinderonkologisches Labor der Universität des Saarlandes, persönliche Mitteilung Dr. rer. nat. Ehrhardt, 2018). Von der Ermittlung des Virustiters mittels RT-PCR erhoffte sich die Arbeitsgruppe eine präzisere Auswertung, weshalb die Virustiter-Messung ausschließlich über RT-PCR und ein indirekter Nachweis der Infektiosität anschließend mittels MTT erfolgte.

5.3 Onkolytische Wirksamkeit der OV nach Einzel- und Doppelinfektion

In allen Experimenten dieses Projekts konnte eine starke onkolytische Wirksamkeit nach Einzel- und Doppelinfektion mit RV, PV und NDV in den beiden Glioblastomzelllinien U87 und U373 nachgewiesen werden. Grundlage für diesen Ansatz sind der unterschiedliche Aufbau und damit verbunden die unterschiedlichen Eigenschaften der Viren. Während RV und NDV RNA Einzelstrang-RNA Viren sind und im Zytoplasma replizieren, handelt es sich bei PV um ein Doppelstrang-DNA-Virus, das im Zellkern repliziert. Diese unterschiedlichen Orte der Virusvermehrung innerhalb der Zelle gehen mit unterschiedlichen Eigenschaften der Zelltodinduktion in ebenso variabler Intensität einher.

Darüber hinaus zeigte sich neben einer dosisabhängigen onkolytischen Wirksamkeit eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Denn mit Zunahme der Inkubationszeit nach Infektion bis zur Messung konnte ein verstärktes Zellsterben beobachtet werden. Dies lässt sich auf die längere Replikationszeit des Therapie-Virus zurückführen, da sie sich dadurch stärker vermehren, noch mehr Zellen infizieren und diese schließlich abtöten können.

Bereits eine Infektion mit niedrigen Virustitern beeinträchtigte zu einem frühen Beobachtungszeitpunkt das Tumorzellwachstum. Nahm der verwendete Virustiter weiter zu, nahm die Tumorzellzahl ab. Eine erfolgreiche Virotherapie muss daher zwei Bedingungen erfüllen, um eine Onkolyse auszulösen: 1. Infektion der Tumorzellen durch OV 2. Ausreichend Zeit zur viralen Vermehrung, um vor einem frühzeitigen Zelluntergang weitere Tumorzellen zu infizieren.

Weiterhin war für alle drei verwendeten Viren ein minimaler Infektionstiter nötig, um eine onkolytische Wirkung zu entfalten. Eine solche Bedingung wurde auch in einem mathematischen Modell nach Infektion von RV, PV und NDV geprüft (TITZE et al., 2017). Darüber hinaus konnte in diesem Promotionsprojekt festgestellt werden, dass dies auch in einer sekundären Glioblastomzelllinie U373 und für die Doppelinfektion zutrifft. Bei zunehmender Inkubationszeit zeigte sich in allen Infektionsmodi ein verstärktes Zellsterben, während sich in der mathematischen Modellierung zu späteren Untersuchungszeitpunkten bis über sieben Tagen eine Zunahme der Tumorzellzahl herausstellte.

Die MTT-Untersuchungen analysierten die Zusammenhänge zwischen dem Virustiter und der onkolytischen Wirksamkeit. Sowohl nach einer Einzel- als auch einer Doppelinfection mit allen drei Viren konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden. Diese Befunde entsprechen der aktuellen Forschungsdiskussion. Beispielsweise beschrieb Geletneky et al. eine Abhängigkeit des Zellsterbens von der eingesetzten Virusdosis. Allerdings war in den vorliegenden MTT-Assays die Zytotoxizität nach Infektion von U373 mit 50 cp/c und mit 100 cp/c nicht wesentlich verschieden, welches auf eine Sättigung ab einer gewissen Viruskonzentration hindeutete. Da die MTT-Untersuchungen am Ende des Projekts mit bis zu sechs Monate alten und folglich häufiger passagierten Zellen durchgeführt wurden, sollten die Ergebnisse in zukünftigen Versuchen auch mit weniger oft passagierten Zellen reproduziert werden. Dies ermöglicht es, den Einfluss potenzieller Störvariablen wie Zellularalter und zelluläre Veränderungen infolge häufiger Passagiervorgänge auf die Ergebnisse einschätzen zu können.

Nach NDV-Infektion zeichnete sich sowohl in den MTT-Untersuchungen als auch in den Immunfluoreszenzfärbungen die höchste onkolytische Wirksamkeit unter allen drei OV ab. Darauf folgte die RV-Infektion, die niedrigste onkolytische Wirksamkeit zeigte die PV-Infektion.

Auch nach PV-Infektion lag eine ausgeprägte onkolytische Wirksamkeit in beiden Glioblastomzelllinien vor. Allerdings war die Onkolyse mit zunehmender PV-Dosis weniger stark ausgeprägt als nach RV- und NDV-Infektion. Weiterhin zeigte sich auch, dass ein Zellsterben nach PV-Infektion erst im spätesten untersuchten Zeitraum nachzuweisen war. Dies deckt sich mit dem Wissenstand der Literatur, in der darüber berichtet wird, dass PV im Vergleich zu RV und NDV eine niedrigere onkolytische Aktivität besitzt und sich dies auf zwei Mechanismen zurückführen lässt (ALKASSAR et al., 2011): Damit die infizierte Zelle zugunsten einer ausreichenden Virusvermehrung nicht frühzeitig untergeht, agiert das virale NS1-Protein als Hauptregulator der DNA-Replikation, indem es einen zellulären Signalweg induziert, der zu einer Verlangsamung des Zelltods führt (LACHMANN et al., 2008). Zudem ist PV ausschließlich dazu in der Lage, in Zellen in der S-Phase zu replizieren, da in dieser Phase Transkriptionsfaktoren zur Virusvermehrung überexprimiert sind und ruhende Zellen nicht zu einem Wechsel in die S-Phase anregen kann. Beispielsweise wird durch die CDK1/PKC α -vermittelte Ruptur der Kernhülle der Transport von PV-H1 aus dem Zellkern reguliert (PORWAL et al., 2013). Dies bedingt eine Abhängigkeit vom natürlichen Zellzyklus. Es unterstreicht den Nutzen der Kombination von PV mit weiteren onkolytischen Viren und

anderen Therapiemethoden wie beispielsweise Chemotherapeutika zur Steigerung der onkolytischen Wirksamkeit und darüber hinaus die Wichtigkeit, die zugrundeliegenden Interaktionen zu erforschen (TERRIVEL et al., 2020).

Die ermittelte, hohe onkolytische Wirksamkeit von RV in Glioblastomzelllinien lässt sich mit der Literatur bestätigen (WILCOX et al., 2001). Voraussetzung für die virale onkolytische Wirksamkeit der RVs ist ihr Eintritt in die Zelle über β 1-integrin-abhängige Endozytose (MAGINNIS et al., 2008). Dies gelingt über eine stabile Bindung mit Interaktion des σ 1-Proteins und dem junctional adhesion molecule-A (JAM-A) der Hostzelle (BARTON et al., 2001b). Dabei spielen die zellulären säureabhängigen Cathepsin-B- und -L-Proteasen eine wichtige Rolle, da sie für den Zelleintritt das infectious subvirion particle (ISVP) erzeugen (EBERT et al., 2002). Die starke JAM-A Expression und die hohen Cathepsin-Spiegel in Glioblastomzelllinien begünstigen die RV-Infektion (KONDURI et al., 2001; ROSAGER et al., 2017).

Weiterhin besitzt die PKR wichtige Aufgaben in der Kontrolle der Virusreplikation und der Steuerung des onkolytischen Potenzials. Das σ 3 RV-Protein ist in der Lage, PKR durch Verdecken der viralen dsRNA zu hemmen, da die PKR im Rahmen der IFN-Immunantwort durch die Inaktivierung des eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) die zelluläre Proteinsynthese stoppt (IMANI, JACOBS, 1988; YUE, SHATKIN, 1997). Ras-transformierte Glioblastomzelllinien wie U87 und U373 potenzieren die onkolytische Aktivität der RVs durch zusätzliche Inhibition der PKR-Aktivität. Die Kombination beider Mechanismen führt dazu, dass in infizierten transformierten Zellen keine PKR-Aktivität nachgewiesen wird. Gleichzeitig wird aber die Virusvermehrung für eine wirksame onkolytische Therapie gesteigert, welches sich in der vorliegenden Untersuchung durch ein hohes Zellsterben bestätigte (FERNANDES, 2016; STRONG et al., 1998). Eine weitere Studie berichtete darüber, dass das σ 3-Protein eine Nekroptose-limitierende Funktion besitzt und unabhängig von der Bindung der dsRNA ist (ROEBKE et al., 2020). Das Ausmaß dieser Hemmung ist allerdings unklar.

Die effektivste Einzelinfektion in beiden Glioblastomzelllinien war die NDV-Einzelinfektion, da nach dieser Infektion die stärkste Onkolyse in allen beobachteten Zeiträumen nachgewiesen werden konnte. Damit konnten die in der aktuellen Forschungsliteratur beschriebenen Erfahrungen mit der onkolytischen Wirksamkeit der NDV bestätigt werden (ALKASSAR et al.,

2011). Allerdings zeigten unsere Untersuchungen, dass deutlich höhere Virustiter für eine effektive Onkolyse nötig waren.

Auch nach Infektion mit niedrigen NDV-Titern stellten wir einen dämpfenden Effekt auf das Tumorzellwachstum bei gleichzeitiger Zunahme sterbender Zellen fest. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Wu et al., nach denen für eine erfolgreiche onkolytische Therapie ein Gleichgewicht zwischen Infektionsrate und Zellsterberate herrschen sollte (WU et al., 2001). Zudem wird ein Zusammenhang zwischen dem Tumorzellwachstum und der Tumorsensitivität von NDV beschrieben. Demnach erwies sich die Rho GTPase Rac1, die zur Ras Superfamilie der Onkogene gehört und einen essenziellen Faktor für das Tumorzellwachstum darstellt, als Voraussetzung für die NDV-Replikation (ABDULLAH et al., 2014; PUHLMANN et al., 2010).

In den vorliegenden Untersuchungen führte bereits die kombinierte OV-Therapie mit niedrigen Viruskonzentrationen, in denen nach Einzelinfektion noch kein Zellsterben nachweisbar war, zu einem Zellsterben. Sie stellte sich insofern als effektiver heraus. Bereits in der Vergangenheit wurde beschrieben, dass für die erfolgreiche Bekämpfung von heterogenen Tumoren wie beispielsweise das GBM, Viruskombinationen eine wichtige Rolle spielen können (KAREV et al., 2006).

