

**Entwicklung einer optimierten onkolytischen Virus-Plattform
für die Blockade von Immunkontrollpunkten
beim Melanom**

Von Janina Marek

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

**Entwicklung einer optimierten onkolytischen Virus-Plattform
für die Blockade von Immunkontrollpunkten
beim Melanom**

Von Janina Marek
aus Villingen-Schwenningen

München 2020

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

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

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

Mentorin: PD Dr. rer. nat. Jennifer Altomonte

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

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

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

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

**In Liebe und Dankbarkeit gewidmet
meinen Eltern und meinem Bruder**

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
III.	TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
IV.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XI
1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Malignes Melanom des Menschen.....	3
2.1.1	Epidemiologie.....	3
2.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	3
2.1.2.1	Ultraviolettstrahlung	4
2.1.2.2	Melanozytäre Nävi.....	4
2.1.3	Therapieoptionen	4
2.2	Immunonkologie	5
2.2.1	Immuncheckpoint–Inhibitoren	6
2.2.2	Immuncheckpoint: CTLA-4	8
2.2.3	Anti-CTLA-4	10
2.2.4	Immuncheckpoint: PD-1.....	11
2.2.5	Anti-PD-L1	12
2.3	Onkolytische Viren	13
2.3.1	Mechanismen onkolytischer Viren	14
2.3.2	T-VEC.....	15
2.3.3	Vesikuläres Stomatitis-Virus	16
2.3.4	Newcastle-Disease-Virus.....	18
2.3.5	Rekombinantes VSV-NDV-GFP	22
2.3.6	rVSV-NDV-sPD1-Varianten	24
2.3.7	RIG-I.....	25
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Zellkultur.....	27

3.1.1	Auftauen der Zellen	29
3.1.2	Virusinfektion	29
3.1.3	Mikroskopie	30
3.1.4	Wachstumskurven	30
3.1.5	LDH-Assay	30
3.1.6	Western Blot	31
3.1.7	Virusproduktion	32
3.1.8	TCID ₅₀ -Assay: Bestimmung des Virustiters	33
3.2	Versuchstiere	33
3.2.1	Versuchstierhaltung	33
3.2.2	Versuchsablauf der Überlebensstudien	36
3.2.3	Vorbereitung der Zellen zur Tumorimplantation	38
3.2.4	Subkutane Tumorgenerierung in der Maus	38
3.2.5	Vorbereitung der Reagenzien für die Behandlung	39
3.2.6	Intratumorale und intraperitoneale Injektion	40
3.2.7	Blutentnahme	40
3.2.8	PBMC-Isolation und FACS	40
3.3	Statistische Analysen	42
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Untersuchung der onkolytischen Viren <i>in vitro</i>	45
4.1.1	WT B16.OVA-Zellen lassen sich infizieren und bilden Synzytien aus	45
4.1.2	RIG-I ^{-/-} B16.OVA-Zellen lassen sich infizieren und bilden Synzytien aus	48
4.1.3	Nachweis der Zytotoxizität und Replikation in WT B16.OVA	51
4.1.4	Nachweis der Zytotoxizität und Replikation in RIG-I ^{-/-} B16.OVA	53
4.1.5	Infizierte WT B16.OVA-Zellen exprimieren und sezernieren sPD1	54
4.2	Untersuchung der onkolytischen Viren und der Immuncheckpoint- Inhibition <i>in vivo</i>	56
4.2.1	Überlebensstudie A: WT B16.OVA vs. RIG-I ^{-/-} B16.OVA	56
4.2.2	Überlebensstudie B: Vergleich der VSV-NDV-sPD1-Varianten	60
4.2.3	Überlebensstudie C: Kombinationstherapie in WT B16.OVA	65
4.2.4	Überlebensstudie D: Kombinationstherapie in RIG-I ^{-/-} .OVA	70
4.2.5	Direkter Vergleich: WT B16.OVA vs. RIG-I ^{-/-} B16.OVA	75

5	DISKUSSION.....	79
5.1	Monotherapie vs. Kombinationstherapie mit Anti-CTLA-4.....	80
5.2	VSV-NDV-sPD1-Varianten	82
5.3	Rolle des RIG-I-Rezeptors	84
5.4	Ausblick	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
V.	SUMMARY	89
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
VII.	DANKSAGUNG	103

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3pRNA	Transkribierte 5'-triphosphorylierte RNA
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARDS	Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomänen
cm	Zentimeter
CTD	C-terminale Domäne
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
F-Protein	Fusionsprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	High Affinity
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HSV	Herpes-Simplex-Virus
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin-2
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
Kontroll-AK	Kontroll-Antikörper
LDH	Laktatdehydrogenase
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
MAVS	mitochondriales antivirales Signalprotein
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
NDV	Newcastle-Disease-Virus

NK	Newcastle-Krankheit
OVA	Ovalbumin
PAMPs	pathogen-Associated Molecular Patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDT	Photodynamische Therapie
PMV-1	Paramyxovirus-1
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RLRs	RIG-I-ähnliche Proteine
rVSV-NDV	Rekombinantes VSV-NDV
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TCID ₅₀	Tissue Culture Infection Dose 50
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
T-Zelle	T-Lymphozyt
USDA	Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten, amtl. United States Department of Agriculture

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Reagenzien, die für die Zellkultur verwendet wurden	27
Tabelle 2: Materialien, die für die Zellkultur verwendet wurden.....	28
Tabelle 3: Kriterien zur Beurteilung der Tiere während des Versuches	34
Tabelle 4: Reagenzien, die für die Durchflusszytometrie verwendet wurden.....	41
Tabelle 5: Statistische Analyse.....	42

IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: CTLA-4-vermittelte Hemmung von T-Zellen.....	9
Abbildung 2: PD1-vermittelte Hemmung von T-Zellen	12
Abbildung 3: Viruskonstrukt von rVSV-NDV-GFP	23
Abbildung 4: rVSV-NDV-sPD1-Varianten	24
Abbildung 5: Beispiel eines Score Sheets zur Beurteilung der Tiere während des Versuches	35
Abbildung 6: Behandlungsschemata der Überlebensstudien	37
Abbildung 7: Injektionsstellen zur subkutanen Tumorzellimplantation in die Flankengegend	39
Abbildung 8: Injektionsstellen zur Behandlung	40
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen infizierter WT B16.OVA	47
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter WT B16.OVA mit rVSV-NDV-GFP	48
Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen infizierter RIG-I ^{-/-} B16.OVA	50
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter RIG-I ^{-/-} B16.OVA mit rVSV-NDV-GFP	50
Abbildung 13: Übersicht der Zytotoxizität infizierter WT B16.OVA	51
Abbildung 14: Wachstumskurven von rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten in WT B16.OVA	52
Abbildung 15: Übersicht der Zytotoxizität infizierter RIG-I ^{-/-} B16.OVA	53
Abbildung 16: Wachstumskurven von rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten in RIG-I ^{-/-} B16.OVA	54
Abbildung 17: sPD1-Expression und -Sekretion infizierter WT B16.OVA	55
Abbildung 18: Tumorwachstum ab der ersten Behandlung	57
Abbildung 19: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort	58
Abbildung 20: Überlebenskurven der Überlebensstudie A	59
Abbildung 21: Individuelle Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe	62
Abbildung 22: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort	63
Abbildung 23: Überlebenskurven der Überlebensstudie B	64
Abbildung 24: Individuelle Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe	67
Abbildung 25: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort	68
Abbildung 26: Überlebenskurven der Überlebensstudie C	69

Abbildung 27: Individuelle Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe	72
Abbildung 28: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort	73
Abbildung 29: Überlebenskurven der Überlebensstudie D	74
Abbildung 30: Vergleich der Blut-Analyse: WT vs. RIG-I ^{-/-} B16.OVA	75
Abbildung 31: Vergleich der Überlebenskurven: WT vs. RIG-I ^{-/-} B16.OVA	77

1 EINLEITUNG

Jährlich steigt die Anzahl an neu diagnostizierten Fällen des malignen Melanoms weltweit. Sobald Metastasen bei den Patienten auftreten, ist die Prognose deutlich verschlechtert und es lebt nur ein kleiner Teil der Betroffenen länger als zwei Jahre [102]. Es gibt zwar eine Reihe an Therapieoptionen für die Behandlung des malignen Melanoms, allerdings ist bislang noch kein hochwirksamer Einzel- oder Kombinationswirkstoff entwickelt worden und es treten bei einigen Patienten Resistenzen gegen verschiedene Medikamente auf [46].

Die Immuntherapie gelangt dabei immer mehr in den Fokus der Krebsforschung, als neue Therapieoption für eine Reihe von verschiedenen Krebsarten. Ziel der Immuntherapie ist es, das Immunsystem der Patienten gegen den Tumor zu aktivieren und somit gezielt zu bekämpfen, ohne dass gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Zur Immuntherapie zählen unter anderem die Immuncheckpoint-Inhibitoren. Diese sind in der Lage, durch den Tumor deaktivierte Immunzellen zu reaktivieren und somit eine antitumorale Immunantwort zu induzieren. Zu einem der bekanntesten Immuncheckpoint-Inhibitoren zählt der monoklonale Antikörper Anti-CTLA-4. Seit 2011 ist Ipilimumab, ein Anti-CTLA-4-Antikörper, für die Behandlung des malignen Melanoms zugelassen.

Ein neuer Aspekt der Immuntherapie stellen onkolytische Viren dar, die in den letzten Jahren immer mehr die Aufmerksamkeit auf sich gezogen haben. Ihre Fähigkeit, Tumorzellen direkt zu lysieren und gleichzeitig eine Immunantwort auszulösen, machen die onkolytischen Viren zu einem vielversprechenden Therapeutikum für eine Reihe von Krebsarten. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch die systemische Gabe des onkolytischen Virus VSV-NDV, zu einer signifikanten Überlebensverlängerung der Mäuse, die ein orthotopes hepatozelluläres Karzinom hatten, kam [1].

Da die Monotherapie mit Anti-CTLA-4 in vielen Patienten zu immunbedingten Nebenwirkungen führt und manche Patienten nicht adäquat auf die Therapie ansprechen, wird durch die Kombination mit anderen Therapien versucht, die Ansprechrate zu verbessern und die Nebenwirkungen zu reduzieren. Daher wurde in dieser Arbeit der Ansatz der Kombinationstherapie aus Immuncheckpoint-Inhibition und onkolytischem Virus *in vivo* untersucht und analysiert, inwieweit die Kombinationstherapie den antitumoralen Effekt verbessern und das Überleben verlängern kann.

Die Möglichkeit onkolytische Viren zu modifizieren, machen diese zu einer interessanten Plattform, um die direkte Onkolyse und die immunvermittelten Effekte zu optimieren und zu maximieren. In dieser Arbeit wurden vier neu entwickelte Viren (VSV-NDV-sPD1-Varianten), die einen Immuncheckpoint-Inhibitor beinhalten, in ihrer onkolytischen und immunstimulierenden Eigenschaft charakterisiert und *in vitro* und *in vivo* getestet.

Für das bessere Verständnis, wie onkolytische Viren eine antitumorale Immunantwort induzieren, wurde *in vivo* untersucht, welche Rolle die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors, ein Rezeptor, der virale RNA erkennt und eine Immunantwort induzieren kann, im Anschluss an eine Behandlung mit den onkolytischen Viren spielt. Außerdem stellte sich die Frage, inwieweit die Aktivierung des RIG-I durch das onkolytische Virus, die Therapie mit Anti-CTLA-4 verbessern kann.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Malignes Melanom des Menschen

2.1.1 Epidemiologie

Weltweit zählt das maligne Melanom zur 19. häufigsten Krebserkrankung [37]. Das Melanom ist für die Mehrheit der Hautkrebstodesfälle verantwortlich, obwohl es weniger als 5 % aller Hautkrebserkrankungen ausmacht [34]. Pro Jahr werden 133.000 neue Fälle diagnostiziert, davon 80 % in Nordamerika, Europa, Australien und Neuseeland [102]. In Regionen mit besonders hoher ultravioletter Strahlenbelastung, tritt das Melanom vorwiegend bei hellhäutigen Menschen auf [102]. Mit Zunahme der Hautpigmentierung sinkt die Melanom-Inzidenz und ist bei dunkelhäutigen Menschen sehr selten. Asiaten haben, trotz der hellen Haut, ebenfalls ein geringeres Risiko, da dort das akral-lentiginöse Melanom mit geringem malignem Potenzial dominiert [102]. Mit einem mittleren Diagnosealter von 57 Jahren ist ein höherer Anteil an jüngeren Patienten vom Melanom betroffen, als bei anderen malignen Erkrankungen [5].

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Das maligne Melanom, auch bekannt als schwarzer Hautkrebs, ist eine bösartige Tumorerkrankung ausgehend von den pigmentbildenden Melanozyten [102]. Hauptsächlich sind die Melanozyten in der Basalepidermis, den Haarfollikeln, der Meningen, der Retina des Auges und entlang der Schleimhautoberfläche zu finden [54]. Hauptaufgabe dieser Zellen ist es, das Melaninpigment als Schutz vor UV-Strahlung zu produzieren [69].

2.1.2.1 Ultraviolettstrahlung

Ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms ist die Exposition gegenüber ultravioletter Strahlung [72]. Schon ein oder mehrere Sonnenbrände, die während der Kindheit oder Jugend auftreten, verdoppeln das Risiko im Verlauf des Lebens ein Melanom zu entwickeln [110].