NDVs können nicht in gewöhnlichen Zellen replizieren, da sie durch die Immunantwort gestoppt werden. In Tumorzellen, wie z.B. U87 und U373 Zellen, liegen durch Defekte in der IFN-Antwort ideale Voraussetzungen vor, um einer verfrühten Erkennung durch das Immunsystem zu entkommen und für eine Onkolyse adäquat zu replizieren (HONDA et al., 2005).

RV und NDV bedienen sich beide eines konstitutiv aktiven Ras/Raf1/MEK/ERK-Signalwegs, der durch Hemmung der Autophosphorylierung der PKR die IFN-Immunantwort hemmt und dadurch die Infektion verstärkt. Dies stellt einen weiteren Erklärungsansatz für einen Synergismus nach Doppelinfektion dar (GUO et al., 2008).

Der Vergleich der Ergebnisse des MTT nach Infektion von U87 und U373 zeigt, dass sich ihr unterschiedlicher Ursprung auf das Ausmaß des Zellsterbens auswirkt. Bei U87 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie eines primären Glioblastoms, während U373 Glioblastomzellen einem sekundären Glioblastom entstammen.

Abweichend der von Alkassar et al. publizierten Ergebnisse, die in allen Einzelinfektionen ein vermindertes Zellsterben in U373 im Vergleich zu U87 ermittelten, wurde ein verstärktes Zellsterben nach NDV-Infektion gemessen (ALKASSAR et al., 2011). Grund hierfür könnte die Zunahme des IFN-Defekts durch häufige Passagiervorgänge der U373 sein. Ebenso kann es durch diese zu genetischen Drifts in der Glioblastomzelllinie kommen, die einerseits zu erhöhten Zellwachstumsraten und andererseits zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber NDV-Infektionen führen (TORSVIK et al., 2014). Diese Vermutung lässt sich damit begründen, dass die MTTs der U373 mit NDV am Ende des Projekts erfolgten, eine variierende Morphologie aufwiesen und im Vergleich zu Beginn des Projekts kürzere Intervalle zwischen Passagiervorgängen erforderlich waren.

Auch nach Infektion beider Glioblastomzelllinien mit RVs korrelierte die Höhe des Infektionstiters mit der onkolytischen Wirksamkeit. Da mehr U87- als U373-Zellen starben, unterscheiden sie sich jedoch in ihrem Ausmaß. Choi et al. berichteten in einer vergleichenden Studie darüber, dass U373 Zellen nicht in der Lage sind, Apoptose über den extrinsischen Signalweg einzuleiten (CHOI et al., 2004). Dies stellt einen Grund für das verminderte Zellsterben nach U373 dar, da RV hauptsächlich über diesen Weg Apoptose induziert. Darüber hinaus wirkt sich die unterschiedliche Ras-Aktivität, bedingt durch die primäre bzw. sekundäre Genese der Glioblastomzelllinien, auf die Replikationsfähigkeit der Zellen aus. Denn Ras-Transformationen beeinflussen das Ausmaß der RV-Onkolyse, indem sie das virale Uncoating, die Partikelinfektiosität und die Apoptose in Gang setzen (MARCATO et al., 2007). Zudem nehmen sie Einfluss auf die MAP-Kinase, deren Aktivität mit einer hohen zellulären Replikationsfähigkeit assoziiert ist (CLARKE et al., 2005).

Nach PV-Infektion starben deutlich mehr U87 als U373, was auf eine potenzielle zellspezifische onkolytische Wirksamkeit hindeutet und sich mit einer unterschiedlichen Zellverteilung in der PV-günstigen S-Zellphase erklären lässt (LU et al., 2009). Allerdings wurde der Zellzyklus der von uns verwendeten U87 und U373 nicht bestimmt.

In den Immunfluoreszenzfärbungen nach PV-Infektion änderte sich die Tumorzellzahl nicht signifikant. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass neu synthetisierte Zellen den regulären Zellzyklus durchlaufen, da PVs ausschließlich in Zellen der S-Phase replizieren und in diesen

zum Zelluntergang führen können. Diese Annahme ist zudem vereinbar mit der simultanen Zunahme sterbender Zellen.

Nach NDV-Infektion beider Glioblastomzelllinien wurden ausgeprägte Onkolysen beobachtet, die sich im Ausmaß nicht sonderlich voneinander unterschieden. Bedingung für eine effektive Replikation der NDV nach erfolgter Infektion ist lediglich eine defekte IFN-Antwort, die in den von uns verwendeten Tumorzellen vorliegt. Hierbei nimmt das virale Nichtstrukturprotein V eine wichtige Rolle ein, da es die Replikationsfähigkeit von NDV sichert und es vor antiviralen Mechanismen schützt, indem es durch selektive Bindung des STAT1-Proteins (signal transducers and activators of transcription 1 protein) als Interferon-Antagonist agiert (HUANG et al., 2003).

Nach kombinierter OV-Infektion von U87 Zellen wurde ein verstärktes Zellsterben erzielt. Dies lässt sich mit einer gemeinsamen Replikations-Aktivität in der infizierten Zelle nach Co-Infektion begründen (ALKASSAR et al., 2011). Weiterhin könnte das verstärkte Zellsterben auf Synergien schließen lassen, die nach kombinierter OV-Gabe durch die Begünstigung der Infektionsbedingungen der jeweiligen Viren entstehen. Der Ansatz dieses Promotionsprojekts bietet somit vielversprechende Erkenntnisse über die vorliegenden Zelltodarten nach Einzel- und Doppelinfektion, deren zugrundeliegende Pathomechanismen und potenzielle Interaktionen noch zu erforschen sind.

Abweichend von der NDV-Einzelinfektion resultierte die kombinierte Gabe von NDV mit einem weiteren Virus bereits in niedriger Viruskonzentration in einer ausgeprägten Abnahme des relativen Überlebens der Tumorzellen. In den Immunfluoreszenzfärbungen konnte diese Beobachtung auf ein vorliegendes Zellsterben zurückgeführt werden. Damit einhergehend beobachteten wir das größte Zellsterben nach Kombination von RV und NDV sowie PV und NDV.

Das Ausbleiben einer vollständigen Tumorzellregression nach Einzelinfektion mit RV, PV und NDV bahnt den Weg zum Ansatz einer kombinierten OV-Therapie. Hier konnte ein vermehrtes Zellsterben nachgewiesen werden, allerdings blieb weiterhin eine vollständige Tumorzellregression aus. Zwar wurde in einer Studie von Wilcox et al. von einer vollständigen Tumorregression in frühen Glioblastom-Stadien berichtet, allerdings wurden dort immundefiziente Mäuse in einem längeren Untersuchungszeitraum untersucht (WILCOX et al., 2001).

Grundsätzlich würde eine kombinierte Infektion es ermöglichen, eine verminderte onkolytische Wirksamkeit durch die Entstehung neutralisierender Antikörper bei einer Einzelinfektion im Rahmen der antiviralen Immunantwort zu umgehen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die neutralisierenden Antikörper bedingt durch die hohe Durchseuchung der RVs in der Umwelt den RV-vermittelten immunogenen Zelltod potenzieren (BERKELEY et al., 2018). Diese Erkenntnisse brechen mit dem Dogma, dass die neutralisierenden Antikörper die onkolytische Aktivität einschränken würden (TSAI et al., 2004). Zudem kann die Untersuchung des immunologischen Zelltods nach Doppelinfektion und seiner Auswirkungen auf die Tumormikro-umgebung zukünftig wichtige Erkenntnisse liefern.

Besonders nach NDV-Infektion der U87 neigten die Glioblastomzellen dazu miteinander zu verklumpen. Diese lässt sich mit einem vollständigen Verlust der Membranintegrität durch die hohe Zytotoxizität von NDV, typisch für den Zelltod mittels Nekrose, erklären. Sie erschwerte die Quantifizierung der sterbenden Zellen in der Immunfluoreszenz, sodass für eine Charakterisierung des Zellsterbens auf die U373 Zellen gewechselt wurde. Allerdings sollten unsere Ergebnisse zukünftig mit weiteren primären Glioblastomzellen untersucht und verglichen werden, die nicht dazu neigen zu verklumpen, um eine Zellspezifität der beobachteten Effekte auszuschließen.

Auch die methodischen Limitationen der vorliegenden Arbeit sollen thematisiert werden: Trotz dreifacher Wiederholung der Versuche mit je fünf bis sechs Ansätzen weisen die Ergebnisse eine hohe Standardabweichung auf. Dementsprechend sind zukünftig Versuche in höherer Ansatz- oder Wiederholungszahl sowie verschiedenen Produktionen des gleichen Virus notwendig, um auch in statistischen Analysen Signifikanzen aufdecken und den Einfluss unwissentlicher Verunreinigungen sowohl zu identifizieren als auch reduzieren zu können.

Über die Dauer des gesamten Promotionsprojekts war es unmöglich, die gleichen Zellstöcke und Virusproduktionen zu verwenden. Sie können sich jedoch in ihrer Qualität unterscheiden und damit die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse schmälern. Um diesem Faktor möglichst gut entgegenzuwirken, wurden die Virustiter in der RT-PCR vorab gemessen und anschließend die Zytotoxizität mit einem MTT evaluiert. Zudem wurden bei der Auswahl der MTT-Ergebnisse für die Arbeit drei repräsentative Messergebnisse ($n = 3$) zusammengefasst. Allerdings sollte zukünftig eine zum Plaque-Assay alternative, zuvor zu etablierende Methode

angewendet werden, mit der die Anzahl der infektiösen Partikel quantifiziert und eine präzisere Vergleichbarkeit der Virusproduktionen ermöglicht werden kann.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass die Zellen erst nach vorheriger Zubereitung aller Virusverdünnungen für die Einzel- und Doppelinfektion infiziert wurden. Zuerst erfolgte die Einzelinfektion der Tumorzellen in der Reihenfolge RV, PV und NDV und im Anschluss die Doppelinfektion in der Reihenfolge RV+PV, RV+NDV und PV+NDV, was aufgrund der Menge der zu infizierenden Zellansätze zu einer zeitlichen Latenz von bis 40 bis 50 mins führte und die Ergebnisse durch eine längere Inkubationszeit der einzeln infizierten Zellplatten, aber auch durch die prolongierte Lagerung der Virusverdünnungen für die Doppelinfektion unter der Zellbank bei RT beeinflussen kann.