Durch die Genotoxizität der UV-Strahlung kommt es zu DNA-Schäden wie beispielsweise die Bildung von Pyrimidin-Dimeren oder Desaminierung von Cytosin zu Thymin. Außerdem können durch die UV-Strahlen Mutationen auftreten. Im schlimmsten Fall führen diese Veränderungen zur Entwicklung eines Tumors. [2, 51]

2.1.2.2 Melanozytäre Nävi

Der melanozytäre Nävus stellt einen weiteren Risikofaktor bei der Entstehung eines malignen Melanoms dar. In den gutartigen Nävi wird durch die konzentrierte Ansammlung von Melanozyten vermehrt Melanin produziert, was sich auf der Haut in Form eines dunklen Pigmentflecks zeigt. Umgangssprachlich sind diese Läsionen als Muttermal bekannt und können entweder angeboren oder erworben sein. [72]

Ein diagnostisches Merkmal, das auf die Entwicklung eines Melanoms hinweist, sind übermäßig viele melanozytäre Nävi, die im Verlauf des Lebens auftreten [16]. Änderungen in Form, Farbe oder Textur sind ebenfalls ein starkes Indiz [72]. 81 % der Melanom-Patienten beobachteten in einer Studie einen sich verändernden Nävus an der Stelle der bösartigen Läsion [92]. Jedoch ist wichtig zu erwähnen, dass nicht alle Nävi auf ein Melanom hinweisen oder zu einem führen. Dennoch ist es wichtig, verdächtige Nävi untersuchen zu lassen. Dies ermöglicht die frühzeitige Erkennung und führt bei richtiger chirurgischer Entfernung zu einer hohen kreisfreien Überlebensrate im Vergleich zu einem bereits metastasierenden Melanom. [72]

2.1.3 Therapieoptionen

Die Früherkennung eines malignen Melanoms ist entscheidend für den Erfolg der Patientenbehandlung, da bei Vorliegen von Metastasen die Prognose sehr ungünstig ist [30]. Eine detaillierte Diagnose für die Feststellung des Tumorstadiums, sowie ein Mutationstest, sind laut den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Medizinische Onkologie zur klinischen Praxis des kutanen Melanoms von großer Bedeutung [31]. Je nach Lage, Stadium und genetischem Profil kommen unterschiedliche Therapieoptionen, wie zum Beispiel die

chirurgische Resektion, Chemotherapie, Strahlentherapie, photodynamische Therapie (PDT), Immuntherapie oder gezielte Therapie in Frage [30]. Vor allem in Hinblick auf nicht resezierbare Melanome, die sich signifikant auf lokale Lymphknoten oder Lymphgefäße ausgebreitet haben und nicht chirurgisch entfernt werden können, spielt die Immuntherapie eine entscheidende Rolle [55]. Eine Datenanalyse aus den Vereinigten Staaten zeigt, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasierendem und nicht resezierbarem Melanom bei nur 17 % liegt [8]. Auch die systemische Chemotherapie bei diesen Patienten bringt nicht den gewünschten Erfolg und führt nur zu einer medianen Überlebenszeit von 6-10 Monaten [75]. Das bessere Verständnis der Molekularbiologie und der Immunregulation bei der Tumorentstehung und dessen Manifestierung, führt zum Fortschritt der Immuntherapie. Im Hinblick auf die Behandlung des metastasierenden Melanoms konnte in randomisierten, kontrollierten Phase-III-Studien gezeigt werden, dass Patienten deutlich besser auf Immuntherapeutika ansprechen, als auf eine Chemotherapie (26-40 % vs. 4-14 %) [55]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit und Unerlässlichkeit der Entwicklung und Optimierung neuer Immuntherapeutika für die Behandlung bösartiger Krebserkrankungen.

2.2 Immunonkologie

In der medizinischen Onkologie eröffnen sich durch die Immuntherapie neue Möglichkeiten und präzisere Ansätze im Kampf gegen bösartige Tumorerkrankungen, als die bisher toxischen und wenig selektiven systemischen Chemo- und Strahlentherapien [83, 105].

Bei der Immuntherapie werden bestimmte Eigenschaften des Immunsystems genutzt um Krebszellen zu erkennen, zu bekämpfen und letztendlich zu zerstören. Durch die ständige Überwachung der Immunzellen im Körper können sie gezielt gegen Tumorzellen stimuliert werden, besitzen einen systemischen Effekt und können ein spezifisches und langanhaltendes Gedächtnis induzieren und somit unter anderem vor Rezidiven schützen. [83]

Dazu ist es unerlässlich die Entstehung, die Entwicklung und vor allem die Fähigkeit eines Tumors, dem Immunsystem Stand zu halten, zu kennen und zu verstehen. Voraussetzung eines Tumorwachstums ist es eine Mikroumgebung zu schaffen, wo Tumorzellen nicht von Immunzellen des Körpers als fremd erkannt und eliminiert werden können. Durch das sogenannte Krebsimmunediting gelingt es den Tumorzellen, der Immunüberwachung zu entgehen. Dieses besteht aus drei aufeinanderfolgenden Prozessen: der Elimination, dem Gleichgewicht und der Flucht, das letztendlich zum Tumorwachstum führt [59].

Zunächst werden in der Eliminationsphase bösartig veränderte Zellen durch Antitumor-Effektorzellen und Makromoleküle entfernt. Die Gleichgewichtsphase ist gekennzeichnet durch eine Homöostase zwischen CD8⁺-T-Zellen und dendritischen Zellen mit weiteren mutierten und weniger immunogenen veränderten Zellen. In der Fluchtphase gelingt es jedoch den Tumorzellen für die Immunzellen unerkannt zu bleiben und schaffen somit das Tumorwachstum. [89]

Die Immuntherapie nutzt, basierend auf den neuen Erkenntnissen über die Mechanismen der Antitumor-Immunreaktionen, das Immunsystem und seine Komponenten aus, um eine gezielte Antitumorantwort zu erreichen [83]. Das breite Spektrum von Strategien, wie zum Beispiel die Nutzung monoklonaler Antikörper, Zytokinen und Zelltherapien, haben eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit bei verschiedenen Tumorarten, selbst bei metastasierendem und bisher unheilbarem Krebs gezeigt [58, 89]. Mittlerweile sind viele immuntherapeutische Medikamente von der Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von Krebspatienten zugelassen [83]. Es ist allerdings zu beachten, dass diese Medikamente in das Immunsystem der Patienten eingreifen und es durch die Manipulation von T-Zell-Aktivierungen zu Autoimmunreaktionen kommen kann.

2.2.1 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Zu einer der wichtigsten und vielversprechendsten Ansätze der Immuntherapie zählt die Inhibition von Immuncheckpoints. Unter physiologischen Bedingungen spielen Immuncheckpoints eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und verhindern somit autoimmune Reaktionen. Des Weiteren regeln Immuncheckpoints bei einer Infektion die Dauer und Amplitude der physiologischen Immunreaktion im peripheren Gewebe um dieses vor kollateralen Schäden zu schützen. Tumorzellen nutzen Immuncheckpoints aus, um Immunzellen zu inaktivieren. Somit gelingt es ihnen, eine Immunantwort zu umgehen und ermöglicht ihnen ein ungestörtes Wachstum. Mit Hilfe von Immuncheckpoint-Inhibitoren möchte man der Inaktivierung der Immunzellen durch die Tumorzellen entgegenwirken und so die Tumorzellen wieder für die Immunzellen angreifbar machen.

Eine zentrale Rolle bei dem Prozess, eine Immunantwort auszulösen oder zu inhibieren, spielt die Aktivierung oder Hemmung der T-Zellen. Immuncheckpoints dienen dazu, als kostimulierende oder koinhibitorische Moleküle, die Aktivität einer T-Zelle zu bestimmen und zu steuern. Zunächst erkennt die T-Zelle mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) bestimmte Antigene, die durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) von

antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Zusätzlich erfolgt die Bindung zwischen kostimulierenden und/oder koinhibitorischen Rezeptoren der T-Zelle und ihren kostimulierenden und/oder koinhibitorischen Liganden, die auf APC oder Tumorzellen exprimiert werden. Das Gleichgewicht der stimulierenden und hemmenden Signale bestimmt letztendlich, ob die T-Zelle aktiviert wird oder nicht. Grundsätzlich reagieren T-Zellen jedoch nicht auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion, wenn sie nicht zuerst das Antigen durch den TCR erkannt haben. [84, 105]

Zu den kostimulierenden Molekülen zählen unter anderem die T-Zell-Oberflächenproteine CD28 [10] und CD27 [21], sowie der induzierbare Kostimulator (ICOS) [50]. Das Protein CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) [27] und das PD-1-Molekül (engl. programmed cell death protein 1) [52] haben dagegen koinhibitorische Eigenschaften.

Tumore nutzen diese Rezeptor-Liganden-Interaktionen aus, um der Immunabwehr, besonders um T-Zellen, die spezifisch gegen Tumorantigene gerichtet sind, zu entfliehen. Immuncheckpoint-Inhibitoren richten sich genau gegen diese Kontrollpunkte und stellen die körpereigene Antitumoraktivität wieder her. Der monoklonale CTLA-4-Antikörper war der erste Immuncheckpoint-Inhibitor, der von der Food and Drug Administration zugelassen wurde. Klinische Ergebnisse mit weiteren Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie beispielsweise Antikörper, die gegen PD1 oder PD-L1 gerichtet sind, weisen auf breite und vielfältige Möglichkeiten hin, die Antitumoraktivität zu verbessern und dauerhaft klinische Reaktionen zu erzeugen. [84]

Dennoch sind der Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, trotz des guten Fortschrittes, Grenzen gesetzt. Nicht bei allen Krebsarten ist die Monotherapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor wirksam. Tumore mit geringer Mutationslast und/oder geringerer Immunogenität weisen möglicherweise von Natur aus Resistenzen gegen diese therapeutische Strategie auf [24]. Des Weiteren können der adaptive Verlust der Immunogenität und die Vergänglichkeit der entzündeten Tumormikroumgebung das Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren negativ beeinflussen [24]. Diese Hürden müssen in Zukunft durch Optimierungen der Ansprechraten von Immuncheckpoint-Inhibitoren und mit Hilfe von Kombinationsstrategien überwunden werden.

2.2.2 Immuncheckpoint: CTLA-4

CTLA-4 ist ein Protein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Proteine dieser Gruppe teilen sich die wichtigsten strukturellen Merkmale, bestehend aus den variablen (V) oder konstanten (C) Immunglobulin-Domänen. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie werden auf Lymphozyten exprimiert, können mit anderen Proteinen interagieren und sind an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt. Das Molekül CTLA-4 weist ebenfalls eine extrazelluläre V-förmige Domäne, sowie eine transmembrane Domäne auf und spielt als Immuncheckpoint eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase. [19, 78]

Die T-Zell-Aktivierung benötigt grundsätzlich zwei Stimulationssignale (siehe Abbildung 1). Das erste Signal ist die spezifische Bindung zwischen TCR der T-Zelle und dem MHC der antigenpräsentierenden Zelle. Als Kostimulation fungiert die Bindung zwischen CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) -Molekülen auf den antigenpräsentierenden Zellen mit den CD28-Molekülen der T-Zellen. Bei ausreichender Menge an CD28:CD80/86-Bindungen kommt es zur Aktivierung der T-Zelle mit anschließender Proliferation, Differenzierung durch die Produktion von Wachstumszytokinen, wie Interleukin-2 (IL-2), erhöhten Energiestoffwechsel und längeren Überleben der T-Zelle. [20]

CTLA-4, ein Homolog von CD28, besitzt eine höhere Bindungsaffinität für CD80/86 und erzeugt im Gegensatz zu CD28 ein hemmendes Signal [19, 20, 25]. Dabei bestimmt die relative Menge der CD28:CD80/86-Bindung im Vergleich zur CTLA-4:CD80/86 Bindung, ob die T-Zelle aktiviert oder gehemmt wird [61]. Die erhöhte Bindung von CTLA-4 an CD80/86 führt letztendlich zu einer erniedrigten IL-2-Produktion, eingeschränkter T-Zell-Proliferation und verkürztem Überleben der T-Zelle [20]. CTLA-4 unterliegt aber auch selbst der Regulation. In naiven, ruhenden T-Zellen befindet sich CTLA-4 überwiegend im intrazellulären Kompartiment. Die TCR-Bindung mit gleichzeitiger kostimulierender Bindung von CD28:CD80/86, führt zu einer Hochregulation von CTLA-4 auf der Zelloberfläche durch die Exozytose von CTLA-4-haltigen Vesikeln. [70] Dieser Mechanismus verläuft in einer Rückkopplungsschleife. Je stärker das TCR-Signal ist, desto höher ist die Translokation von CTLA-4 an die Zelloberfläche. Durch die anschließende CTLA-4:CD80/86-Bindung kommt es zur Hemmung der T-Zelle. [62]