Abweichend von den Studien von Alkassar et al. und Zhang et al., in denen Doppelinfektionen in einem 1:1-Verhältnis untersucht wurden, infizierten wir in einem abweichenden Ansatz in einem 0,5:0,5-Verhältnis (ALKASSAR et al., 2011; ZHANG et al., 2014). Daher konnte in der IF und FACS-Analyse nach Doppelinfektion kein verstärktes Zellsterben nach Doppelinfektion gegenüber der Einzelinfektion nachgewiesen werden. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass die Messung mittels FACS-Analyse und IF in früheren Zeiträumen und mit niedrigeren Virustitern erfolgte als in den MTTs. Da sich dennoch im MTT nach Doppelinfektion ein stärkere onkolytische Wirksamkeit zeigte als nach Einzelinfektion, konnten wir zeigen, dass höhere Viruskonzentrationen und längere Inkubationszeiten für eine wirksame Doppelinfektion nötig sind.

5.4 Zelltodarten nach einer Einzelinfektion und kombinierten RV- und PV-Infektion

Mit der FACS-Analyse wurden die Nekroptose- und Apoptose-Induktion nach RV-Einzelinfektion nachgewiesen. Abhängig von der Inkubationszeit wurden unterschiedliche Zelltodarten induziert. Nach PV-Einzelinfektion lag eine geringfügige Apoptose- und Nekroseinduktion vor, die im Verlauf zu einer Zelltodinduktion mittels Nekrose und Nekroptose umschwang.

Die Zunahme des Zellsterbens bei Zunahme der verabreichten Virusdosis ließ sich mit einem Anstieg der untersuchten Zelltodaktivitäten in der Fluoreszenzmikroskopie erklären. Dass die Immunfluoreszenzuntersuchungen nach Doppelinfektion kein erhöhtes Zellsterben zeigen, könnte an dem niedrigeren verwendeten Virustiter, sowie der kürzeren Inkubationszeit liegen. Denn durch die 72h Inkubation für den MTT-Assay stand den Tumorzellen mehr Zeit zu Verfügung, um ihren Stoffwechsel anzupassen. Außerdem hatten die Viren dadurch mehr Zeit für die Replikation. Beim MTT handelt es sich um eine Labormethode, bei der die Umsetzung des Substrats Formazan, stellvertretend für die Stoffwechselaktivität und in diesem Fall das zelluläre relative Überleben, gemessen wird. Bei der Interpretation der Experimente mit dieser Labormethode wurde stets berücksichtigt, dass mit dem MTT-Assay lediglich indirekt die Anzahl sterbender Zellen wiedergegeben werden kann, da die Stoffwechselaktivität reaktiv infolge einer Infektion auch erhöht sein kann (VAN TONDER et al., 2015).

Allerdings variierten auch nach Doppelinfektion abhängig vom untersuchten Inkubationszeitraum die detektierten Zelltode, was daran liegen könnte, dass abhängig vom Untersuchungszeitpunkt, unterschiedliche Zelltodarten induziert wurden.

Bereits 4h nach RV-Infektion konnte durch erhöhte Caspase-3/7-Spiegel die Zelltodinduktion über die caspase-abhängige Apoptose nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität lag nach 8h vor. Damit konnten wir die in der FACS-Analyse gemessene Apoptose-Aktivität bestätigen. Der detektierte Apoptose-Zelltod nach RV-Infektion wird durch den extrinsischen und intrinsischen Signalweg eingeleitet. Durch Sekretion proapoptotischer Zytokine, wie dem TRAIL, wird die extrinsische Apoptose induziert. Über eine Signalkaskade rekrutieren Todesrezeptoren (DR4 u. 5) dann Adaptorproteine wie Fas-associated death domain (FADD), die miteinander einen Komplex bilden und die reguläre Caspase-Kaskade in Gang setzen

(CLARKE et al., 2000; RICHARDSON-BURNS et al., 2002). Die intrinsische Apoptose wird durch Virusinteraktion mit der Mitochondrienmembran und konsekutive Translokation des Apoptose-Mediators Smac/DIABLO in das Zytosol transloziert und über Bid, einem Bcl-2 Protein, eingeleitet (DANTHI et al., 2010; RICHARDSON-BURNS et al., 2002). Zudem wird vermutet, dass die Bestandteile des viralen Kapsids in der Lage sind den programmierten Zelltod einzuleiten, indem sie beispielsweise die Membranpenetration vermitteln oder über das μ 1-Protein die Mitochondrienmembran destabilisieren (COFFEY et al., 2006).

In den beiden untersuchten Zeiträumen ließ sich eine Nekroptose-Induktion nachweisen, deren Aktivität mit Zunahme des Inkubationszeitraums und der applizierten Virusdosis zunahm. Damit konnten wir einen weiteren Beleg dafür finden, dass RV über nicht-apoptotische Zelltodmechanismen, wie beispielsweise Nekroptose, den Zelltod einleiten kann und damit einen hohen Stellenwert in der Induktion des immunogenen Zelltods einnimmt (BERGER et al., 2017). Da das virale σ 3-Protein durch Hemmung der PKR die Nekroptose-Induktion reguliert, lässt sich der Anstieg der Nekroptose-Aktivität auf eine unzureichende Hemmung infolge der Zunahme von DAMPs durch die massive OV-vermittelte Zellschädigung zurückführen (ROEBKE et al., 2020).

Die niedrige Nekrose-Aktivität nach RV-Infektion und gleichzeitig starke Induktion von Zellersterben über die programmierten Zelltodarten weisen RV als ein geeignetes Therapiemittel aus. Damit gilt es zukünftig zu klären, welche Rolle eine Doppelinfektion als Therapiekonzept spielen kann und wie sie sich auf die Induktion des immunogenen Zelltods auswirkt. Für eine Doppelinfektion spricht unter anderem, dass nach einer Doppelinfektion erhöhte Nekroptose-Aktivitäten nachweisbar sind, die man mit dem immunogenen Zelltod assoziiert.

Berger et al. berichteten über einen 2-Schritte-Prozess, durch den die Nekroptose nach RV-Infektion induziert wird. Zunächst wird die virale RNA durch RNA-Zytoplasmasensoren erkannt und eine IFN-Antwort eingeleitet. Im zweiten Schritt interagiert ein bisher unbekanntes ISG, welches durch die IFN-Antwort freigesetzt worden ist, mit neusynthetisierter viraler dsRNA und leitet die Nekroptose ein (BERGER et al., 2017). Diese Erklärungen decken sich mit den Erkenntnissen des Promotionsprojekts, da mit Zunahme der Inkubationszeit hauptsächlich Nekroptose detektiert wurde und diese mit dem vermehrten Vorliegen neusynthetisierter dsRNA einhergeht.

Zusätzlich wird die RV-induzierte Apoptose und Nekrose zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Virusinfektion eingeleitet (HILLER et al., 2015).

Überdies zeigen die Ergebnisse, dass nach RV-Infektion neben der regulären Form der Nekrose als Zeichen der zellulären Erschöpfung auch der regulierte Nekrose-Zelltod mittels Nekroptose induziert wird. Hierbei handelt es sich um eine Form des immunogenen Zelltods. Da in in vitro Ansätzen langfristig alle apoptotischen Zellen durch das Fehlen von Phagozyten nicht verdaut werden können und stattdessen sekundär nekrotisieren, ist die Kenntnis über die Möglichkeit des Zelltods über diese beiden unterschiedlichen Entitäten essenziell (ROGERS et al., 2017).

Dies stellt wiederum eine methodische Limitation der FACS-Analyse dar und sollte zukünftig um weitere Untersuchungen ergänzt werden, um differenzieren zu können, ob es sich bei den Annexin-V und PI doppelt positiven Zellen, um apoptotische Zellen, die sekundär aufgrund fehlender Phagozyten nekrotisch werden, oder um primär nekroptotische Zellen handelt. Eine Möglichkeit dies zu prüfen, stellt die Anwendung von Zelltodinhhibitoren, wie beispielsweise Necrostatin-1, für die Nekroptose dar.

Aus den in diesem Promotionsprojekt generierten Ergebnissen der RV-Infektion können folgende Erkenntnisse abgeleitet werden: Durch die Untersuchung mehrerer Zelltodarten konnte nicht nur die Induktion eines bestimmten Zelltods nachgewiesen, sondern diese auch miteinander ins Verhältnis gesetzt werden, um ihren Anteil an der effektiven Onkolyse abzuschätzen. Das Wissen über die simultane Induktion verschiedener Zelltodarten gibt Anlass für weitere Forschungen, ob diese in Wechselwirkung stehen oder miteinander interagieren. Der Nachweis über das Vorliegen regulierter und programmierter Zelltodarten kann im Gegensatz zum unregulierten und unkontrollierbaren Zelltod die Grundlage dafür schaffen, die onkolytische Therapie zukünftig steuern und ihren Therapieerfolg besser abschätzen zu können.

Die Diskrepanz in der nachgewiesenen Apoptose-Aktivität nach Doppelinfektion mit RV und PV im Caspase-Assay und der ausbleibende Nachweis an erhöhten Annexin-V im FACS lassen sich insofern miteinander vereinbaren, da Phosphatidylserin, an welches Annexin-V bindet, als Apoptose-Marker erst mit zelltodbedingten Änderungen der Plasmamembran auf die Außenseite flippet. Die Effektorcaspasen-3/7 könnten allerdings schon vorher induziert sein. Allerdings steht dies im Widerspruch mit der gegenwärtigen Literatur, die die Detektion von

Phosphatidylserin mithilfe von Annexin-V als sehr sensitiven Marker deklariert. Dies muss in zukünftigen Untersuchungen mit Glioblastomzelllinien weiter evaluiert werden (DONG et al., 2011).

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass PV-H1 nach Infektion von Glioblastomzelllinien das Zellsterben durch mehrere Zelltodarten induziert. Neben geringfügiger Apoptose wiesen wir mit Zunahme der Inkubationszeit einen Shift zu ausgeprägter Nekroptose und Nekrose nach. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Angelova et al. überein (ANGELOVA et al., 2009). Überdies konnten wir die Fähigkeit, Nekroptose zu induzieren in Glioblastomzellen zeigen. Dies wurde zuvor lediglich in pankreatischen Zellen durch Verwendung des Nekroptose-Inhibitors Necrostatin-1 nachgewiesen (ANGELOVA et al., 2014).

Mit der Infektion der Glioblastomzelllinien fanden wir einen Hinweis dafür, dass die beobachteten Zelltodarten durch PV-H1 zelltypunabhängig auch in Glioblastomzellen nachweisbar sind.

Die Apoptose-Aktivität nach PV-Infektion war von allen untersuchten Zelltodarten am niedrigsten. Dies liegt daran, dass einerseits die verwendete Viruskonzentration zu niedrig für eine ausgeprägte onkolytische Aktivität war und andererseits in Gliomzellen die zellulären Überlebensfaktoren der BCL2-Familie überexprimiert sind und zur zellulären Resistenz gegenüber Apoptose-Induktoren beitragen (STEGH et al., 2007). Weiterhin induziert PV-H1 in Gliomzellen neben geringfügiger Apoptose ROS-vermittelt (reactive oxygen species) über den intrinsischen Signalweg den Zelltod über weitere Arten (DI PIAZZA et al., 2007; HRISTOV et al., 2010).

Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde neben der Induktion des nicht programmierten und nicht regulierten Zelltods durch Nekrose insbesondere der favorisierte programmierte und regulierte Zelltod durch Apoptose und Nekroptose in Glioblastomzellen nachgewiesen, welches die Stellung dieses Virus als geeignetes Virus für eine steuerbare und schonende onkolytische Therapie untermauert.

In der Literatur wurde weiterhin über die Fähigkeit der PV-H1 berichtet, den Autophagie-Zelltod induzieren zu können. Nach Zellinfektion entstehen durch das NS1-Protein reaktive Sauerstoffspezies, die durch Doppelstrangbrüche nicht nur mit der Apoptose-, sondern auch Autophagie-Induktion einhergehen (SCHERZ-SHOVAL, ELAZAR, 2007).

Neben dem direkten zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen ist die Einleitung des immunologischen Zelltods über zwei Wege möglich: 1. Die Stress-Induktion im endoplasmatischen Retikulum durch das SAT-Protein. 2. Die Freisetzung tumorassoziierter Antigene mittels der molekularen Alarmsignale (damage-associated molecular patterns (DAMPs) und pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) (GREKOVA et al., 2012; MESZAROS et al., 2017).

Der PV-vermittelte Zelltod durch Nekrose, dessen Aktivität mit einer längeren Inkubationszeit zunahm, ist der Literatur zufolge zelltypspezifisch und mit einem erhöhten NAD-Verbrauch nach Zellinfektion zu erklären (RAN et al., 1999).

Nach Doppelinfektion von U87 mit RV und PV wurde im MTT nach 72h eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber der jeweiligen Einzelinfektion nachgewiesen. Dass diese Beobachtung in den folgenden Versuchen nicht mit einer erhöhten Zelltodaktivität bestätigt werden konnte, liegt am ehesten daran, dass die verwendeten Viruskonzentrationen in der FACS-Analyse und Immunfluoreszenz niedriger als im MTT war. Darüber hinaus war der Inkubationszeitraum in der FACS-Analyse kürzer. Eine erhöhte onkolytische Wirksamkeit nach Doppelinfektion ist damit vereinbar, dass nach RV-Infektion die Anzahl der Zellen in der S-Phase zunimmt und PV ausschließlich in dieser Phase replizieren kann (ROULSTONE et al., 2013).

Nach Doppelinfektion mit RV und PV sowie RV-Einzelinfektion wird der Zelltod über Nekroptose in etwa gleich hoher Intensität induziert. Da es sich bei der Nekroptose um einen immunogenen Zelltod handelt, deutet dies auf das Vorliegen vielversprechender Ergebnisse für eine erfolgreiche onkolytische Therapie.

Nach Doppelinfektion von U87 mit RV und PV wurde eine erhöhte Caspase-Aktivität nachgewiesen. Diese vermehrte Apoptose-Induktion war im Caspase-Assay nach 24h und im FACS nach 48h nach Infektion mit 10 cp/c zu verzeichnen. Die Latenz könnte an der besonders hohen Sensitivität des Caspase-Assays liegen. Alternativ ist es auch denkbar, dass in den Zellen eine unterschiedlich hohe Zellzahl ausgesät war. Nichtsdestotrotz konnten wir eine erhöhte Induktion der caspase-abhängigen Apoptose nach Doppelinfektion von RV mit PV gegenüber der Einzelinfektion beweisen und somit zu einem fundierten Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen und die sich daraus ergebende Notwendigkeit, diese für eine erfolgreiche Glioblastomtherapie zu untersuchen, beitragen.

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen der gemeinsamen Zelltod-Induktion nach kombinierter Gabe von OV sind weitgehend ungeklärt. Denkbar ist, dass sich die zelluläre Suszeptibilität nach kombinierter viraler Infektion zur Einleitung des Zelltods durch die Expression von Zytokinen erhöht, die deshalb zukünftig untersucht werden müssen. In der Studie von Alkassar et al. aus unserer Arbeitsgruppe wurde in der Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass die von uns verwendeten Viren nach kombinierter Infektion dieselbe Zelle infizieren können (ALKASSAR et al., 2011).

Demnach unterschieden sich die induzierten Zelltode nach RV- und PV-Einzelfektion von denen der Doppelfektion mit RV und PV, da nach RV-Einzelfektion im Zeitverlauf hauptsächlich Apoptose und Nekroptose und nach PV-Einzelfektion primär Nekrose und Nekroptose nachgewiesen wurde. Nach Doppelfektion wurden alle drei untersuchten Zelltodarten induziert, die auch zum Teil mit einer erhöhten onkolytische Wirksamkeit gegenüber der Einzelfektion einhergehen.

Da in Studien dem immunologischen Zelltod eine höhere onkolytische Wirksamkeit gegenüber der direkten Onkolyse durch die Virusinfektion beigemessen wird, aber ein Zusammenhang und potenzielle Interaktionen zwischen den von uns untersuchten Zelltodarten Apoptose, Nekroptose und Nekrose und der Induktion des immunologischen Zelltods weitgehend ungeklärt ist, stellt dies ein wichtiges zukünftiges Forschungsfeld dar.

5.5 Zelltodarten nach einer Einzelinfektion und kombinierten RV- und NDV-Infektion

Abhängig vom Untersuchungszeitpunkt variierte der hauptsächlich vorliegende Zelltod. Je länger die Inkubationszeit, desto höhere Aktivitäten der programmierten Zelltodarten Apoptose und Nekroptose wurden gemessen. Zudem konnte bereits nach vierstündiger Inkubation eine caspase-abhängige Apoptose-Induktion nachgewiesen werden.

Sowohl in der FACS-Analyse als auch im CaspaseGlo-3/7-Assay konnten wir die Apoptose-Induktion nach NDV-Einzelinfektion nachweisen. In der Literatur wurde darüber berichtet, dass die von uns detektierte Apoptose-Induktion caspase-abhängig sowohl über intrinsische als auch extrinsische Signalwege erfolgt (ELANKUMARAN et al., 2006). Nach Infektion der Tumorzellen wird die Zytokinproduktion und damit auch das Apoptose-Signal der Wirtszelle zur Onkolyse eingeleitet (RAIHAN et al., 2019). Über Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und Hochregulierung des TRAIL wird die Caspase-8 aktiviert, die wiederum die extrinsische Apoptose einleitet (LIANG et al., 2017) und schließlich Bid und tBid freisetzt. Diese übertragen die Apoptose-Signale auf die Mitochondrien. Über die Änderung der Permeabilität der Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom C führt dies konsekutiv zur intrinsischen Apoptoseeinleitung (USHMOROV et al., 1999).

Weiterhin wurde nach NDV-Einzelinfektion die Nekroptose-Induktion nachgewiesen. Damit konnten wir die Ergebnisse von Koks et al. bestätigen, die die Nekroptose-Aktivität nach NDV-Infektion in der Glioblastomzelllinie GL261 zeigten (KOKS et al., 2015). In der gleichen Studie wurden nach NDV-Infektion typische Marker (Calreticulin und HMGB1) des immunogenen Zelltods nachgewiesen, welche auf die Induktion von ER-Stress durch die p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) zurückzuführen ist (BIAN et al., 2011; REN et al., 2019). Der Zusammenhang der beiden Zelltod-Induktionen und die zugrundeliegenden Signalwege der Zelltodinduktion müssen zukünftig erforscht werden.

Um die Integrität des Genoms zu schützen und auf den metabolischen Stress der Infektion zu reagieren, kann die Zelle den Zelltod auch mittels Autophagie induzieren (CHUN, KIM, 2018). In der frühen Phase der Autophagie nach NDV-Infektion wird die Replikation und das Überleben des Virus durch Verhinderung der vorzeitigen Virusfreisetzung gefördert. Ist das Virus adäquat repliziert, führt die Autophagie in einem späteren Stadium der Infektion zu

einem hohen Ausmaß an Zellsterben, welches darauf hinweist, dass die Autophagie sich positiv auf die antitumorale Wirkung von NDV auswirkt (MENG et al., 2012). Beide Wege stellen wichtige Signalwege für die Aktivierung des immunologischen Zelltods dar.

Die in unseren Experimenten nachgewiesene Nekrose-Induktion nach NDV-Infektion bestätigt die Ergebnisse der Literatur, laut der die Nekrose-Induktion auf die NDV-vermittelte Zytokin- (IFN-I und TNF α vermittelt) und Chemokin-Expression (RANTES und IP-10 vermittelt) zurückzuführen ist (LIAO et al., 2017). Allerdings ließ sich die Nekrose-Aktivität lediglich nach 24h nachweisen.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen nach RV- und PV-Doppelinfection im Zeitverlauf wies sowohl nekrosetypische, anschwellende Zellkerne als auch apoptotic bodies-ähnliche Strukturen nach, was darauf schließen lässt, dass die primäre und sekundäre Nekrose-Induktion erfolgte. Diese Differenzierung lässt sich vornehmen, da sekundär nekrotische Zellen in der FACS-Analyse Annexin-V und PI doppelt positiv und primär nekrotische Zellen ausschließlich PI einzeln positiv waren. Eine weitergehende Untersuchung und Differenzierung der nekroptotischen Zellen von den apoptotischen Zellen, die sekundär in vitro nekrotisch werden, kann auch an dieser Stelle zukünftig durch den Einsatz des Nekroptose-Inhibitors Necrostatin-1 erfolgen.

Nach Doppelinfection mit RV und NDV wurden hauptsächlich Nekroptose und Nekrose nachgewiesen. Damit unterschieden sich die nachgewiesenen Zelltodarten nach Doppelinfection nicht von einer NDV-Einzelinfection. Da auch das Zellsterben nach NDV-Einzelinfection in den anderen Experimenten fast so stark wie nach Doppelinfection war, reichten die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Viren für die Doppelinfectionen wahrscheinlich nicht aus, sodass die detektierte onkolytische Wirksamkeit am ehesten hauptsächlich NDV-vermittelt war. Damit konnte der erhoffte Effekt nicht über alle Versuchsreihen hinweg nachgewiesen werden. Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass höhere Viruskonzentrationen und längere Inkubationszeiten untersucht werden sollten, um eine stärkere onkolytische Wirksamkeit nach Doppelinfection nachzuweisen, wie dies die beobachteten Effekte des MTT zeigten.