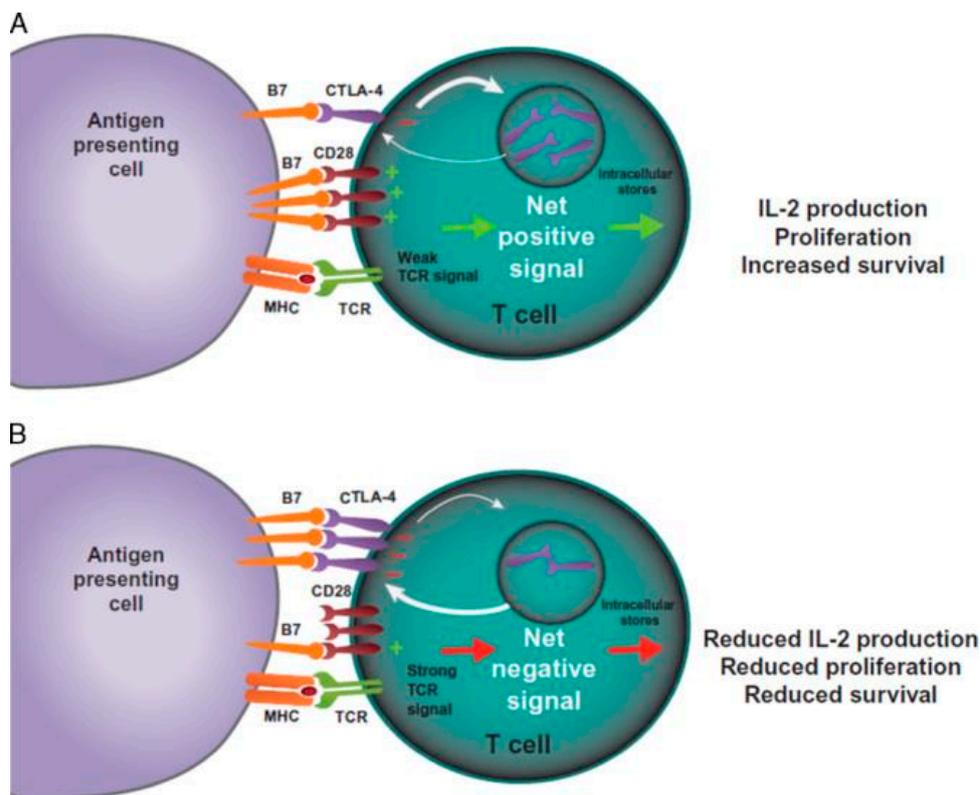


Abbildung 1: CTLA-4-vermittelte Hemmung von T-Zellen

Nach Bindung des präsentierten Antigens auf dem MHC der APC an den TCR der T-Zelle und der CD28:B7(86)-Kostimulation, erfolgt die Aktivierung der T-Zelle. **A** Bei einem schwachen TCR-Signal überwiegt die CD28:B7-Bindung und führt zur IL-2-Produktion, Proliferation und erhöhtem Überleben der T-Zelle. **B** bei einem starken TCR-Signal kommt es zur Hochregulation der CTLA-4-Expression durch den Transport von CTLA-4 aus intrazellulären Speichern. Die erhöhte CTLA-4:B7-Bindung führt zu einem negativen Nettosignal und hemmt die IL-2-Produktion und die Proliferation und schränkt das Überleben der T-Zelle ein. Quelle: [20]

CTLA-4 ist somit ein wichtiger negativer Regulator der Antitumoraktivität, da es zur T-Zell-Toleranz und zur Tumor-Immunevasion führt [109]. Bei der Analyse von einer Vielzahl von menschlichen Krebs-Zelllinien, darunter 61 Melanom-Zelllinien der Broad-Novartis Datenbank der Cancer Cell Line Encyclopedia [13, 85] stellte man fest, dass die Melanom-Zelllinien die größte CTLA-4-Expression unter allen Krebszelltypen aufwiesen [80]. Die mittlere CTLA-4-Expression war sogar größer als die von 180 hämatologischen und lymphatischen Krebs-Zelllinien [80]. Dies macht den CTLA-4-Immunchekpoint in Tumorzellen zu einem interessanten und vielversprechenden Angriffspunkt durch Immunchekpoint-Inhibitoren für die Wiederherstellung einer Antitumoraktivität.

2.2.3 Anti-CTLA-4

Eine Verbesserung der Antitumorimmunität durch eine CTLA-4-Blockade wurde 1995 von dem Krebsforschungslabor von James P. Allison der Universität von Kalifornien das erste Mal beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo*-Gabe von Antikörpern gegen CTLA-4 zur Abstoßung von einigen Tumorarten in Mäusen führte. Außerdem fanden die Forscher heraus, dass die Behandlung zu einer Immunität gegen sekundäre Exposition von Tumorzellen führte. Die Ergebnisse ließen darauf hindeuten, dass die Blockade von CTLA-4 eine effektive Immunantwort gegen Tumorzellen ermöglichen kann. [68]

Diese Erkenntnisse führten zu der Entwicklung von Ipilimumab, ein humaner monoklonaler Anti-CTLA-4-Antikörper. In einer klinischen Phase-III-Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ipilimumab das Gesamtüberleben bei Patienten mit zuvor behandeltem metastasierendem Melanom verbessert hat. In dieser Studie wurde Ipilimumab mit oder ohne ein Glykoprotein 100 (gp 100) -Peptid-Impfstoff, oder gp 100 als Monotherapie, bei Patienten mit metastasierendem Melanom verglichen. 676 Patienten mit inoperablem Melanom im Stadium III oder IV, deren Krankheit während der Therapie weiter vorangeschritten war, wurden in einem 3:1:1-Zuweisungsverhältnis in drei Behandlungsgruppen unterteilt. In der ersten Gruppe (403 Patienten) erhielten die Patienten Ipilimumab in Kombination mit gp 100. Die zweite Gruppe (137 Patienten) wurde nur mit Ipilimumab und die dritte Gruppe (136 Patienten) nur mit gp 100 behandelt. Das Ergebnis der Studie zeigte, dass das mediane Gesamtüberleben bei Patienten, die nur mit Ipilimumab therapiert wurden, bei 10,1 Monaten lag, im Gegensatz zu 6,4 Monaten bei der Patientengruppe, die nur gp 100 erhielten. Die Kombinationstherapie aus Ipilimumab und gp 100 zeigte mit 10 Monaten Gesamtüberleben keinen Vorteil, im Vergleich zur Monotherapie mit Ipilimumab. Allerdings traten bei 10 bis 15 % der Patienten, die mit Ipilimumab behandelt wurden, unerwünschte immunbezogene Nebenwirkungen auf, im Vergleich zu 3 % der Patienten, die nur gp 100 erhielten. [48]

Die positiven Ergebnisse dieser Studie erlaubten die Zulassung von Ipilimumab (Yervoy®) von der FDA im März 2011 für den Einsatz bei zuvor behandeltem oder neu diagnostiziertem inoperablem oder metastasiertem Melanom [22]. Nur ein paar Monate später wurde es auch von der EMA im Juli 2011 zugelassen [22]. Seither wurde Anti-CTLA-4 in zahlreichen anderen klinischen Studien, entweder alleine oder in Kombination mit anderen Medikamenten für eine Vielzahl von Krebsarten verwendet und führte zu vielversprechenden Ergebnissen.

2.2.4 Immuncheckpoint: PD-1

Das programmed cell death protein-1 (PD-1) ist ein Oberflächenprotein und gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie. Die Struktur des Proteins lässt sich in verschiedene Abschnitte untergliedern. Extrazellulär besitzt es eine IgV-Domäne, als Bindungsstelle zu den entsprechenden Liganden PD-L1 und PD-L2. Daran schließt sich eine Transmembranregion an. Im Zytoplasma der Zelle weist das Protein einen intrazellulären Schwanz mit zwei Phosphorylierungsstellen auf. PD-1 wird von einer Reihe von Zellen exprimiert, darunter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen. Als Immuncheckpoint nutzt PD-1 zwei Mechanismen, um den Körper vor einer autoimmunen Reaktion zu schützen. Zum einen induziert es die Apoptose in antigenspezifischen T-Zellen, zum anderen hemmt PD-1 die Apoptose in regulatorischen T-Zellen. [96]

PD-L1, ein Ligand von PD-1, ist ein Transmembranprotein und wird nicht nur von Immunzellen gebildet, sondern auch von nicht hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise Endothelzellen, retinalen Pigmentepithelzellen, Pankreas-Inselzellen und Neuronen [38]. Die Expression von PD-L1 in peripherem Gewebe ist für den Schutz gegen Autoimmunreaktionen notwendig [96]. Allerdings wird PD-L1 auch von verschiedenen Tumorzellen exprimiert um eine Antitumor-Immunantwort zu umgehen. Beispielsweise wird PD-L1 von Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) [47], von Brustkrebszellen [101] und von Tumorzellen des malignen Melanoms [77] gebildet. Wenn PD-1, das auf aktivierten CD8⁺-T-Zellen exprimiert wird, an seinen Liganden PD-L1 auf der Oberfläche von Tumorzellen bindet, führt dies zur Apoptose der CD8⁺-T-Zellen und somit zum Schutz der Tumorzellen (siehe Abbildung 2) [76]. Wohlgemerkt kann PD-L1 auch als anti-apoptotischer Faktor dienen, was zu einer Resistenz gegen die Lyse von CD8⁺-T-Zellen führt [11].

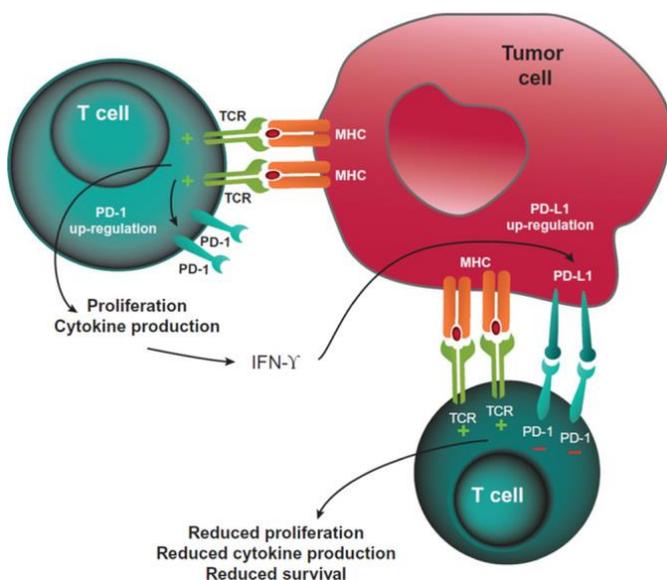


Abbildung 2: PD1-vermittelte Hemmung von T-Zellen

T-Zellen erkennen über ihren TCR spezifische Antigene, die von dem MHC von Tumorzellen präsentiert werden, was zur Freisetzung von Zytokinen führt. Eine verlängerte Stimulation kann eine Hochregulierung der PD1-Expression auf T-Zellen verursachen. Die anschließende Bindung von PD1 an den Liganden PD-L1 der Tumorzelle führt zu einer verminderten Proliferation, reduzierten Zytokin-Freisetzung und zum Tod der T-Zelle. Quelle: [20]

2.2.5 Anti-PD-L1

Durch die Inhibition von PD1 oder PD-L1 wird der PD-1:PD-L1-Signalweg blockiert und es kommt zur Umkehrung der T-Zell-Unterdrückung und zur Verbesserung der Antitumoraktivität [3]. Voraussetzung einer Antikörpertherapie mit einem PD1- oder PD-L1-Inhibitor ist die Expression von PD-L1 auf der Oberfläche der Tumorzellen. Dafür wurden verschiedene immunhistochemisch-basierende Assays entwickelt, die in der Lage sind, PD-L1 in Tumoren zu detektieren. Dazu gehört zum einen der diagnostische Begleittest, der als wesentlich notwendig für die Anwendung des Medikamentes gilt, zum anderen der Komplementärttest, um die Patientenauswahl zu optimieren [29]. Pembrolizumab und Nivolumab, zwei selektive humanisierte IgG-Antikörper, die den PD1-Rezeptor hemmen, wurden im September und Dezember 2014 von der FDA zur Behandlung des nicht resezierbaren oder metastasierten Melanom und dem Fortschreiten der Krankheit nach der Therapie mit Ipilimumab zugelassen [12]. Außerdem sind derzeit drei PD-L1-Inhibitoren von der FDA zur Behandlung mehrerer Krebsarten zugelassen. Dazu zählt Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab. Atezolizumab (Tecentriq[®]) wurde 2017 auch von der EMA zur Behandlung des Harnblasenkrebs und anderen Urothelkarzinomen und zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs zugelassen. Avelumab (Bavencio[®]) ist bislang aber nur zur Behandlung des Merkelzellkarzinoms von der EMA zugelassen [60].

2.3 Onkolytische Viren

Onkolytische Viren (OV) stellen heutzutage eine vielversprechende Klasse von Immuntherapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Viren bestehen aus ein- oder doppelsträngiger DNA oder RNA und besitzen die Fähigkeit, Wirtszellen zu infizieren und sich zu vermehren. Das bessere Verständnis der viralen Mechanismen wie beispielsweise der virale Eintritt, die Replikation und die Induktion von Immunantworten, sowie die Entwicklung der Gentechnik zur Herstellung genetisch veränderter Viren führten dazu, Viren zur Behandlung von spezifischen Krebsarten zu nutzen. Onkolytische Viren sind in der Lage sich gezielt in Tumorzellen zu replizieren, diese zu lysieren und eine systemische Antitumor-Immunität zu induzieren. Allerdings können neutralisierende antivirale Reaktionen und angeborene antivirale Immunität des Wirtimmunsystems die Virusvermehrung und Infektion der Tumorzellen blockieren. Das Zusammenspiel dieser gegensätzlichen Mechanismen bestimmt letztendlich über den Therapieerfolg. [56]

Um die Pathogenität abzuschwächen und die Immunogenität zu verstärken, sind die meisten onkolytischen Viren genetisch modifiziert [94]. Außerdem kann mit Hilfe dieser gezielten Veränderungen die Tumorspezifität und die onkolytische Kapazität verbessert werden. Das erste modifizierte onkolytische Virus wurde von den chinesischen Aufsichtsbehörden im Jahr 2005 zugelassen. Dabei handelt es sich um das Adenovirus H101 Typ 5, mit E1B-55KD und partiellen E3-Gen-Deletionen, um das Virus tumorspezifisch zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Kopf- und Halskrebs, die mit einer intratumoralen H101-Injektion, in Kombination mit einer Chemotherapie behandelt wurden, eine höhere Ansprechraten zeigten als Patienten, die nur mit einer Chemotherapie behandelt wurden. [113]

Zur Behandlung des malignen Melanoms wurde im Jahr 2015 das erste onkolytische Virus von der FDA und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen. Dabei handelt es sich um das Talimogen Laherparepvec (T-Vec), ein rekombinanter Herpes-Simplex-Virus-Vektor, der GM-CSF, ein Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, zur verstärkten Immunstimulation exprimiert. Jedoch gibt es zahlreiche weitere Viren, die derzeit präklinisch und klinisch entwickelt werden. [89]