Im Caspase-Assay wurde die caspase-abhängige Apoptose-Induktion in allen beobachteten Zeiträumen nachgewiesen und stieg mit Zunahme der Inkubationszeit an. Allerdings waren die Caspase-Aktivitäten niedriger als nach NDV-Einzelfektion.

RV und NDV machen sich für die Replikation die tumorzellspezifische, defekte Interferon-Antwort zunutze und hemmen die Immunantwort zugunsten einer ausreichenden Virusvermehrung über die Phosphorylierung von eIF α 2 durch PKR. Vor diesem Hintergrund sollten zukünftig der Stellenwert der Doppelfektion im Vergleich zur Einzelfektion mit höheren Virustitern und die damit einhergehenden Zelltodarten und auch die zeitversetzte Infektion geprüft werden.

5.6 Zelltodarten nach einer Einzelinfektion und kombinierten PV- und NDV-Infektion

Zusammengefasst gingen die Glioblastomzelllinien nach Doppelinfektion mit PV und NDV in den untersuchten Zeiträumen andere Zelltodarten ein als nach jeweiliger Einzelinfektion. Auch die Zelltodarten wiesen eine Zeitspezifität auf. Die kombinierte Infektion führte zu einem zeitabhängigen Anstieg der Caspase-abhängigen Apoptose-Induktion. Im spätesten Untersuchungszeitpunkt war die Caspasen-3/7-Aktivität höher als die jeweiligen Einzelinfektionen.

Nach Doppelinfektion mit PV und NDV wurden die Glioblastomzellen zunächst konzentrationsabhängig nekrotisch, nekroptotisch und zu einem geringen Anteil apoptotisch. Im Zeitverlauf überwog der Nekroptose-Zelltod. Zum 24h Untersuchungszeitpunkt waren mehr Zellen nach Doppelinfektion mit PV und NDV nekrotisch als nach NDV-Einzelinfektion. Denkbar ist, dass die erhöhte Nekrose-Aktivität auf die Zugabe von PV zu NDV zurückzuführen ist. Jedoch führt eine NDV-Infektion laut Wang et al. zu einer Konversion der Zellen aus der S-Phase in die G0/G1-Phase mit Zellzyklus-Arrest (WANG et al., 2018). Dies würde sich negativ auf die PV-Replikation auswirken, da PV auf essenzielle Faktoren der zellulären S-Phase angewiesen ist, um zu replizieren. Folglich stehen die Ergebnisse von Wang et al. im Gegensatz zu unserer Ausgangshypothese. Jedoch unterstreichen sie die Erkenntnis, dass bei niedrigen Virustitern bei kombinierter Infektion von PV und NDV insgesamt weniger Zelltod induziert wird als nach NDV-Einzelinfektion. Daher sollte zukünftig geklärt werden, inwiefern sich die kombinierte Gabe der Viren auf den Zellzyklus auswirkt und wie die zellulären Mechanismen miteinander interagieren. Insbesondere zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass in den späten Untersuchungszeitpunkten ab 48h vermehrt sterbende Zellen nachzuweisen waren.

Da die Zellen bereits nach NDV-Einzelinfektion einer starken Apoptose-Induktion ausgesetzt sind und die nachgewiesenen Caspase-Aktivitäten nach PV-Einzelinfektionen zu allen untersuchten Zeitpunkten sehr niedrig waren, wurde erst nach 24h eine geringfügig höhere Caspase-Aktivität gemessen. Diese geringe Aktivität nach Doppelinfektion lässt sich am wahrscheinlichsten darauf zurückführen, dass die verwendeten Virustiter nicht ausreichten, um eine stärkere Apoptose-Aktivität zu indizieren. Da PV erst frühestens nach 72h im MTT einen stärkeren onkolytischen Effekt entfaltete, war der Untersuchungszeitpunkt für die Caspase-Aktivität

für PV zu früh. Dazu kommt, dass die Doppelinfektion in einem 0,5:0,5 Verhältnis erfolgte, sodass die Gesamtkonzentration synonym zur Einzelinfektion war.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bereits die Hälfte der verwendeten Dosis pro Virus bei Kombination eines schwach onkolytischen Virus, wie PV, mit einem stark onkolytischen Virus, wie NDV, eine mindestens gleichwertige Apoptose-Induktion hervorruft. Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen zeit- und konzentrationsabhängigen Zytotoxizität ist damit der Weg geebnet, in zukünftigen Doppelinfektionen höhere Virustiter beispielsweise im 1:1 Verhältnis und längere Inkubationszeiten zu untersuchen und mögliche Signifikanzen nach Doppelinfektion nachzuweisen.

Nach Doppelinfektion mit PV und NDV ermittelten wir die höchste Caspase-Aktivität. Denn hier war die caspase-abhängige Apoptose-Aktivität nach 24h am höchsten, während die allgemeine Apoptose-Aktivität im Verlauf nach 48h niedriger war. Dies bietet einen weiteren Beleg dafür, dass sich die dominierenden Zelltodarten nach Doppelinfektion zeitabhängig änderten. Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit nicht bekannt. Denkbar ist, dass sich für die Apoptose-Induktion die Eigenschaften der jeweiligen onkolytischen Viren PV und NDV ergänzen, da PV hauptsächlich extrinsisch Apoptose induziert, während PV und NDV in der Lage sind sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Signalweg Apoptose zu induzieren. Die Ergebnisse unterstützen dies, da nach PV-Einzelinfektion unabhängig von der Inkubationszeit grundsätzlich niedrige Apoptose-Aktivitäten gemessen wurden.

Trotz dessen war die Caspase-Aktivität 24h nach Doppelinfektion mit PV und NDV höher als nach Doppelinfektion mit RV und NDV, was damit erklärbar ist, dass die Zellen dann eher nekroptotisch werden. Ob sich RV und NDV in ihrer Fähigkeit einen Zellzyklusarrest induzieren zu können, gegenseitig hemmen oder sogar ergänzen bleibt offen. Ob dieser Effekt zelllinienspezifisch ist, sollte zukünftig geprüft werden.

5.7 Zukünftige Aufgaben in der Forschung

Diese Arbeit zeigte, dass die Doppelinfektionen mit RV und PV, sowie RV und NDV eine zelltypabhängige höhere onkolytische Wirksamkeit nach simultaner Infektion besitzen. Allerdings waren die Unterschiede nicht so stark ausgeprägt wie erwartet und die onkolytische Aktivität für die Kombination aus RV und NDV war ähnlich hoch wie nach NDV-Einzelinfektion.

Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen Dosis-Wirkungskurve nach Einzel- und Doppelinfektion ist die Beantwortung der Frage nach den Ursachen äquivalenter Zelltodaktivitäten nach Doppelinfektion trotz Verwendung der Hälfte der Viruskonzentration im Vergleich zur jeweiligen Einzelinfektion von Bedeutung.

Neben der zelllinienspezifischen Zytotoxizität sollte geklärt werden, ob auch den ermittelten Zelltodarten nach Einzel- und Doppelinfektion eine Zelllinienspezifität zugrunde liegt.

Weiterhin sollten die Versuche in einer höheren Anzahl mit größeren Ansätzen, höheren Viruskonzentrationen und verschiedenen Produktionen des gleichen Virus durchgeführt werden, um potenzielle Signifikanzen und virustypische Eigenschaften aufzudecken. Die Doppelinfektion sollte zukünftig in einem 1:1-Verhältnis erfolgen, um den additiven Effekt der Doppelinfektion genauer eruieren zu können. Mit einer Verlängerung der Inkubationszeit nach Infektion sollte geprüft werden, ob mit einer Doppelinfektion im vorgeschlagenen Setting eine vollständige Tumorregrression möglich ist. Zudem sollten unsere Ergebnisse unter in vivo Bedingungen geprüft werden.

Zudem sollten die direkten Auswirkungen der kombinierten Therapie auf die Induktion des immunogenen Zelltods beispielsweise durch Messung der Marker des immunogenen Zelltods ATP, HMGB1 und Calreticulin erfolgen. Hier könnte der Einsatz zelltodspezifischer Inhibitoren zur Stützung und Bestätigung der eigenen Befunde dienen.

Langfristig sollten weitere Settings für die kombinierte Gabe der OV für eine möglichst hohe onkolytische Wirksamkeit geprüft werden und ob es darunter zur Resistenzvermeidung kommt. Denkbar ist auch die alternierende Gabe onkolytischer Viren, um die Stärken der jeweiligen Viren beispielsweise hinsichtlich der Replikationsgeschwindigkeit zugunsten einer höheren Wirksamkeit abzustimmen, oder auch die Doppelinfektion mit einem etablierten Verfahren wie der Radiochemotherapie zu kombinieren. Ein bisheriger mathematischer

Modellierungsansatz lässt außen vor, dass eine Zelle von mehreren Viren infiziert werden kann (TITZE et al., 2017). Das schwächere Virus der OV-Kombination könnte dazu dienen, die Zelle durch Sensing empfänglicher für eine weitere Virusinfektion zu machen und die vorzeitige Immunantwort zugunsten einer ausreichenden Virusreplikation zu verzögern.

Von den 12 bisher bekannten Arten von Zelltod wurden in der vorliegenden Arbeit drei untersucht. Zukünftig sollten nach OV-infizierte Tumorzellen auch auf weitere potenziell vorliegende Zelltode untersucht werden, um ihre Bedeutung für das OV-induzierte Zellsterben zu ermitteln.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Induktion der Zelltode nach OV-Infektion untersucht wurde, sollten zukünftige Untersuchungen dazu dienen, die dafür verantwortlichen viralen Bestandteile und Signalwege zu identifizieren. Diese Erkenntnisse könnten dann eines Tages dazu beitragen, beispielsweise über virales genetic engineering neue Viren mit den gewünschten Effekten unter Vermeidung der ungewünschten Effekte zu konstruieren.

Da sich das Glioblastom durch seine starke intra- und intertumorale Heterogenität auszeichnet, ist der weiterführende Nutzen der OV, aufbauend auf den in dieser Arbeit generierten Erkenntnissen, im Tiermodell zu untersuchen. Dabei kann die Frage beantwortet werden, ob neben der simultanen OV-Infektion der Glioblastomzellen, die Zellen auch empfänglicher für eine Infektion mit einem zweiten Virus werden, nachdem sie bereits mit einem Virus infiziert wurden. Weiterhin kann der Mehrwert einer kombinierten Virusinfektion vor dem Hintergrund Tumorerheterogenität geprüft werden. So könnte beispielsweise eine weniger für das eine onkolytische Virus empfängliche Tumorzelle durch ein anderes onkolytisches Virus infiziert werden. Der Stellenwert auf die Tumorerregression und das Tumormikromilieu ist bislang ungeklärt.