2.3.1 Mechanismen onkolytischer Viren

Um eine Zelle infizieren zu können, muss das Virus als erstes mit spezifischen Proteinen auf der Oberfläche der Zielzelle interagieren. Nach erfolgreicher Anheftung des Viruspartikels erfolgt der Eintritt von behüllten Viren durch Membranfusion und von unbehüllten Viren durch Endozytose. In der Wirtszelle angekommen wird anschließend das virale Genom, je nach Virus, im Zellkern oder im Zytoplasma repliziert und vervielfältigt. Die viralen Gene für Struktur- und Nichtstrukturproteine werden exprimiert und es können neue Viruspartikel zusammengesetzt werden. Diese sind in der Lage, Nachbarzellen zu infizieren und der Lebenszyklus des Virus beginnt von Neuem. [93]

Sobald jedoch eine Wirtszelle merkt, dass sie mit einem Virus infiziert ist, setzt sich eine antivirale Maschinerie in Gang, um die Infektion einzudämmen und pathogene Viruspartikel zu eliminieren. Dies geschieht unter anderem durch die Erkennung von viralen Nukleinsäuren durch RIG-I (retinoic acid inducible gene I) oder durch die Aktivierung von intrazellulären Toll-like-Rezeptoren (TLRs) durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, pathogen-associated Molecular Patterns). PAMPs kommen hauptsächlich in oder auf Krankheitserregern (Viren, Bakterien) vor. Außerdem kommt es zu einer lokalen Interferon-(IFN) Produktion, die durch die angeborene Immunantwort auf Virusinfektionen induziert wird. Typ-I-Interferone signalisieren über den JAK-STAT-Signalweg (JAK = Januskinase; STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription) die Apoptose der infizierten Zelle und fördern die Produktion von Zytokinen, die das Immunsystem vor einer Virusinfektion warnen. [56]

Bei Tumorzellen ist dieser Prozess allerdings gestört. Tumorzellen können Schlüsselkomponenten des Typ-I-Interferon-Signalwegs herunterregulieren. Außerdem ist der Nachweis von Viruspartikeln durch TLR und RIG-I eingeschränkt und vermindert dadurch die antiviralen Effekte. Diese Eigenschaften der Tumorzellen ermöglichen onkolytischen Viren einen selektiven Vorteil für die virale Replikation. Nach der Infektion der Tumorzellen induzieren die meisten onkolytischen Viren den Zelltod. Dadurch werden Tumorzellen direkt eliminiert und es kann eine systemische Immunantwort in Gang gesetzt werden. Die Stärke der Immunantwort hängt dabei zum einen von der Art des Zelltodes ab, zum anderen von der Freisetzung von Gefahrensignalen infizierter Zellen. Nekrose und Pyroptose sind zum Beispiel immunogenere Formen des Zelltodes als die Apoptose. Durch die Freisetzung von verschiedenen Gefahrensignalen der onkolytisch zugrunde gegangenen Tumorzellen kann eine Rückbildung des Tumors, das nicht mit dem Virus in Kontakt getreten

ist, erreicht werden. Die Reifung von antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen, wird durch die Freisetzung von tumorassoziierten Antigenen (TAA), viralen PAMPs und Gefahr-assoziierten molekularen Mustern (DAMPs, Danger-associated molecular patterns) gefördert. Dendritische Zellen aktivieren wiederum antigenspezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. CD8⁺-zytotoxische T-Zellen können zum Ort des Tumorwachstums gelangen, wo sie bei einer Antigenerkennung eine Antitumor-Immunität auslösen. Diese Effekte können besonders für entfernte Tumore von Bedeutung sein, die nicht direkten Kontakt zu dem onkolytischen Virus hatten. [56]

2.3.2 T-VEC

T-Vec ist das erste onkolytische Virus, das 2015 von der FDA und der EMA für die Behandlung des malignen Melanoms auf dem Markt zugelassen wurde [90]. Dabei handelt es sich um ein Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) [100], das genetisch modifiziert wurde, um die selektive Tumorzellreplikation und die Immunogenität zu fördern und die Pathogenität des Virus zu reduzieren [90]. Eine genetische Modifikation, die die selektive Replikation in den Tumorzellen fördert und gleichzeitig die mit einer HSV-1-Infektion verbundene Neuropathogenität verhindert, ist die Deletion des Herpesvirus ICP34.5-Gens [71].

Um die Immunogenität zu verbessern, wurden zwei Kopien des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) in das Viruspartikel eingefügt [71]. Durch die Freisetzung des GM-CSF gelangen dendritische Zellen und Makrophagen in den Tumor und können durch die Präsentation von Tumorantigenen wiederum tumorspezifische CD8⁺-T-Zellen aktivieren [57]. Eine weitere genetische Modifikation ist die Deletion des ICP47-Gens. ICP47 blockiert normalerweise die Präsentation von viralen Peptiden durch MHC-Klasse-I-Moleküle und somit die extrazelluläre Erkennung durch T-Zellen [41]. Die Deletion dieses Gens erhöht allerdings die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen und verbessert somit die Antigenpräsentation und die Aktivierung von T-Zellen [71]. Das Viruskonstrukt mit den beschriebenen genetischen Modifizierungen des HSV -1 wurde als Talimogene laherparepvec (T-VEC) bezeichnet und wurde für die klinische Bewertung verwendet [90]. In einer randomisierten offenen Phase-III-Studie zeigte T-VEC als erstes onkolytisches Virus den therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des malignen Melanoms. In dieser Studie wurde T-VEC mit GM-CSF bei Patienten mit nicht reseziertem Melanom im Stadium IIIB bis IV verglichen. Dabei erhielten die Patienten der einen Behandlungsgruppe bei der ersten Behandlung T-VEC intratumoral in der Dosierung von 10⁶ pfu/ml, gefolgt von 10⁸ pfu/ml drei Wochen später. Anschließend erhielten die Patienten

alle zwei Wochen eine intratumorale Injektion von 10^8 pfu/ml. In der anderen Behandlungsgruppe erhielten die Patienten GM-CSF in einer Konzentration von $125 \mu\text{g}/\text{m}^2$ subkutan täglich für 14 Tage in einem 28-Tage-Zyklus. Die Studiauswertung ergab, dass die DRR (engl. durable response rate; objektives Ansprechen, kontinuierlich über 6 Monate) in der T-VEC-Gruppe signifikant höher war, als in der GM-CSF-Gruppe (16,3 % gegenüber 2,1 %, $p < 0,001$). Die mediane Gesamtüberlebenszeit lag bei der T-VEC-Gruppe bei 23,3 Monaten, bei der GM-CSF-Gruppe dagegen nur bei 18,9 Monaten. Die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen, die bei der T-VEC-Behandlung auftraten, waren Müdigkeit, Schüttelfrost und Fieber. [9]

Basierend auf diesen Studienergebnissen wurde T-VEC im Oktober 2015 von der FDA für die lokale Behandlung inoperabler Läsionen bei Patienten mit rezidivierenden Melanomen zugelassen. Kurze Zeit später folgte die Zulassung durch die EMA für die Behandlung von Patienten mit inoperablem Melanom im Stadium III oder IVM1a. [90]

Dennoch ist zu sagen, dass T-Vec zwar bei der lokalen Applikation in das Tumorgewebe sehr wirksam ist, jedoch systemisch nur schwache Effekte erzielt [90] und das Gesamtüberleben nur gering verlängert. Deshalb besteht weiterhin die Notwendigkeit, verbesserte Therapien zu entwickeln.

2.3.3 Vesikuläres Stomatitis-Virus

Das Vesikuläre Stomatitis-Virus gehört zu der Familie der *Rhabdoviridae*, aus der Ordnung der *Mononegavirales*. Es besteht aus einer einzelsträngigen, nichtsegmentierten RNA mit einer Länge von 11162 bp. Das infektiöse Viruspartikel besteht aus einem Nukleokapsid und einer Membranhülle. Das Genom kodiert für fünf Proteine. Es enthält zum einen die Nukleokapsid-Proteine N-, P- und L-Proteine und zum anderen die Membranproteine M- und G-Proteine. Das virale Glykoprotein (G) ist für die Anheftung und den Eintritt des Viruspartikel in die Wirtszelle verantwortlich. Zunächst bindet das Protein (G) an den jeweiligen zellulären Rezeptor. Anschließend erfolgt die Clathrin-vermittelte Endozytose des Virions in ein Endosom, wo eine Ansäuerung des Endosomen-Inneren zu einer Konformationsänderung des G-Proteins mit darauffolgender Fusion mit der Endosomen-Membran führt. Dies ermöglicht letztendlich die Entlassung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Zelle, wo die Replikation und die Verpackung neuer Viruspartikel stattfinden kann. [81]

Die Stomatitis vesicularis oder Vesikuläre Stomatitis ist eine anzeigepflichtige Tierseuche der Huftiere, die durch das VSV ausgelöst wird. Hauptsächlich sind Pferde von der Krankheit betroffen. Daneben sind Rinder, Schweine und Neuweltkamelide empfänglich für das Virus. Schafe und Ziegen sind dagegen weitestgehend resistent. Die Vesikuläre Stomatitis tritt vermehrt im Sommer und im Frühherbst auf. Da VSV in einer Reihe von Insekten nachgewiesen wurde, wird ihnen eine Rolle bei der Übertragung des Virus zugeschrieben. Außerdem kann sich das Virus direkt von Pferd zu Pferd über den Speichel oder über infektiöse Flüssigkeit rupturierter Bläschen ausbreiten. Nach ein bis acht Tagen Inkubationszeit treten die ersten Symptome auf. Dies äußert sich durch Fieber, Speichelfluss und Abgeschlagenheit. Des Weiteren bilden sich weißlich erhabene Vesikel auf der Oberfläche der Zunge, Zahnfleisch, Lippen und Nüstern aus. Diese Läsionen entwickeln sich manchmal auch am Euter, den Zitzen, dem Präputium oder am Kronsaum der Gliedmaßen. Im Verlauf der Krankheit können die Vesikel platzen. Die daraus resultierenden Ulzerationen verkrusten anschließend. Häufig ist die Zunge am schwersten betroffen und die Tiere verweigern aufgrund der Schmerzen die Futter- und Wasseraufnahme. Zur Diagnosestellung kann der Erreger in einer Zellkultur und mit einem Antigen-ELISA der Vesikelflüssigkeit nachgewiesen werden. Da die Vesikuläre Stomatitis eine kurze und selbstlimitierende Krankheit ist, ist keine besondere Therapie nötig. Man kann jedoch die Läsionen mit einer antiseptischen Lösung behandeln und das Futter zur Erleichterung der Futteraufnahme einweichen. [18]

VSV ist aber nicht nur als Erreger der Vesikulären Stomatitis bekannt, sondern weckt auch als onkolytisches Virus das Interesse der Forscher. Grund dafür ist seine Tumorspezifität, seine schnelle Replikation und zelltötende Kinetik, seine Fähigkeit, Immunantworten zu stimulieren und das Vorhandensein eines etablierten genetischen System zur Generierung rekombinanter Vektoren [79].

Bei der Spezifität Tumorzellen zu infizieren, spielt der Typ-I-Interferon-Signalweg eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich kann VSV gesunde Zellen nicht von Tumorzellen unterscheiden und ist in der Lage sowohl gesunde, als auch Tumorzellen zu infizieren. Infizierte gesunde Zellen können jedoch, im Vergleich zu Tumorzellen, auf die Infektion mit VSV reagieren, indem sie Typ-I-Interferon produzieren, sezernieren und so einen antiviralen Zustand der Zelle induzieren und die Replikation des Virus verhindern. [44]

Da VSV aber sehr empfindlich auf die antivirale Wirkung von Typ-I-Interferon reagiert, basiert die Tumorspezifität des Virus auf Defekten in der Interferon-Signalisierung [103, 104]. Dazu zählen beispielsweise die verminderte Expression von Typ-I-Interferon-Rezeptor

(IFNAR) [116], oder ein Defekt der doppelsträngigen RNA-abhängigen Proteinkinase [103] in den Tumorzellen. Dies ermöglicht dem Virus sich ungestört in Tumorzellen zu replizieren und zu vermehren, ohne dass eine antivirale Reaktion ausgelöst wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt von VSV als onkolytisches Virus ist die Fähigkeit, eine Immunantwort zu stimulieren. Therapien mit VSV zeigten eine Vielzahl von Immunreaktionen, einschließlich der Induktion von tumorspezifischen CD8⁺-T-Zellen [28]. Außerdem wurden eine schnelle und substantielle Infiltration von Entzündungszellen, wie Neutrophile und natürliche Killerzellen, in das Tumorgewebe festgestellt [7, 111]. Dennoch erzeugt VSV in seiner Wildtyp-Form relativ schwache Immunreaktion, die aber durch virales Engineering als auch durch Kombinationsansätze verbessert werden kann [79].

Präklinische Studien zeigen, dass VSV in einer Vielzahl von Tumormodellen effiziente onkolytische Eigenschaften besitzt. So führte beispielsweise die intratumorale Injektion des Virus in große orthotopisch implantierte HCC in immunkompetenten Ratten zu einer Regression des Tumorwachstums, was das Überleben der Ratten signifikant verlängerte [33]. Ein rekombinantes VSV(M51R)-LacZ, das eine M51R-Mutation im Gen für das Matrix (M)-Protein enthält, führte nach systemischer Applikation zur Regression von Brustkrebsmetastasen in immunkompetenten Mäusen und verlängerte ebenfalls das Überleben dieser Mäuse [32].

In laufenden klinischen Studien wird ein modifiziertes VSV-IFN β verwendet, das das Virus durch die Expression von Interferon β abgeschwächt und damit sicherer machen soll [108], da Wildtyp-VSV bei Patienten wegen der Beobachtung von starken Nebenwirkungen, wie eine schwere Neurotoxizität und Hepatotoxizität nicht angewendet werden kann [53, 107].

2.3.4 Newcastle-Disease-Virus

Das Newcastle-Disease-Virus (NDV) ist ein Mitglied der *Avulavirus*-Gattung und gehört somit zur Familie der *Paramyxoviridae* [4]. Es handelt sich dabei um ein behülltes Einzel (-)-Strang-RNA-Virus (ss(-)-RNA) mit einer Genomlänge von ~ 15,2 kb. Das Virus enthält verschiedene Gene, die für mindestens sieben Proteine codieren, unter anderem zum Beispiel das Nukleoprotein (NP), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) und das V-Protein. [40]. Aufgebaut ist NDV als kugelförmiges Virion mit einer Virushülle, die aus einem Bindungsprotein, der Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und einem Fusionsprotein (F) besteht.