Zukünftiges Ziel der Erforschung der onkolytischen Therapie des Glioblastoms ist die Entwicklung einer individualisierten Therapie für eine bislang unheilbare Tumorerkrankung, um damit das Leben von Glioblastompatienten zu verlängern. Erreicht werden kann dies unter anderem über die Erforschung zugrundeliegender Pathomechanismen und Interaktionen bei kombinierter Gabe von onkolytischen Viren und das Verstehen ihrer Rolle in der Induktion eines möglichst effektiven und nachhaltigen immunogenen Zelltods.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdullah JM, Mustafa Z, Ideris A (2014) Newcastle Disease Virus Interaction in Targeted Therapy against Proliferation and Invasion Pathways of Glioblastoma Multiforme. *BioMed Research International* 2014:386470
2. Alain T, Kim TS, Lun X, Liacini A, Schiff LA, Senger DL, Forsyth PA (2007) Proteolytic disassembly is a critical determinant for reovirus oncolysis. *Mol Ther* 15:1512-1521
3. Alamares JG, Elankumaran S, Samal SK, Iorio RM (2010) The interferon antagonistic activities of the V proteins from two strains of Newcastle disease virus correlate with their known virulence properties. *Virus Res* 147:153-157
4. Alexander DJ (2000) Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* 19:443-462
5. Alkassar M, Gartner B, Roemer K, Graesser F, Rommelaere J, Kaestner L, Haeckel I, Graf N (2011) The combined effects of oncolytic reovirus plus Newcastle disease virus and reovirus plus parvovirus on U87 and U373 cells in vitro and in vivo. *J Neurooncol* 104:715-727
6. Angelova AL, Aprahamian M, Balboni G, Delecluse H-J, Feederle R, Kiprianova I, Grekova SP, Galabov AS, Witzens-Harig M, Ho AD, Rommelaere J, Raykov Z (2009) Oncolytic Rat Parvovirus H-1PV, a Candidate for the Treatment of Human Lymphoma: In Vitro and In Vivo Studies. *Mol Ther* 17:1164-1172
7. Angelova AL, Grekova SP, Heller A, Kuhlmann O, Soyka E, Giese T, Aprahamian M, Bour G, Ruffer S, Cziepluch C, Daeffler L, Rommelaere J, Werner J, Raykov Z, Giese NA (2014) Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol* 88:5263-5276
8. Antczak JB, Joklik WK (1992) Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology* 187:760-776
9. Attoui H, Biagini P, Stirling J, Mertens PP, Cantaloube JF, Meyer A, de Micco P, de Lamballerie X (2001) Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae. *Biochem Biophys Res Commun* 287:583-588
10. Barton ES, Connolly JL, Forrest JC, Chappell JD, Dermody TS (2001a) Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J Biol Chem* 276:2200-2211

11. Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, Chappell JD, Liu Y, Schnell FJ, Nusrat A, Parkos CA, Dermody TS (2001b) Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104:441-451
12. Battcock SM, Collier TW, Zu D, Hirasawa K (2006) Negative regulation of the alpha interferon-induced antiviral response by the Ras/Raf/MEK pathway. *J Virol* 80:4422-4430
13. Bello MB, Yusoff K, Ideris A, Hair-Bejo M, Jibril AH, Peeters BPH, Omar AR (2020) Exploring the Prospects of Engineered Newcastle Disease Virus in Modern Vaccinology. *Viruses* 12
14. Berger AK, Hiller BE, Thete D, Snyder AJ, Perez E, Jr., Upton JW, Danthi P (2017) Viral RNA at Two Stages of Reovirus Infection Is Required for the Induction of Necroptosis. *J Virol* 91
15. Berkeley RA, Steele LP, Mulder AA, van den Wollenberg DJM, Kottke TJ, Thompson J, Coffey M, Hoeben RC, Vile RG, Melcher A, Ilett EJ (2018) Antibody-Neutralized Reovirus Is Effective in Oncolytic Virotherapy. *Cancer Immunol Res* 6:1161-1173
16. Bernstein JJ, Woodard CA (1995) Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery* 36:124-132; discussion 132
17. Bian J, Wang K, Kong X, Liu H, Chen F, Hu M, Zhang X, Jiao X, Ge B, Wu Y, Meng S (2011) Caspase- and p38-MAPK-dependent induction of apoptosis in A549 lung cancer cells by Newcastle disease virus. *Arch Virol* 156:1335-1344
18. Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D, Mulholland P (2018) Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br J Cancer* 119:1171-1181
19. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395-1413
20. Cancer Genome Atlas Research N (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-1068
21. Chesney J, Puzanov I, Collichio F, Singh P, Milhem MM, Glaspy J, Hamid O, Ross M, Friedlander P, Garbe C, Logan TF, Hauschild A, Lebbe C, Chen L, Kim JJ, Gansert J, Andtbacka RHI, Kaufman HL (2018) Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol* 36:1658-1667
22. Choi C, Jeong E, Benveniste EN (2004) Caspase-1 mediates Fas-induced apoptosis and is up-regulated by interferon-gamma in human astrocytoma cells. *J Neurooncol* 67:167-176
23. Chun Y, Kim J (2018) Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells* 7
24. Claes A, Idema AJ, Wesseling P (2007) Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* 114:443-458

25. Clarke P, Meintzer SM, Gibson S, Widmann C, Garrington TP, Johnson GL, Tyler KL (2000) Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *J Virol* 74:8135-8139
26. Clarke P, Debiase RL, Goody R, Hoyt CC, Richardson-Burns S, Tyler KL (2005) Mechanisms of reovirus-induced cell death and tissue injury: role of apoptosis and virus-induced perturbation of host-cell signaling and transcription factor activation. *Viral Immunol* 18:89-115
27. Coffey CM, Sheh A, Kim IS, Chandran K, Nibert ML, Parker JS (2006) Reovirus outer capsid protein micro1 induces apoptosis and associates with lipid droplets, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *J Virol* 80:8422-8438
28. Conzelmann K-K (2004) Reverse Genetics Of Mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:1-41
29. Corbau R, Salomé N, Rommelaere J, Nüesch JPF (1999) Phosphorylation of the Viral Nonstructural Protein NS1 during MVMP Infection of A9 Cells. *Virology* 259:402-415
30. Cotmore SF, Tattersall P (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33:91-174
31. Cotmore SF, Tattersall P (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 70:183-232
32. Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, et al. (1993) Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 85:704-710
33. Dalet A, Gatti E, Pierre P (2015) Integration of PKR-dependent translation inhibition with innate immunity is required for a coordinated anti-viral response. *FEBS Lett* 589:1539-1545
34. Danthi P, Pruijssers AJ, Berger AK, Holm GH, Zinkel SS, Dermody TS (2010) Bid regulates the pathogenesis of neurotropic reovirus. *PLoS Pathog* 6:e1000980
35. Danthi P, Holm GH, Stehle T, Dermody TS (2013) Reovirus receptors, cell entry, and proapoptotic signaling. *Adv Exp Med Biol* 790:42-71
36. Day JM (2009) The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides. *Infect Genet Evol* 9:390-400
37. Delgado-Martin B, Medina MA (2020) Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. *Adv Sci (Weinh)* 7:1902971
38. Dermody TS, Parker JSL, Sherry B (2013). Orthoreoviruses. In *Fields Virology*, Fields BN, DM Knipe, HP M, eds. (Lippincott, Williams, and Wilkins), pp. 1304-1346.

39. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol* 81:4186-4198
40. Di Pietro R, Zauli G (2004) Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 201:331-340
41. Dong HP, Holth A, Ruud MG, Emilsen E, Risberg B, Davidson B (2011) Measurement of apoptosis in cytological specimens by flow cytometry: comparison of Annexin V, caspase cleavage and dUTP incorporation assays. *Cytopathology* 22:365-372
42. Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS (2002) Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* 277:24609-24617
43. Elankumaran S, Rockemann D, Samal SK (2006) Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol* 80:7522-7534
44. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516
45. Faisst S, Schlehofer JR, zur Hausen H (1989) Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J Virol* 63:2152-2158
46. Faisst S, Perros M, Deleu L, Spruyt N, Rommelaere J (1994) Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* 202:466-470
47. Farrell CJ, Plotkin SR (2007) Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurol Clin* 25:925-946
48. Feoktistova M, Leverkus M (2015) Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J* 282:19-31
49. Fernandes J (2016) Oncogenes: The Passport for Viral Oncolysis Through PKR Inhibition. *Biomark Cancer* 8:101-110
50. Ferreira T, Kulkarni A, Bretscher C, Richter K, Ehrlich M, Marchini A (2020) Oncolytic H-1 Parvovirus Enters Cancer Cells through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Viruses* 12:1199
51. Fiocco U, Accordi B, Martini V, Oliviero F, Facco M, Cabrelle A, Piva L, Molena B, Caso F, Costa L, Scanu A, Pagnin E, Atteno M, Scarpa R, Basso G, Semenzato G, Punzi L, Doria A, Dayer JM (2014) JAK/STAT/PKCdelta molecular pathways in synovial fluid T lymphocytes reflect the in vivo T helper-17 expansion in psoriatic arthritis. *Immunol Res* 58:61-69
52. Fiola C, Peeters B, Fournier P, Arnold A, Bucur M, Schirmacher V (2006) Tumor selective replication of Newcastle disease virus: Association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer* 119:328-338

53. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL (2007) Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin* 25:867-890
54. Fournier P, Zeng J, Von Der Lieth CW, Washburn B, Ahlert T, Schirmacher V (2004) Importance of serine 200 for functional activities of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol* 24:623-634
55. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E, Irving CS, Galun E, Siegal T (2006) Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* 13:221-228
56. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, Garcia-Saez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jaattela M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Munoz-Pinedo C, Nagata S, Nunez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25:486-541
57. Geletneky K, Hartkopf AD, Krempien R, Rommelaere J, Schlehofer JR (2010) Improved killing of human high-grade glioma cells by combining ionizing radiation with oncolytic parvovirus H-1 infection. *J Biomed Biotechnol* 2010:350748