Das F-Protein ist ein Glykoprotein, das sich auf der Oberfläche des NDV befindet. Aufgabe des Proteins ist die Vermittlung der Fusion mit der Wirtszellmembran. Für die Aktivierung des F-Proteins muss zunächst der inaktive Vorläufer F0 von intrazellulären Proteasen in die Untereinheiten F1 und F2 gespalten werden. Die Aktivierung des F-Proteins führt zu einer Verschmelzung der Zellmembran und somit zu einem Mehrkernzustand (Synzytium), wodurch sich das Virus ausbreiten kann. [40, 97]

Die Spaltstelle des F-Proteins ist dabei eine Pathogenitätsdeterminante. Bei Vorhandensein von mehreren basischen Aminosäuren können die Proteasen, die in allen Zellen vorkommen, die Infektiosität des Virus aktivieren. Sind diese jedoch nicht vorhanden, bleibt die Infektion lokal begrenzt. [82]

Das HN-Protein ist ebenfalls ein Glykoprotein auf der Oberfläche des NDV und besitzt mehrere Funktionen. Es dient zum einen als Ligand für Sialinsäure-tragende Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Wirtszelle, zum anderen besitzt das Protein Neuraminidase-Aktivitäten. Des Weiteren fördert das HN-Protein die Fusionsaktivität des F-Proteins, wodurch das Virus in die Wirtszelle eindringen kann. [64]

Die Newcastle-Krankheit (NK), auch bekannt als Newcastle Disease oder Atypische Geflügelpest, ist eine hoch kontagiöse, anzeigepflichtige Allgemeinerkrankung, verursacht durch das Newcastle-Disease-Virus. Betroffen sind Hühner und Puten aller Altersklassen sowie weitere Haus- und Wildvogelarten. Die Erregerstämme unterscheiden sich in ihrer Virulenz (apathogen, lentogen, mesogen oder velogen), gehören aber alle zum Serotyp Paramyxovirus-1 (PMV-1). Für die Diagnose und Prognosestellung ist die Pathogenitätsprüfung des Virus sehr wichtig. Die Sequenzierung der Spaltstelle des F-Proteins oder die Bestimmung der mittleren Zeit zwischen Infektion und Tod zehntätiger Hühnerembryonen stellen zwei Möglichkeiten dar, die Pathogenität des Erregers zu bestimmen. Je nach Erregervirulenz, Wirtsempfänglichkeit und Immunstatus der Tiere unterscheiden sich die Verlaufsformen und Krankheitsbilder der Newcastle-Krankheit. Infizierte Tiere scheiden das Virus über den Darm und die Nieren aus. Sie können aber auch über die Atemluft ausgeschieden und verbreitet werden. Insgesamt spielt der horizontale Übertragungsweg die größte Rolle. Nach einer Inkubationszeit von vier bis sieben Tagen treten die ersten Symptome auf. Bei einer Herdendurchseuchung in Hühnerbetrieben mit einem hochpathogenen NDV liegt die Mortalität bei über 90 %. Typisch ist ein schlagartiger Abfall der Legeleistung und kurzfristiges Auftreten dünnschaliger Eier. Beim Einzeltier lassen sich schwere respiratorische Symptome mit ausgeprägter Dyspnoe, katarrhalische Entzündung der Kopfschleimhäute und Diarrhoe feststellen. Tortikollis, Opisthotonus und

Bewegungsstörungen treten bei einem verlangsamten Verlauf häufig auf. Eine Therapie ist nicht möglich. Zur Prophylaxe schreibt daher die Geflügelpest-Verordnung eine Schutzimpfung aller Hühner- und Putenbestände vor. Bei Menschen kann es nach engem Kontakt mit infizierten Tieren zu unkomplizierten Konjunktividen oder Kopf- und Gliederschmerzen kommen, die ohne Spätfolgen ausheilen. [82]

NDV ist aber nicht nur bekannt für die Auslösung der Newcastle-Krankheit, sondern spielt als onkolytisches Virus auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Immuntherapien gegen Krebserkrankungen. Neben dem direkten onkolytischen Effekt kann NDV durch die Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort des Wirtes auch eine Antitumor-Immunität induzieren [115]. Als direkter zytopathischer Effekt scheint die Apoptose, Nekrose und möglicherweise weitere Zelltodwege als NDV-induzierter Zelltod, eine wichtige Rolle zu spielen. NDV kann durch die Aktivierung sowohl extrinsischer als auch intrinsischer Pfade die Apoptose aktivieren. Infizierte Tumorzellen produzieren den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und den TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), die als Botenstoffe des Immunsystems, durch die Aktivierung der Caspase 8 die Apoptose induzieren können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine NDV-Infektion in allen Zelllinien zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Aktivierung der Caspase 9, ein weiteres wichtiges Enzym des apoptotischen Signalweges, führt. [115]

Eine andere Studie konnte dagegen zeigen, dass die NDV-induzierte Apoptose unabhängig von der Aktivierung der Caspase 8 und der Caspase 9 war. Vielmehr deutete die Studie daraufhin, dass stress-vermittelte Mechanismen des endoplasmatischen Retikulums (ER) für die Induktion der Tumorzell-Apoptose verantwortlich sein können. [35]

Diese Diskrepanzen lassen sich möglicherweise durch unterschiedlich verwendete Zelllinien, Virusstämme und Nachweisverfahren erklären [115].

Zusätzlich zum induzierten Zelltod durch Apoptose im Anschluss an eine Infektion mit NDV kommt vor allem der Bildung von Synzytien eine besondere Bedeutung zu. Es ist bekannt, dass der Untergang der Zellen durch solche Fusionierungen zu dem immunogenen Zelltod zählt. Neben der direkten Lyse der Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die NDV-Infektion die hemmende Wirkung des Mikroumfelds des Tumors überwinden und eine entzündliche Antitumoraktivität hervorrufen kann [115]. Beispielsweise führt die Infektion von Tumorzellen durch NDV zur Expression der HN- und F-Proteine, was die Oberflächenadhäsion für Erythrozyten und Lymphozyten verändert und anschließend zu einer Hochregulation von T-Zell-Aktivierungsmarkern führt [43].

NDV weist im Vergleich zu anderen onkolytischen Viren, wie beispielsweise das Pockenvirus, HSV-1, Adenovirus, Masern und Reovirus-Vektoren mehrere Vorteile auf [115]. Ein Vorteil besteht unter anderem darin, dass NDV ein aviärer Erreger ist und somit das Problem einer bereits bestehenden Immunität der Patienten gegen das Virus umgangen wird. Serologische Studien zeigten, dass 96 % der menschlichen Bevölkerung seronegativ für NDV sind, das heißt, sie hatten noch keinen direkten Kontakt mit dem Erreger [23]. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Pathogenität von NDV gegenüber Menschen. Bei der Verabreichung von virulenten Stämmen zur Überprüfung der Virussicherheit traten nur leichte bis mäßige unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine leichte Bindehautentzündung, Kehlkopfentzündung und grippeähnliche Symptome auf [115].

In einer Reihe von präklinischen Studien konnte die Antitumoraktivität des onkolytischen Virus NDV auf verschiedenste Tumorzellen gezeigt werden. So weisen Ergebnisse einer Studie darauf hin, dass sich NDV effizient und selektiv in Tumorzellen vermehren und diese abtöten kann und *in vivo* zu einer Tumorregression führt [91]. Des Weiteren können Modifikationen des Virus diese antitumoralen Effekte verstärken und verbessern. So konnte rNDV/F3aa(L289A), das ein modifiziertes F-Protein exprimiert, die Zell-Zell-Fusion in menschlichen und Ratten-HCC-Zelllinien fördern und führte in einem präklinischen Rattenmodell für HCC, durch intrahepatische arterielle Verabreichung des Virus, zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens [6]. Neben den präklinischen Untersuchungen existieren auch mehrere klinische Studien, die NDV als onkolytisches Virus bei Krebspatienten einsetzen. Wellstat Biologics Corporation führte insgesamt drei klinische Phase-I-Studien mit der intravenösen Verabreichung von PV701, ein natürlich abgeschwächter, nicht rekombinanter, onkolytischer Stamm des Newcastle-Disease-Virus, bei 114 Patienten mit fortgeschrittenem Krebs durch [74]. In einer der Studien, die hohe Wiederholungsdosen und langsamere Infusionsraten einsetzte, gab es 6 von 19 Patienten, die auf die Therapie antworteten und eine Überlebenszeit von mindestens zwei Jahren aufwiesen [49]. Die Nebenwirkungen in allen drei Studien beinhalteten grippeähnliche Symptome, tumorspezifische Nebenwirkungen und Infusionsreaktionen [74].

Ein großes Problem in Bezug auf die Nutzung des onkolytischen NDV stellt die Klassifizierung velogener und mesogener NDV-Stämme als selektive Erreger durch das Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten (United States Department of Agriculture, USDA) dar [36]. Dazu zählen auch rekombinante Stämme, die eine polybasische F-Protein-Spaltstelle besitzen. Diese Tatsache schränkt die Anwendung und weitere Entwicklung dieser Stämme erheblich ein.

2.3.5 Rekombinantes VSV-NDV-GFP

Das rekombinante VSV-NDV-GFP (rVSV-NDV-GFP) ist ein neuartig entwickelter Hybridvektor, der das Rückgrat von VSV enthält. Dabei wurde das Glykoprotein G von VSV durch die Hämagglutinin-Neuraminidase und die modifizierten, hyperfusogenen Fusions (F)-Hüllproteine von NDV ersetzt (siehe Abbildung 3). Des Weiteren wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) eingefügt, um das Virus durch die Anregung mit ultraviolettem oder blauem Licht sichtbar zu machen. Somit lässt sich das Virus in infizierten Zellen durch die grüne Fluoreszenz lokalisieren. Ziel des rekombinanten VSV-NDV-GFP ist es, die vorteilhaften Eigenschaften beider Viren zu kombinieren und gleichzeitig ihre negativen Effekte zu eliminieren. Der Fokus richtet sich insbesondere darauf, das Sicherheitsrisiko für Mensch und Umwelt so klein wie möglich zu halten und gleichzeitig die Antitumoraktivität zu verbessern. [1]

Trotz guten präklinischen Daten traten unter Verwendung von Wildtyp-VSV starke Nebenwirkungen, wie Neurotoxizität und Hepatotoxizität in Nagetieren und nichtmenschlichen Primaten auf [53, 107]. Durch die Ersetzung des G-Proteins von VSV, das stark im Zusammenhang mit dem Neuro- und Leber-Tropismus in Verbindung gebracht wird, konnte die Sicherheit des Virus deutlich erhöht werden [1]. Im Vergleich dazu hat NDV bei der Anwendung als onkolytisches Virus ein sehr gutes Sicherheitsprofil, das in klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien gezeigt werden konnte [39, 98]. Dennoch darf man den ökologischen und wirtschaftlichen Sicherheitsaspekt nicht außer Acht lassen. NDV stellt, als Erreger der Newcastle-Krankheit, ein Risiko für die Geflügelindustrie dar [82]. Der Einbau der Hüllproteine von NDV in das rekombinante VSV-NDV-GFP macht den Vektor in embryonierten Hühnereiern avirulent und gibt somit Sicherheit für die Umwelt [1].

Um die Antitumoraktivität zu verbessern, wurden die beiden Hüllproteine HN- und F-Proteine in das Rückgrat von VSV eingebaut. Die viralen Fusionsproteine sind in der Lage, mit Plasmamembranen benachbarter, unifizierter Zellen zu fusionieren und große mehrkernige Synzytien zu bilden, über die sich das Virus rasch auf weitere benachbarte Zellen ausbreiten kann. Dieser Mechanismus ermöglicht einem einzelnen Viruspartikel potenziell ein Dutzend umliegender Zellen zu infizieren und zu töten, da es diese in das Synzytium hineinziehen kann. [1]

In diesem Fall wurde zur Optimierung der Synzytien-Bildung das modifizierte F3aa/(L289A)-Fusionsprotein in das Rückgrat von VSV eingesetzt. F3aa ist ein abgewandeltes Fusionsprotein mit einer mehrbasischen Spalt- und Aktivierungsstelle und ist hoch effizient bei der Abtötung von Tumorzellen durch die Bildung großer vielkerniger Zellen [15]. Zusätzlich führt eine Aminosäure-Substitution von Alanin zu Leucin an der Aminosäure 289 (L289A) im F-Protein zu einer noch effektiveren und größeren Synzytium-Bildung [99].

Diese Form des Zelltodes, nämlich die Bildung von Synzytien, wurde als immunogener Zelltod charakterisiert [26] und kann die Antitumor-Immunität verbessern, im Gegensatz zum Tod durch den klassischen zytopathischen Effekt bei einer VSV-Infektion.

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde das optimierte rVSV-NDV-GFP entwickelt, das auf dem sich schnell replizierenden VSV-Rückgrat basiert und wodurch der Tropismus durch den Ersatz des G-Proteins durch die NDV-Hüllproteine verändert wurde. Somit konnten die nützlichen Eigenschaften beider Viren kombiniert werden und gleichzeitig die Sicherheitsprobleme behoben werden.

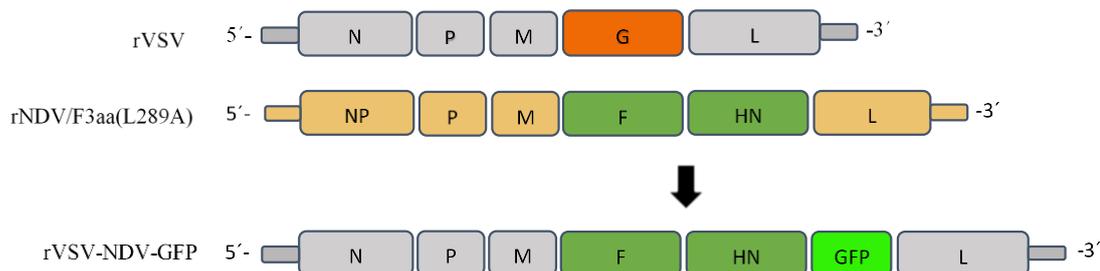


Abbildung 3: Viruskonstrukt von rVSV-NDV-GFP

Das G-Protein (rot) wurde aus dem VSV-Genom entfernt. Stattdessen wurde ein modifiziertes Fusionsprotein F3aa(L289A) (dunkelgrün) und das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) (dunkelgrün) von NDV zwischen die Matrix (M) und Polymerase (L)-Gene von VSV eingesetzt. Zusätzlich wurde das GFP-Protein (hellgrün) hinter das HN-Protein eingebaut.

2.3.6 rVSV-NDV-sPD1-Varianten

Eine neuartige Modifikation des rekombinanten VSV-NDV stellt die Einfügung eines Gens, das für ein lösliches PD1-Protein (sPD1, s=soluble) kodiert, dar. Die Idee ist, dass das modifizierte Virus die Tumorzellen infiziert und anschließend das sPD1-Protein in der infizierten Zelle produziert und ausgeschleust wird. Daraufhin soll das sPD1-Protein an seinen PD-L1-Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen binden und somit den PD-1:PD-L1-Signalweg zwischen Tumorzelle und den aktivierten CD8⁺-T-Zellen verhindern. Das lösliche PD1-Protein soll also wie ein Anti-PD-L1-Antikörper funktionieren, nur dass es durch die Integration in das Virus direkt im Tumorgewebe wirken kann und Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Gabe von Anti-PD-L1 auftreten können, verhindert werden können.

Es wurden vier verschiedene rekombinante VSV-NDV-Konstrukte entwickelt, die allesamt das sPD1-Protein enthalten. Sie unterscheiden sich aber durch weitere Modifikationen des sPD1-Proteins voneinander (siehe Abbildung 4). In einer Viruskonstrukt-Variante wurde das sPD1-Molekül mit einem Fc-Teil ausgestattet (rVSV-NDV-sPD1-Fc). Dies soll das lösliche PD1-Protein nach der Sekretion aus der infizierten Tumorzelle stabiler machen und dafür sorgen, dass es nicht so schnell abgebaut wird. Als weitere Variante wurde das Virus mit einer hoch-affinen HAsPD1-Mutante versehen (rVSV-NDV-HA-sPD1). Diese Mutation (A123L) [67] soll die Affinität von sPD1 zur Bindungsstelle an den Tumorzellen erhöhen und somit die erwünschte Reaktion effizienter machen. Als vierte Variante wurden beide Proteinmodifikationen vereint. rVSV-NDV-HA-sPD1-Fc besitzt sowohl den Fc-Teil für mehr Stabilität, als auch die HA-Mutation für eine höhere Bindungsaffinität zum Liganden PD-L1. Die Transgene wurden als zusätzliche Transkriptionseinheiten zwischen den Genen HN und L eingefügt (Teresa Krabbe, AG Altomonte, Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin II, Klinikum rechts der Isar der TUM).



Abbildung 4: rVSV-NDV-sPD1-Varianten

Das sPD1-Protein wurde in das rekombinante VSV-NDV-Genom zwischen das HN-Protein und der L-Sequenz eingesetzt. Die vier Varianten unterscheiden sich in Fc- und/oder HA-Modifikationen des sPD1-Proteins.

2.3.7 RIG-I

Zellen, die von einem Virus infiziert wurden, können virale RNA-Sequenzen durch sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) erkennen und eine antivirale Antwort auslösen. Der Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) -Rezeptor funktioniert als PRR und gehört zu der Familie der RIG-I-ähnlichen Proteine (RIG-I-like Rezeptors, RLRs). Bislang wurden neben RIG-I noch zwei weitere Moleküle identifiziert, die zur Gruppe der RIG-I-ähnlichen Proteine zählen. Zum einen das Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5), und zum anderen das Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) -Molekül. Exprimiert werden die RIG-I-ähnlichen Proteine in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen, wo sie die antivirale Immunreaktion signalisieren.

Die Struktur des RIG-I lässt sich in drei Domänen aufteilen. Die Endregion des Proteins enthält zwei Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomänen (CARDs). In der Mitte liegt die DExD/H-Box-RNA-Helikase-Domäne, mit der Fähigkeit ATP zu hydrolysieren und am anderen Ende des RIG-I befindet sich eine C-terminale Domäne (CTD) zur Autoregulation. Bei einer Virusinfektion führt die Bindung viraler RNA an RIG-I zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins. Diese Änderung ermöglicht eine Wechselwirkung der CARDs von RIG-I mit dem mitochondrialen antiviralen Signalprotein (MAVS). Dadurch setzt sich eine Kaskade in Gang, die zur Interferon-Produktion und Expression von Signalproteinen mit anschließender antiviraler Antwort führt. [73]

RIG-I spielt aber nicht nur in der antiviralen Immunantwort eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung von RIG-I können das Wachstum und die Entwicklung von verschiedenen Tumorzellen beeinflusst werden [112]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es durch die Erkennung von 5'-Triphosphat durch RIG-I zu einer Aktivierung von Immunzellen wie beispielsweise dendritische Zellen, zur Expression von Interferonen und letztendlich zur Induktion der Apoptose von Melanom-Zellen kam [86]. In einer weiteren Studie wurde RIG-I durch die Infektion verschiedener Tumorzellen mit dem onkolytischen NDV aktiviert. Das Ergebnis war auch hier die Induktion der Apoptose der Tumorzellen durch die Hochregulierung des pro-apoptotischen Proteins TRAIL und der Herunterregulierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, BIRC3 und PRKCE [63]. Es wird aber nicht nur die Apoptose durch die Aktivierung des RIG-I induziert. Gleichzeitig werden durch den RIG-I-Signalweg auch Immunzellen, wie dendritische Zellen oder CD8⁺-T-Zellen, stimuliert [112]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung durch RIG-I-Ligation über eine 3pRNA, das Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren, wie Anti-CTLA-4 verstärkt hat

[45]. Dies spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Verbesserung einer Antitumor-Immunantwort und macht RIG-I zu einem interessanten Schlüsselpunkt in der Krebsimmuntherapie.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

Bei allen Zelllinien, die in den Versuchen benutzt wurden, handelte es sich um adhären wachsende Zellen. Für die Virusproduktion wurden AGE1.CR.pIX Zellen (ProBioGen AG, Berlin) in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Nutrient Mixture F-12 (Ham) kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium 10 % FBS (fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin-Streptomycin zugegeben. Zur Charakterisierung der Virusinfektion *in vitro* und Evaluierung *in vivo* wurden B16-Maus-Melanom-Zelllinien vom Wildtyp (WT) B16.OVA und RIG-I defiziente (RIG-I^{-/-}) B16.OVA Zellen verwendet. Beide Zelllinien (erhalten von Simon Heidegger, AG Poeck, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar der TUM) exprimieren das Hühner-Ovalbumin (OVA) in voller Länge. Gezüchtet wurden die Zellen in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l D-Glucose und zusätzlich zugefügten 10 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1% Nicht-essentielle Aminosäuren und 1 % Natrium-Pyruvat. Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 90 % Feuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt.

Tabelle 1: Reagenzien, die für die Zellkultur verwendet wurden

Reagenzien	Firma
DMEM / F12 (1:1)	gibco®
DMEM (1x) + GlutaMAX	gibco®
DPBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin / EDTA	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
MEM Non-essential Amino Acids Solution	HyClone™, GE Healthcare, USA
Sodium pyruvate solution	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Materialien, die für die Zellkultur verwendet wurden

Materialien/Geräte	Firma
75-cm ² -Zellkulturflaschen	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
25-cm ² -Zellkulturflaschen	TPP® Zellkulturflasche, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
150-cm ² -Zellkulturplatten	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
6-/12-/24-/96-Well-Platte	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
100 - 1000 µl Pipette, Research plus®	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
20 - 200 µl Pipette, Research plus®	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
2 - 20 µl Pipette, Research plus®	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
0,5 - 10 µl Pipette, Research plus®	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland
Tip One RPT, Pipettenspitze 10 µl RNase-, DNase-, DNA- und Pyrogenfrei	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
RPT Filterpipettenspitzen, 20 µl	StarLab GmbH, Hamburg, Deutschland
Universal Fit Pipet Tips, 200 µl	Corning Inc., Corning, USA
ClearLine® Filterpipettenspitzen, 1000 µl	Kisker Biotech GmbH und Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Stripettor™ Ultra pipet controller	Corning Inc., Corning, USA
Serologische Pipetten, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 10 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten, 2 ml	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Mikroskop: OPTECH® Optical Technology	Exacta+Optech GmbH, München, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf AG, Hamurg, Deutschland

Optima XL-100K Ultracentrifuge	Beckman, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml	Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HERAsafe, Scientific Biological Safety Cabinet	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
HERAcell Heraeus, CO ₂ -Incubator	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Reax top Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland

3.1.1 Auftauen der Zellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellaliquote wurden zum Auftauen in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben und für kurze Zeit erwärmt. Die aufgetaute Suspension wurde anschließend vorsichtig in ein mit 10 ml Kulturmedium vorbereitetes Zentrifugenröhrchen pipettiert und zentrifugiert (5 min, 500 g). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml Kulturmedium suspendiert, in eine 25 cm² große Zellkulturflasche gegeben und im Inkubator bei 37 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen trypsinisiert und in eine 75 cm² große Zellkulturflasche transferiert, um sie für längere Zeit zu kultivieren.

3.1.2 Virusinfektion

Am Tag der bevorstehenden Virusinfektion wurde zunächst das verbrauchte Medium der zu infizierenden Zellen abgesaugt und stattdessen DPBS in die Wells pipettiert. Zeitgleich wurde die Virusprobe aus dem Tiefkühlschrank zum Auftauen entnommen. Zur Bestimmung der gewünschten Viruskonzentration wurde die Multiplizität der Infektion (MOI, engl. multiplicity of infection) berechnet. Diese gibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu deren Zielzellen an. Nachdem das Virus mit der errechneten Konzentration zu den zu infizierenden Zellen pipettiert wurde, erfolgte die Verteilung des Virus in den Wells mittels vorsichtig kreisender Bewegungen. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der einstündigen Infektion wurde das DPBS abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt und die Zellen anschließend wieder in den Inkubator gestellt.

3.1.3 Mikroskopie

Der Verlauf der Infektion der Zellen wurde mikroskopisch analysiert. Dazu wurden WT und RIG-I^{-/-} B16.OVA Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/Well auf eine 24-Wellplatte plattiert und mit einer MOI von 0,01 mit VSV-NDV-GFP oder mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert. Die Infektion erfolgte für eine Stunde bei 37 °C in 250 µl DPBS. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und erhielten anschließend frisches Medium. Zu den Zeitpunkten 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurden die Zellen bei einer Vergrößerung von x200 auf einem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Zeiss) visualisiert. Mit einer AxioCam ICm1 Kamera (Carl Zeiss) wurden repräsentative Bilder am Mikroskop aufgenommen.

3.1.4 Wachstumskurven

Virale Wachstumskurven wurden in den beiden Melanom-Zelllinien WT B16.OVA und RIG-I^{-/-} B16.OVA analysiert. Dazu wurden die Zelllinien mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/Well auf je eine 24-Wellplatte plattiert. Mit einer MOI von 0,01 wurden beide Zelllinien mit VSV-NDV-GFP oder mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert. Die Infektion erfolgte in 250 µl DPBS bei 37 °C im Inkubator. Nach einer Stunde wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und erhielten anschließend frisches Medium. Nach 0, 16, 24, 48 und 72 h wurde jeweils 50 µl vom Überstand gesammelt und der Virustiter mit dem TCID₅₀-Assay bestimmt (siehe 3.1.8).

3.1.5 LDH-Assay

Um die Zytotoxizität nachzuweisen wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) im Verlauf der Virusinfektion *in vitro* bestimmt. Dazu wurden WT und RIG-I^{-/-} B16.OVA Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/Well auf eine 24-Wellplatte plattiert. Beide Zelllinien wurden mit VSV-NDV-GFP, den VSV-NDV-sPD1-Varianten oder PBS mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Infektion erfolgte in 250 µl DPBS für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und erhielten neues Medium. Nach 16, 24, 48 und 72 h wurden Aliquote vom Überstand der infizierten Wells gesammelt. Die nicht infizierten Zellen wurden vor der Probenentnahme zu jedem Zeitpunkt mit einem Lyse-Puffer für 30 min lysiert, um die maximale LDH-Freisetzung ermitteln zu können. Nachdem alle Proben gesammelt wurden, konnte die LDH-Freisetzung mit dem Protokoll des nichtradioaktiven CytoTox96® Zytotoxizitätstest (CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, Madison, USA) bestimmt werden. Anschließend

wurde der gemessene LDH-Freisetzungswert mit der maximalen Kontroll-LDH-Freisetzung der nicht infizierten Zellen ins Verhältnis gesetzt, was schließlich die prozentuale Zytotoxizität ergab (3-1).