58. Gesundheit B, Ben-David E, Posen Y, Ellis R, Wollmann G, Schneider EM, Aigner K, Brauns L, Nesselhut T, Ackva I, Weisslein C, Thaller A (2020) Effective Treatment of Glioblastoma Multiforme With Oncolytic Virotherapy: A Case-Series. *Front Oncol* 10:702
59. Goepfert K, Dinsart C, Rommelaere J, Foerster F, Moehler M (2019) Rational Combination of Parvovirus H1 With CTLA-4 and PD-1 Checkpoint Inhibitors Dampens the Tumor Induced Immune Silencing. *Front Oncol* 9:425
60. Grein TA, Weidner T, Czermak P (2017). Concepts for the Production of Viruses and Viral Vectors in Cell Cultures. In *New Insights into Cell Culture Technology*.
61. Grekova SP, Raykov Z, Zawatzky R, Rommelaere J, Koch U (2012) Activation of a glioma-specific immune response by oncolytic parvovirus Minute Virus of Mice infection. *Cancer Gene Ther* 19:468-475
62. Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL (2008) Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim Biophys Acta* 1785:217-231
63. Halder S, Nam HJ, Govindasamy L, Vogel M, Dinsart C, Salome N, McKenna R, Agbandje-McKenna M (2013) Structural characterization of H-1 parvovirus: comparison of infectious virions to empty capsids. *J Virol* 87:5128-5140
64. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
65. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I (2011) Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System. *Clin Cancer Res* 17:2619
66. Hiller BE, Berger AK, Danthi P (2015) Viral gene expression potentiates reovirus-induced necrosis. *Virology* 484:386-394
67. Hofer S, Bullinger L, Dierlamm J, Grosu A-L, Hau P, Hense J, Pflugshaupt T, Matthias Preusser, Proescholdt M, Pukrop T, Rushing EJ, Sinn M, Wörmann B (2019). Leitlinie Gliome im Erwachsenenalter (onkopedia.com, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.)
68. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777
69. Hristov G, Krämer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A (2010) Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J Virol* 84:5909

70. Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, Samal SK (2003) Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol* 77:8676-8685
71. Imani F, Jacobs BL (1988) Inhibitory activity for the interferon-induced protein kinase is associated with the reovirus serotype 1 sigma 3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7887-7891
72. Inda MM, Bonavia R, Seoane J (2014) Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers (Basel)* 6:226-239
73. Jongeneel CV, Sahli R, McMaster GK, Hirt B (1986) A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* 59:564-573
74. Karapanagiotou EM, Roulstone V, Twigger K, Ball M, Tanay M, Nutting C, Newbold K, Gore ME, Larkin J, Syrigos KN, Coffey M, Thompson B, Mettinger K, Vile RG, Pandha HS, Hall GD, Melcher AA, Chester J, Harrington KJ (2012) Phase I/II trial of carboplatin and paclitaxel chemotherapy in combination with intravenous oncolytic reovirus in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 18:2080-2089
75. Karev GP, Novozhilov AS, Koonin EV (2006) Mathematical modeling of tumor therapy with oncolytic viruses: effects of parametric heterogeneity on cell dynamics. *Biol Direct* 1:30
76. King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* 20:3282-3291
77. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588
78. Koks CA, Garg AD, Ehrhardt M, Riva M, Vandenberk L, Boon L, De Vleeschouwer S, Agostinis P, Graf N, Van Gool SW (2015) Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int J Cancer* 136:E313-325
79. Konduri S, Lakka SS, Tasiou A, Yanamandra N, Gondi CS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS (2001) Elevated levels of cathepsin B in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol* 19:519-524
80. Kozak M, Shatkin AJ (1978) Identification of features in 5' terminal fragments from reovirus mRNA which are important for ribosome binding. *Cell* 13:201-212
81. Lachmann S, Bar S, Rommelaere J, Nuesch JP (2008) Parvovirus interference with intracellular signalling: mechanism of PKC ϵ activation in MVM-infected A9 fibroblasts. *Cell Microbiol* 10:755-769

82. Lamb RA, Parks GD (2013). Paramyxoviridae. In *Fields Virology*, Fields BN, DM Knipe, HP M, eds. (Lippincott, Williams, and Wilkins), pp. 957-995.
83. Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265-267
84. Lee J-H, Chiang C, Gack MU (2019) Endogenous Nucleic Acid Recognition by RIG-I-Like Receptors and cGAS. *J Interferon Cytokine Res* 39:450-458
85. Legrand C, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P (1993) MVM(p) NS-2 Protein Expression Is Required with NS-1 for Maximal Cytotoxicity in Human Transformed Cells. *Virology* 195:149-155
86. Levy DE, Marie IJ, Durbin JE (2011) Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol* 1:476-486
87. Li Q, Wei D, Feng F, Wang XL, Li C, Chen ZN, Bian H (2017) alpha2,6-linked sialic acid serves as a high-affinity receptor for cancer oncolytic virotherapy with Newcastle disease virus. *J Cancer Res Clin Oncol* 143:2171-2181
88. Liang S, Lin X, Liang Y, Song D, Zhang L, Fan X (2019) Killing Effects of IFN R(-/-) Mouse NK Cells Activated by HN Protein of NDV on Mouse Hepatoma Cells and Possible Mechanism with Syk and NF-kappaB. *Anat Rec (Hoboken)* 302:1718-1725
89. Liang Y, Song DZ, Liang S, Zhang ZF, Gao LX, Fan XH (2017) The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus upregulates expression of the TRAIL gene in murine natural killer cells through the activation of Syk and NF-kappaB. *PLoS One* 12:e0178746
90. Liao Y, Wang HX, Mao X, Fang H, Wang H, Li Y, Sun Y, Meng C, Tan L, Song C, Qiu X, Ding C (2017) RIP1 is a central signaling protein in regulation of TNF-alpha/TRAIL mediated apoptosis and necroptosis during Newcastle disease virus infection. *Oncotarget* 8:43201-43217
91. Liu P, Chen S, Wang M, Cheng A (2017) The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle. *Virol J* 14:80-80
92. Lopez-Bueno A, Rubio MP, Bryant N, McKenna R, Agbandje-McKenna M, Almendral JM (2006) Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80:1563-1573
93. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803-820

94. Lu J, Kovach JS, Johnson F, Chiang J, Hodes R, Lonser R, Zhuang Z (2009) Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11697-11702
95. Maginnis MS, Mainou BA, Derdowski A, Johnson EM, Zent R, Dermody TS (2008) NPXY motifs in the beta1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus entry. *J Virol* 82:3181-3191
96. Mahalingam D, Wilkinson GA, Eng KH, Fields P, Raber P, Moseley JL, Cheetham K, Coffey M, Nuovo G, Kalinski P, Zhang B, Arora SP, Fountzilas C (2020) Pembrolizumab in Combination with the Oncolytic Virus Pelareorep and Chemotherapy in Patients with Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase Ib Study. *Clin Cancer Res* 26:71-81
97. Marcato P, Shmulevitz M, Pan D, Stoltz D, Lee PW (2007) Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Mol Ther* 15:1522-1530
98. Martikainen M, Essand M (2019) Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel)* 11
99. Meng C, Zhou Z, Jiang K, Yu S, Jia L, Wu Y, Liu Y, Meng S, Ding C (2012) Newcastle disease virus triggers autophagy in U251 glioma cells to enhance virus replication. *Arch Virol* 157:1011-1018
100. Meszaros I, Toth R, Olasz F, Tijssen P, Zadori Z (2017) The SAT Protein of Porcine Parvovirus Accelerates Viral Spreading through Induction of Irreversible Endoplasmic Reticulum Stress. *J Virol* 91
101. Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ (2001) Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther* 8:158-167
102. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
103. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, Okamoto T, Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS (2013) The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* 39:443-453
104. Nagai Y, Hamaguchi M, Toyoda T (1989) Molecular biology of Newcastle disease virus. *Prog Vet Microbiol Immunol* 5:16-64

105. Norman KL, Hirasawa K, Yang AD, Shields MA, Lee PW (2004) Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11099-11104
106. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764-772
107. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS (2014) The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16:896-913
108. Peeters BP, Gruijthuisen YK, de Leeuw OS, Gielkens AL (2000) Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol* 145:1829-1845
109. Penzes JJ, Soderlund-Venermo M, Canuti M, Eis-Hubinger AM, Hughes J, Cotmore SF, Harrach B (2020) Reorganizing the family Parvoviridae: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch Virol* 165:2133-2146
110. Porwal M, Cohen S, Snoussi K, Popa-Wagner R, Anderson F, Dugot-Senant N, Wodrich H, Dinsart C, Kleinschmidt JA, Panté N, Kann M (2013) Parvoviruses Cause Nuclear Envelope Breakdown by Activating Key Enzymes of Mitosis. *PLoS Pathog* 9:e1003671
111. Promega (2018). TECHNICAL BULLETIN Caspase-Glo® 3/7 Assay (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>)
112. Puhlmann J, Puehler F, Mumberg D, Boukamp P, Beier R (2010) Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus. *Oncogene* 29:2205-2216
113. Raihan J, Ahmad U, Yong YK, Eshak Z, Othman F, Ideris A (2019) Regression of solid breast tumours in mice by Newcastle disease virus is associated with production of apoptosis related-cytokines. *BMC Cancer* 19:315
114. Ran Z-H, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65:161-174
115. Ren S, Rehman ZU, Shi M, Yang B, Liu P, Yin Y, Qu Y, Meng C, Yang Z, Gao X, Sun Y, Ding C (2019) Hemagglutinin-neuraminidase and fusion proteins of virulent Newcastle disease virus cooperatively disturb fusion–fission homeostasis to enhance mitochondrial function by activating the unfolded protein response of endoplasmic reticulum and mitochondrial stress. *Vet Res* 50:37