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{LDH Freisetzungsmesswert}}{\text{Maximale Kontroll LDH Freisetzung}} \times 100 \quad (3-1)$$

3.1.6 Western Blot

Die Expression und Sekretion des sPD1-Proteins infizierter Tumorzellen wurde mit der Western Blot-Methode nachgewiesen. Dazu wurden WT B16.OVA Zellen in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/Well auf eine 6-Wellplatte plattiert. Anschließend wurden die Zellen mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten mit einer MOI von 0,01 infiziert. Zur Positivkontrolle wurden Zellen in einem Well mit sPD1 oder sPD1-Fc transfiziert. Nach 16, 24, 48 und 72 h wurden die Überstände und die Zellen für den anschließenden Western Blot gesammelt. Dazu wurde zu jedem Zeitpunkt zunächst der Überstand mit einem speziellen Größenausschluss-Filter (size exclusion filter, Amicon[®] Ultra-2 Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit einem 15 kD cut-off-Wert für 30 min zentrifugiert und konzentriert. Bis zur Auswertung wurden die Proben bei -20 C im Tiefkühlschrank gelagert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit einem Lyse-Puffer mit Protease-Inhibition für 10 min inkubiert, in ein Eppi transferiert und bei -20 C im Kühlschrank gelagert. Am Tag der Auswertung wurde die Proteinkonzentration des Überstandes und des Zellaufschlusses mit Hilfe des Pierce Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assays (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Anschließend wurden 10 µg jeder Probe auf ein 10 %iges Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) -Gel pipettiert und die Proben bei 100 Volt für 2 h in dem Gel laufen gelassen. Danach wurden die Proteinbanden des Gels auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Banden wurden anschließend mit Hilfe einer Chemilumineszenz (Amersham ECL Prime Western blot detection kit, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, USA) sichtbar gemacht.

3.1.7 Virusproduktion

Für die Virusproduktion wurden AGE1.CR.pIX auf 25 Platten (Durchmesser 15 cm) expandiert. Bei Erreichen des optimalen Infektionszeitpunktes (80 % Konfluenz) wurde das Medium gewechselt, die Platten mit einer MOI von 0,001 mit dem Virus infiziert und für ca. 48 Stunden in den Inkubator gestellt. Um den passenden Erntezeitpunkt zu bestimmen, wurden die Platten unter dem Mikroskop beurteilt. Dieser liegt vor, wenn rund 80 % der Zellen große Synzytien gebildet, sich aber noch nicht vom Boden abgelöst haben. Um das Virus zu ernten, wurde das Medium der Platten in Zentrifugenröhrchen (50 ml) gesammelt und zentrifugiert (5 min, 200 g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und nochmals zentrifugiert (1 h, 25000g Beckmann TI70 Rotor, 4 °C). Die entstandenen Pellets aus der Ultrazentrifugation wurden in 2 ml DPBS gepoolt und auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde auf die verbliebene Zellschicht der Platten 0,001 % Triton X gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurden die Zellen mit einem Schaber von den Platten geschabt und in den Zentrifugenröhrchen mit den Zellpellets der ersten Zentrifugation gepoolt. Die Zellen wurden mit dem Vortexmischer vermischt (1 min), sonifiziert (5 min), gevortext (1 min) und anschließend zentrifugiert (10 min, 100 g, 4 °C). Der Überstand wurde in die Ultrazentrifugenröhrchen transferiert. Zu dem verbleibenden Zellpellet wurde nochmals 0,001 % Triton X dazugegeben und die Zellen daraufhin vermischt und zentrifugiert (15 min, 200 g, 4 °C). Dieser Überstand wurde zu dem bereits in den Ultrazentrifugenröhrchen befindlichen Überstand transferiert und zentrifugiert (1 h, 25000 g, Beckmann Ti70 Rotor, 4 °C). Die Pellets der zweiten Ultrazentrifugation wurden in 2 ml DPBS gepoolt und zu der Suspension der ersten Ultrazentrifugation gegeben. Zur finalen Aufreinigung des Virus wurde in zwei Ultrazentrifugenröhrchen ein Saccharose-Gradient vorbereitet (Unterschicht: 8 ml 60 %ige Saccharose, Mittelschicht: 6 ml 30 %ige Saccharose, Oberschicht: 3 ml 10 %ige Saccharose). Auf diesen Gradienten wurde ganz vorsichtig die gepoolte und konzentrierte Virussuspension beider vorangegangener Ultrazentrifugenschritte pipettiert und zentrifugiert (1 h, 25000 g, Beckmann Ti70 Rotor, 4 °C). Schließlich erscheint das Virus als weiße Bande ungefähr am Übergang der unteren und mittleren Schicht des Saccharose-Gradienten. Mit einer 2 ml-Spritze und 20 G-Kanüle wurde das Virus aus dem Gradienten aufgenommen und aliquotiert. Anschließend wurden die beschrifteten Aliquote eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.8 TCID₅₀-Assay: Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter wurde mit Hilfe des TCID₅₀-Assays (50 % Tissue Culture Infectious Dose) quantifiziert. Dazu wurden 2×10^6 AGE1.CR.pIX Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät. Am Tag der Infektion wurde eine Verdünnungsreihe (1×10^{-2} - 1×10^{-9}) der Virusprobe in Zellkulturmedium vorbereitet, vierfach auf die 96-Well-Platte pipettiert und anschließend im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach 72 h erfolgte die Auswertung der infizierten Platten unter dem Mikroskop. Untersucht wurden die Zellen auf den für das Virus spezifischen zytopathischen Effekts und der Virustiter konnte anschließend unter Verwendung des TCID₅₀-Calculators (© Marco Binder, Dept. Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University, Deutschland) bestimmt werden. (TCID₅₀ is calculated by the Spearman & Kärber algorithm as described in Hierholzer & Killington (1996), Virology Methods Manual, p.374)

3.2 Versuchstiere

Die Studie wurde im Rahmen eines von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrages durchgeführt (Az 55.2-1-54-2532-111-2014).

Im Rahmen der Studie wurden ausschließlich weibliche C57Bl6/J Mäuse aus Janvier (Jackson Laboratory) verwendet.

Die Generierung der subkutanen Tumore erfolgte in einem Alter zwischen 6-8 Wochen.

3.2.1 Versuchstierhaltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Umsetzung der EU-Richtlinie 2010/63.

Alle Tiere wurden in Sealsafe Next Greenline IVC-Käfigen der Firma Tecniplast Typ GM500 mit HEPA-Filtern gehalten. Die Besatzdichte richtet sich nach der EU-Richtlinie 2010/63. Jeder Käfig ist mit einem roten Häuschen aus Polycarbonat und Nistmaterial (autoklavierter Zellstoff) ausgestattet. Die Einstreu (Holzgranulat, Select fine der Firma Ssniff) wird zweimal pro Woche gewechselt. Die Mäuse erhalten ad libitum Futter (FA. Altromin, Haltungsfutter No. 1324SP Ratte/Maus, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt) und Trinkwasser (autoklaviert), das vom Pflegepersonal einmal pro Woche gewechselt wird. Zusätzlich werden die Tiere täglich vom Pflegepersonal in Augenschein genommen.

Im Tierhaltungsraum herrscht ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase, eine Luftfeuchte von 45-60 % und eine Temperatur von 20-24 °C.

Der gesamte Tierhaltungsbereich unterliegt einer personenlimitierten Zutrittskontrolle und es gelten hohe Hygienestandards. (Anlegen spezieller Schutzkleidung in Hygieneschleuse vor Betreten des Haltungsraumes)

Die Tiere erhalten nach Ankunft mindestens eine Woche Eingewöhnungszeit vor dem Versuch. Während der gesamten Studie wurden die Tiere regelmäßig von der versuchsdurchführenden Person kontrolliert und nach im Tierversuchsantrag festgelegten Kriterien beurteilt (siehe Tabelle 3). Bei Erreichen der im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien wurden die Tiere unter Isoflurannarkose mittels Genickbruch euthanasiert.

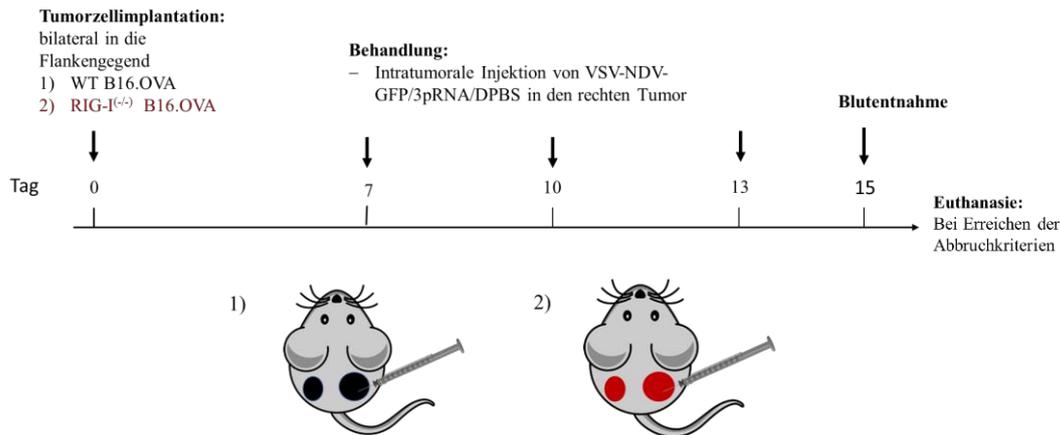
Tabelle 3: Kriterien zur Beurteilung der Tiere während des Versuches

Merkmal	Normalverhalten (0 Punkte)	Auffälligkeiten (1 Punkt)	Direkter Abbruch (4 Punkte)
Verhalten	Motorische Aktivität unauffällig, normales Muster proziierten Verhaltens	Motorische Aktivität gedämpft, normales Muster provozierten Verhaltens	Provoziertes Verhalten erheblich gedämpft
Zustand des Felles	Normal		Ungepflegtes Fell, Piloerektion
Sozialverhalten in der Gruppe	Normal		Apathie, Tier zieht sich zurück
Körperöffnungen	Normal		Anogenital-Prolaps Verkrustung von Augen / Maul
Atmung	Normal	Gering beschleunigt	Deutlich beschleunigt oder erschwert
Körperhaltung	Normal	Intermittierende Buckelhaltung	Permanente Buckelhaltung
% Veränderung des individuellen Körpergewichts	Keine Veränderung	Gewichtsabnahme bis zu 20%	Gewichtsabnahme ab 20%
Body condition scoring	BC3 –BC4	BC2, BC5	BC1
Impfreaktion an	Keine	Lokale Rötung, Schwellung	Lahmheit durch Entzündung

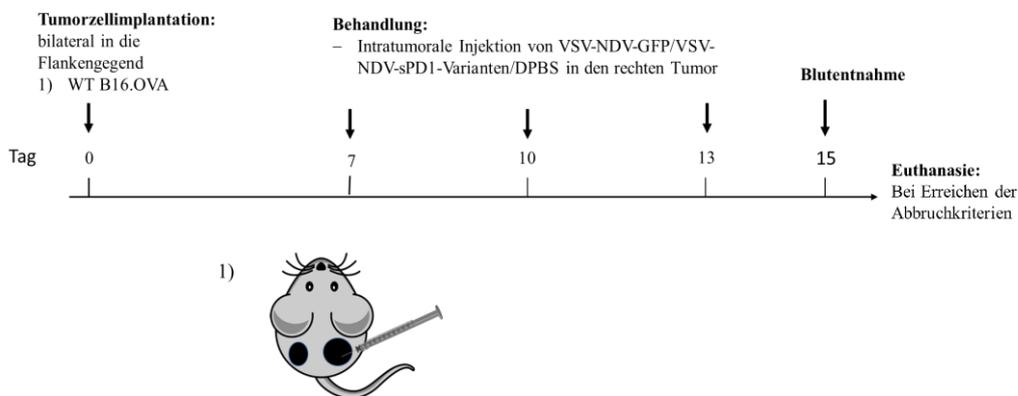
3.2.2 Versuchsablauf der Überlebensstudien

Bei allen Überlebensstudien erfolgte die Tumorgenerierung in 6-8 Wochen alten weiblichen C57Bl6/J Mäusen. Dazu wurden die Tumorzellen WT B16.OVA und/oder RIG-I^{-/-} B16.OVA subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Die rechten Tumore wurden mit einer höheren Anzahl an Tumorzellen induziert, um eine schnellere Wachstumsdynamik im Vergleich zum linken Tumor zu ermöglichen. Nach einer Woche erhielten die Mäuse die erste Behandlung. Bei allen Überlebensstudien wurde entweder Virus (VSV-NDV-GFP/VSV-NDV-sPD1-Varianten), 3pRNA oder DPBS als Kontrolle in den rechten Tumor injiziert. Gleichzeitig erhielten die Mäuse bei der Überlebensstudie C (siehe Abbildung 6) den Antikörper Anti-CTLA-4 oder den Isotyp-Kontrollantikörper per intraperitonealer Injektion. Die jeweiligen Behandlungsschemata wurden an Tag 10 und an Tag 13 wiederholt. Zwei Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Blutentnahme zur Analyse der T-Zell Immunantwort aus der *Vena facialis*. Während des gesamten Versuches wurden die Tumore täglich vermessen und die Tiere kontrolliert. Bei Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere euthanasiert.