116. Richardson-Burns SM, Kominsky DJ, Tyler KL (2002) Reovirus-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase 3 and is associated with the activation of death receptors. *J Neurovirol* 8:365-380
117. Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907
118. Rius-Rocabert S, Garcia-Romero N, Garcia A, Ayuso-Sacido A, Nistal-Villan E (2020) Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors. *Int J Mol Sci* 21
119. Roebke KE, Guo Y, Parker JSL, Danthi P (2020) Reovirus sigma3 Protein Limits Interferon Expression and Cell Death Induction. *J Virol* 94
120. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES (2017) Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun* 8:14128
121. Rosager AM, Sorensen MD, Dahlrot RH, Boldt HB, Hansen S, Lathia JD, Kristensen BW (2017) Expression and prognostic value of JAM-A in gliomas. *J Neurooncol* 135:107-117
122. Rosen L (1960) Serologic grouping of reoviruses by hemagglutination-inhibition. *Am J Hyg* 71:242-249
123. Roulstone V, Twigger K, Zaidi S, Pencavel T, Kyula JN, White C, McLaughlin M, Seth R, Karapanagiotou EM, Mansfield D, Coffey M, Nuovo G, Vile RG, Pandha HS, Melcher AA, Harrington KJ (2013) Synergistic cytotoxicity of oncolytic reovirus in combination with cisplatin-paclitaxel doublet chemotherapy. *Gene Ther* 20:521-528
124. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353:811-822
125. Scherer H (1940) Cerebral astrocytomas and their derivatives. *The American Journal of Cancer* 40:159-198
126. Scherz-Shouval R, Elazar Z (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17:422-427
127. Schirmacher V, Griesbach A, Ahlert T (2001) Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: Local versus systemic effects. *Int J Oncol* 18:945-952
128. Schirmacher V (2017) Immunobiology of Newcastle Disease Virus and Its Use for Prophylactic Vaccination in Poultry and as Adjuvant for Therapeutic Vaccination in Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 18
129. Schirmacher V, van Gool S, Stuecker W (2019) Breaking Therapy Resistance: An Update on Oncolytic Newcastle Disease Virus for Improvements of Cancer Therapy. *Biomedicines* 7

130. Schmitz S, Desel C (2018). Der Experimentator Zellbiologie. In (Springer Spektrum), pp. 89, 131-148.
131. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513-545
132. Schwaiger T, Knittler MR, Grund C, Roemer-Oberdoerfer A, Kapp JF, Lerch MM, Mettenleiter TC, Mayerle J, Blohm U (2017) Newcastle disease virus mediates pancreatic tumor rejection via NK cell activation and prevents cancer relapse by prompting adaptive immunity. *Int J Cancer* 141:2505-2516
133. Shatkin AJ, Sipe JD, Loh P (1968) Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Virol* 2:986-991
134. Shmulevitz M, Lee PW (2012) Exploring host factors that impact reovirus replication, dissemination, and reovirus-induced cell death in cancer versus normal cells in culture. *Methods Mol Biol* 797:163-176
135. Sinkovics JG, Horvath JC (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol* 16:1-15
136. Soomro SH, Ting LR, Qing YY, Ren M (2017) Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *J Pak Med Assoc* 67:1410-1414
137. Spalholz BA, Tattersall P (1983) Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* 46:937-943
138. Stegh AH, Kim H, Bachoo RM, Forloney KL, Zhang J, Schulze H, Park K, Hannon GJ, Yuan J, Louis DN, DePinho RA, Chin L (2007) Bcl2L12 inhibits post-mitochondrial apoptosis signaling in glioblastoma. *Genes Dev* 21:98-111
139. Strong JE, Tang D, Lee PW (1993) Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* 197:405-411
140. Strong JE, Lee PW (1996) The v-erbB oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection. *J Virol* 70:612-616
141. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PW (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* 17:3351-3362
142. Stuart JD, Holm GH, Boehme KW (2018) Differential Delivery of Genomic Double-Stranded RNA Causes Reovirus Strain-Specific Differences in Interferon Regulatory Factor 3 Activation. *J Virol* 92
143. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso

- AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM (2012) Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22:425-437
144. Tan L, Zhang Y, Zhan Y, Yuan Y, Sun Y, Qiu X, Meng C, Song C, Liao Y, Ding C (2016) Newcastle disease virus employs macropinocytosis and Rab5a-dependent intracellular trafficking to infect DF-1 cells. *Oncotarget* 7:86117-86133
145. Tattersall P, Cawte PJ, Shatkin AJ, Ward DC (1976) Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J Virol* 20:273-289
146. Telerman A, Tuynder M, Dupressoir T, Robaye B, Sigaux F, Shaulian E, Oren M, Rommelaere J, Amson R (1993) A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8702-8706
147. Terrivel M, Gromicho C, Matos AM (2020) Oncolytic viruses: what to expect from their use in cancer treatment. *Microbiol Immunol* 64:477-492
148. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:1985-1996
149. Titze MI, Frank J, Ehrhardt M, Smola S, Graf N, Lehr T (2017) A generic viral dynamic model to systematically characterize the interaction between oncolytic virus kinetics and tumor growth. *Eur J Pharm Sci* 97:38-46
150. Tomasetti C, Poling J, Roberts NJ, London NR, Jr., Pittman ME, Haffner MC, Rizzo A, Baras A, Karim B, Kim A, Heaphy CM, Meeker AK, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue CA, Vogelstein B (2019) Cell division rates decrease with age, providing a potential explanation for the age-dependent deceleration in cancer incidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:20482-20488
151. Toolan HW, Dalldore G, Barclay M, Chandra S, Moore AE (1960) An Unidentified, Filtrable Agent Isolated from Transplanted Human Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46:1256-1258

152. Torsvik A, Stieber D, Enger PO, Golebiewska A, Molven A, Svendsen A, Westermarck B, Niclou SP, Olsen TK, Chekenya Enger M, Bjerkgvig R (2014) U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Med* 3:812-824
153. Tsai V, Johnson DE, Rahman A, Wen SF, LaFace D, Philopena J, Nery J, Zepeda M, Maneval DC, Demers GW, Ralston R (2004) Impact of human neutralizing antibodies on antitumor efficacy of an oncolytic adenovirus in a murine model. *Clin Cancer Res* 10:7199-7206
154. Umansky V, Shatrov VA, Lehmann V, Schirmmacher V (1996) Induction of NO synthesis in macrophages by Newcastle disease virus is associated with activation of nuclear factor-kappa B. *Int Immunol* 8:491-498
155. Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Droge W, Schirmmacher V, Umansky V (1999) Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood* 93:2342-2352
156. Vaha-Koskela M, Tahtinen S, Gronberg-Vaha-Koskela S, Taipale K, Saha D, Merisalo-Soikkeli M, Ahonen M, Rouvinen-Lagerstrom N, Hirvinen M, Veckman V, Matikainen S, Zhao F, Pakarinen P, Salo J, Kanerva A, Cerullo V, Hemminki A (2015) Overcoming tumor resistance by heterologous adeno-poxvirus combination therapy. *Mol Ther Oncolytics* 1:14006
157. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 8:47
158. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033
159. Wang X, Dang R, Yang Z (2019) The interferon antagonistic activities of the V proteins of NDV correlated with their virulence. *Virus Genes* 55:233-237
160. Wang Y, Wang R, Li Y, Sun Y, Song C, Zhan Y, Tan L, Liao Y, Meng C, Qiu X, Ding C (2018) Newcastle disease virus induces G0/G1 cell cycle arrest in asynchronously growing cells. *Virology* 520:67-74
161. Wells A (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31:637-643
162. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359:492-507
163. Whelan SPJ, Barr JN, Wertz GW (2004). Transcription and Replication of Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses. In *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Kawaoka Y, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 61-119.

164. Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, Shi ZQ, Johnston RN, Nishikawa S, Lee PW, Forsyth PA (2001) Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst* 93:903-912
165. Wu JT, Byrne HM, Kirn DH, Wein LM (2001) Modeling and analysis of a virus that replicates selectively in tumor cells. *Bull Math Biol* 63:731-768
166. Xie T, Peng W, Yan C, Wu J, Gong X, Shi Y (2013) Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell Rep* 5:70-78
167. Yamamoto SP, Motooka D, Egawa K, Kaida A, Hirai Y, Kubo H, Motomura K, Nakamura S, Iritani N (2020) Novel human reovirus isolated from children and its long-term circulation with reassortments. *Sci Rep* 10:963
168. Yue Z, Shatkin AJ (1997) Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is regulated by reovirus structural proteins. *Virology* 234:364-371
169. Yusoff K, Tan WS (2001) Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol* 30:439-455
170. Zamarin D, Palese P (2012) Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol* 7:347-367
171. Zhang LF, Tan DQ, Jeyasekharan AD, Hsieh WS, Ho AS, Ichiyama K, Ye M, Pang B, Ohba K, Liu X, de Mel S, Cuong BK, Chng WJ, Ryo A, Suzuki Y, Yeoh KG, Toan NL, Yamamoto N (2014) Combination of vaccine-strain measles and mumps virus synergistically kills a wide range of human hematological cancer cells: Special focus on acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 354:272-280
172. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, Liu ZG (2012) Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5322-5327

7 Publikation und Danksagung

7.1 Publikation

Ein Manuskript zur Veröffentlichung der vorliegenden Doktorarbeit ist in Bearbeitung.

Selejan SR, Linz D, Mauz M, Hohl M, **Huynh AKD**, Speer T, Wintrich J, Kazakov A, Werner Ch, Mahfoud F, Böhm M - Renal denervation reduces atrial remodelling in hypertensive rats with metabolic syndrome – Basic Research in Cardiology (2022)

Huynh AKD, Wißmüller M, Hohmann C, Adler J, Gerhardt F, Dumitrescu D, Rosenkranz S – Successful delivery of twins via cesarean section in week 33 in high-risk pregnancy of a patient with known pulmonary arterial hypertension (Einreichung geplant)

7.2 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Norbert Graf für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas, die freundliche und kompetente Beratung und die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich Ihm, als meinen Mentor, für die Unterstützung, sein offenes Ohr, die Ratschläge und gemeinsamen Projekte im und neben dem Studium, die mir Wege eröffneten, von denen ich selbst nicht glaubte, dass sie existierten.

Besonders möchte ich mich bei meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau PD Dr. Walch-Rückheim für ihre Unterstützung und Ratschläge bei der Durchführung der Experimente, sowie ihrem wertvollen Feedback im Schreibprozess bedanken.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Smola über die Möglichkeit bedanken, die Experimente in Ihren Laboren durchführen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt Ursel und Tanja Tänzer für die geduldige Einarbeitung und Supervision im Labor, die mir ermöglichten in einem geschützten Umfeld in der Laborarbeit Fuß zu fassen.

Danke an meine Freund:innen Magdalena, Irja, Regine und Robert für das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Quoc Dung Huynh und Diem Khanh Pham-Huynh und meinen Geschwistern Anh Minh Philipp und Anh Phuc David, die mich bedingungslos unterstützen und auf die ich mich jederzeit verlassen kann. Mẹ và ba ơi, es erforderte damals großen Mut in der Nachkriegsphase die Entscheidung zu treffen, von heute auf morgen alles stehen und liegen zu lassen, um aus der geliebten Heimat in Vietnam zu fliehen und in einem fremden Land wieder von Null zu beginnen. Das tat Ihr um Euch und Euren heutigen Kindern, ein sorgenfreies Leben zu ermöglichen. Für dieses besondere Privileg möchte ich Euch von Herzen danken.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