A



B



C

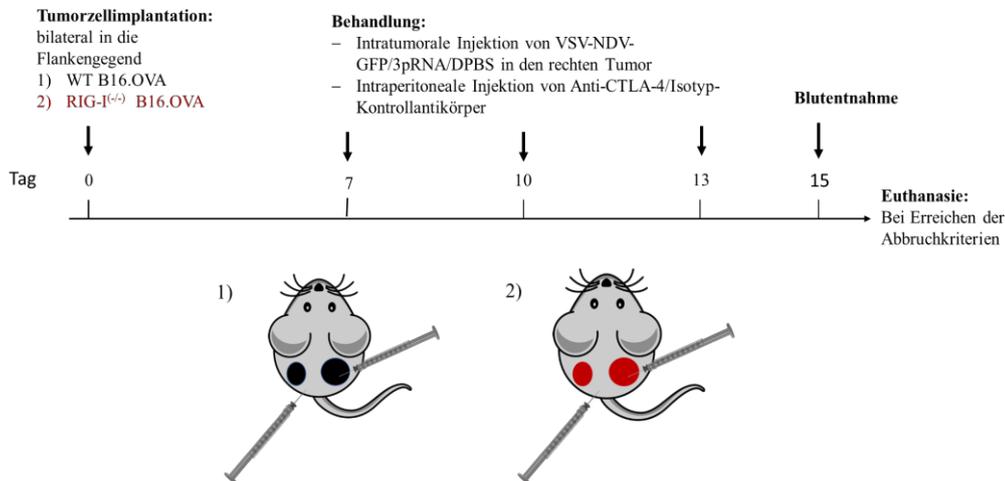


Abbildung 6: Behandlungsschemata der Überlebensstudien

A Überlebensstudie: C57Bl6/J Mäusen wurden WT B16.OVA oder RIG-I^{-/-} B16.OVA Zellen implantiert. An Tag 7, 10 und 13 wurden die Mäuse mit VSV-NDV-GFP/3pRNA/DPBS intratumoral behandelt. **B Überlebensstudie:** C57Bl6/J Mäusen wurden WT B16.OVA Zellen implantiert. An Tag 7, 10 und 13 wurden die Mäuse mit VSV-NDV-sPD1-Varianten/DPBS intratumoral behandelt. **C Überlebensstudie:** C57Bl6/J Mäusen wurden WT B16.OVA oder RIG-I^{-/-} B16.OVA Zellen implantiert. An Tag 7, 10 und 13 wurden die Mäuse mit VSV-NDV-GFP/3pRNA/DPBS intratumoral behandelt. Zeitgleich erhielten die Mäuse Anti-CTLA-4/Isotyp-Kontrollantikörper intraperitoneal. **A-C** Allen Mäusen wurde an Tag 15 Blut abgenommen und bei Erreichen der Abbruchkriterien erlöst.

3.2.3 Vorbereitung der Zellen zur Tumorimplantation

Die Zellen (WT B16.OVA/RIG-I^{-/-} B16.OVA) wurden spätestens zwei Wochen vor geplanter Implantation aufgetaut, kultiviert und expandiert. Damit sich die Zellen zum Zeitpunkt der Implantation in einer Wachstumsphase befanden, wurden die Zellen 24 h vor der Zellvorbereitung nochmals gesplittet. Am Tag der Tumorimplantation wurde das verbrauchte Medium zunächst abgesaugt und die toten Zellen mittels DPBS aus der Zellkulturflasche abgewaschen. Nach dem Trypsinieren und der Inaktivierung von Trypsin mittels FBS-haltigem Medium wurden die Zellen in einem 50 ml Falcon Tube gepoolt und zentrifugiert (10 min, 500 g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit DPBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Zur Ermittlung der Zellkonzentration wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau angefärbt, auf den Zähler (Luna Cell Counting Slide, Logos Biosysteme, Anyang, Südkorea) pipettiert und im Zellzähler (Luna Fl, Dual Fluorescence Cell Counter, Logos Biosystems, Anyang, Südkorea) ausgewertet. Anhand der somit ermittelten Zellzahl konnte die Suspension entsprechend der gewünschten Konzentration verdünnt werden. (Für die rechte Tumorimplantation: $2,4 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$; für die linke Tumorimplantation: $1,2 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$). Bis zur subkutanen Tumorimplantation wurden die Zellen auf Eis gelagert.

3.2.4 Subkutane Tumorgenerierung in der Maus

Einen Tag vor der geplanten Tumorimplantation wurden die Mäuse am Unterbauch mit Octenisept[®] (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert, mit einem Skalpell (Feather[®] Disposable Scalpel No. 21) rasiert und mit Dexpanthenol-Salbe (Dexpanthenol-Salbe 5 %, Klinikum rechts der Isar der TUM, Krankenhausapotheke, München) eingecremt. Die beiden Melanom-Zelllinien WT B16.OVA und RIG-I^{-/-} B16.OVA wurden nach dem Protokoll zur Tumorimplantation (siehe 3.2.3) vorbereitet.

Die Tumorinduktion erfolgte mittels subkutaner Injektion (BD Plastipak Spr. 1 ml Sub-Q 26G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) der Tumorzellen in die rechte ($2,4 \times 10^5$ Zellen/50 µl) und linke ($1,2 \times 10^5$ Zellen/50 µl) Flankengegend (siehe Abbildung 7). Nach einer Woche erreichten die Tumore die gewünschte Größe für die Behandlung. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Tumore täglich vermessen (Horex, Digitaler Messschieber IP67, Hoffmann GmbH Qualitätswerkzeuge, München, Deutschland) und die Tiere kontrolliert. Das Tumolvolumen wurde mit der Formel $\frac{4}{3} \cdot \text{PI} \cdot \left(\frac{L+W}{4}\right)^3$ (AG

Poeck, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum rechts der Isar der TUM) berechnet, wobei L der längste und W der kürzeste Durchmesser des Tumors ist.

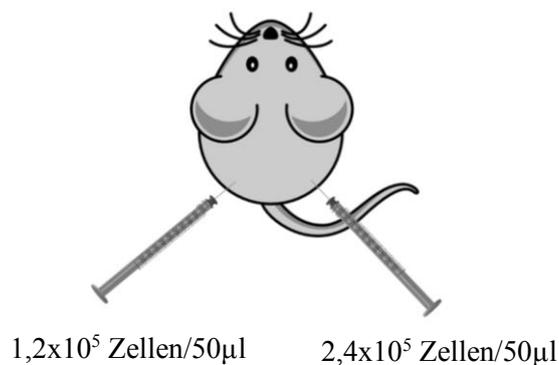


Abbildung 7: Injektionsstellen zur subkutanen Tumorzellimplantation in die Flankengegend

3.2.5 Vorbereitung der Reagenzien für die Behandlung

Am Tag der Behandlung wurde die Virusprobe (VSV-NDV-GFP/VSV-NDV-sPD1-Varianten) aus dem -80 °C Kühltank aufgetaut und die benötigte Viruskonzentration von 1×10^7 TCID₅₀ in 50 μ l DPBS vorbereitet. Bis zur Tumordinjektion wurde das Virus auf Eis gelagert.

Die 3pRNA (AG Poeck, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum rechts der Isar der TUM) wurde aus dem -20 °C Kühltank aufgetaut und mit 5 %iger Glucose in der errechneten Konzentration (25 μ g 3pRNA/50 μ l) vermischt. Zeitgleich wurde JetPEI mit 5 %iger Glucose vermischt und für 10 Minuten inkubiert und anschließend zu der 3pRNA-Lösung pipettiert. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe bis zur intratumoralen Injektion auf Eis gelagert.

Für die Kontrollgruppen wurde DPBS aliquotiert und bis zur Tumordinjektion auf Eis gelagert.

Sowohl der Antikörper Anti-CTLA-4 (anti-mouse CTLA-4 (CD152), BioXCell, West Lebanon, USA) als auch der Isotyp-Kontrollantikörper (Polyclonal Syrian Hamster IgG, BioXCell, West Lebanon, USA) wurden in der gewünschten Konzentration (1. Injektion: 200 μ g/200 μ l; 2.+3. Injektion 100 μ g/200 μ l) mit DPBS verdünnt und bis zur Injektion auf Eis gelagert.

3.2.6 Intratumorale und intraperitoneale Injektion

Die intratumorale Injektion von Virus, 3pRNA oder DPBS in einem Gesamtvolumen von 50 µl erfolgte mit einer 27 G Spritze (BD Plastipak 1 ml Test 27 G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) in den Tumor der rechten Flanke. Insgesamt wurde die Behandlung dreimal im Abstand von drei Tagen durchgeführt.

Die Antikörper-Injektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200 µl intraperitoneal in den unteren rechten Quadranten mittels einer 27 G Spritze (BD Plastipak 1 ml Test 27 G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Insgesamt erfolgte die Behandlung dreimal im Abstand von drei Tagen.

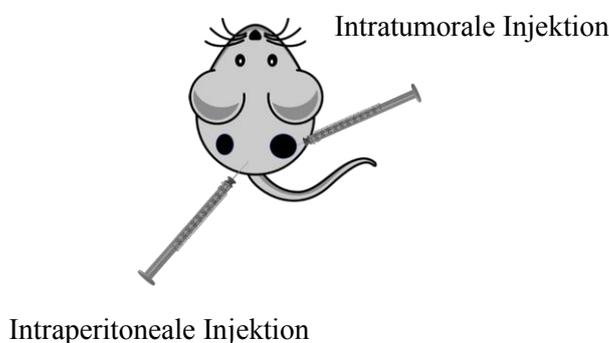


Abbildung 8: Injektionsstellen zur Behandlung

3.2.7 Blutentnahme

Zwei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Abnahme von 50 µl Blut zur Analyse der T-Zell-Immunantwort. Dazu wurde mit Hilfe einer 5 mm Blutlanzette (Supra Blutlanzetten, megro GmbH & Co. KG, Wesel, Deutschland) die *Vena facialis* im Unterkieferbereich punktiert, das Blut in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen, geschwenkt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

3.2.8 PBMC-Isolation und FACS

Mittels der Durchflusszytometrie wurde das entnommene Blut auf eine spezifische T-Zell-Immunantwort analysiert. Dazu wurden je 50 µl der Blutproben mit je 50 µl DPBS (1:1) verdünnt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und die Proben mit je 5 ml Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer inkubiert. Nach 5 min wurde die Reaktion mit 5 ml DPBS (1:1) gestoppt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nochmals mit 5 ml RBC Lysis Buffer resuspendiert, für 5 min inkubiert, mit 5 ml DPBS gestoppt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit einem FcR-Blocker (1:200) resuspendiert, um ungewünschte Antikörperbindungen zu blockieren. Anschließend wurden die Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert und bei 4 °C für 25 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 % FBS gestoppt, für 5 min bei 200 g zentrifugiert und der Überstand weggekippt. Danach wurde zu jeder Probe in einer Verdünnung von 1:100 das OVA-spezifische Tetramer, konjugiert mit dem PE (Phycoerythrin) Fluorochrom gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 20 min wurde zu jeder Probe der Antikörper-Mix (Anti-CD3 konjugiert mit VioBlue, Anti-CD8 konjugiert mit APC (Allophycocyanin)) in einer Verdünnung von 1:200 pipettiert und bei Raumtemperatur für 40 min im Dunkeln inkubiert. Um nicht spezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben zweimal mit 150 µl DPBS gewaschen, zentrifugiert und letztendlich für die Durchflusszytometrie in 180 µl DPBS resuspendiert. Alle Proben wurden mit dem Gallios Flow Cytometer von Beckman Coulter analysiert.

Tabelle 4: Reagenzien, die für die Durchflusszytometrie verwendet wurden

Reagenzien	Firma	Fluochrome	Anregungs- maximum	Emissions- maximum
RBC Lysis Buffer (10x)	BioLegend®			
FcR Block				
OVA-Tetramer-PE	MBL®	Phycoerythrin	565 nm	575 nm
CD3-VioBlue	Miltenyi Biotec		400 nm	452 nm
CD8-APC	Miltenyi Biotec	Allophycocyanin	652 nm	660 nm

3.3 Statistische Analysen

Alle Daten wurden mit GraphPad Prism Version 8 (GraphPad software, La Jolla, Kalifornien, USA) dargestellt und statistisch ausgewertet. Bei allen Analysen wurde ein Konfidenzintervall von 95 % angewendet, wobei p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurden. Es wurde in allen Analysen ein zweiseitiges Signifikanzniveau verwendet. Dabei wurde die statistische Signifikanz durch ein bis drei Sternchen dargestellt. Ein Sternchen (*) bedeutet, dass die p-Werte kleiner als 0,05 sind, zwei Sternchen (**) bedeuten, dass die p-Werte kleiner als 0,01 sind und drei Sternchen (***) bedeuten, dass die p-Werte kleiner als 0,001 sind.

Alle Überlebensdaten der Überlebensstudien wurden in Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt und mit dem Logrank-Test analysiert.

Zur statistischen Analyse der FACS-Daten wurde der ungepaarte T-Test verwendet, da der Vergleich zwischen zwei unabhängigen und ungepaarten Behandlungsgruppen gezogen und eine parametrische Verteilung angenommen wurde. Die Ergebnisse wurden als Balkendiagramme mit individueller Verteilung dargestellt.

Gruppen, die miteinander verglichen wurden, aber keine Signifikanz aufwiesen, sind nicht explizit in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Statistische Analyse

Abbildung	Experiment	Vergleich	Signifi- kanz	p-Wert	Test- Methode
Abbildung 20	Überlebensstudie A	PBS vs. 3pRNA	*	0,0142	Logrank-Test
Abbildung 20	Überlebensstudie A	PBS vs. VSV-NDV-GFP	**	0,0061	Logrank-Test
Abbildung 23	Überlebensstudie B	PBS vs. VSV-NDV-GFP	*	0,0102	Logrank-Test
Abbildung 23	Überlebensstudie B	PBS vs. VSV-NDV-sPD1-Fc	***	0,0006	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	PBS + Kontroll-AK vs. 3pRNA + Kontroll-AK	**	0,0018	Logrank-Test

Material und Methoden

Abbildung 26	Überlebensstudie C	PBS + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-GFP + Kontroll-AK	**	0,0045	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	PBS + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-HA-sPD1-Fc	*	0,0157	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	PBS + Kontroll-AK vs. PBS + Anti-CTLA-4	**		Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	3pRNA + Kontroll-AK vs. 3pRNA + Anti-CTLA-4	*	0,0370	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	VSV-NDV-GFP + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-GFP + Anti-CTLA-4	**	0,0044	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C	VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Anti-CTLA-4	**	0,0064	Logrank-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C: Blut-Analyse	PBS + Kontroll-AK vs. PBS + Anti-CTLA-4	*	0,0105	Ungepaarter t-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C: Blut-Analyse	VSV-NDV-GFP + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-GFP + Anti-CTLA-4	*	0,0122	Ungepaarter t-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C: Blut-Analyse	VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Anti-CTLA-4	***	0,0004	Ungepaarter t-Test
Abbildung 26	Überlebensstudie C: Blut-Analyse	3pRNA + Kontroll-AK vs. 3pRNA + Anti-CTLA-4	*	0,0137	Ungepaarter t-Test

Material und Methoden

Abbildung 29	Überlebensstudie D	PBS + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-GFP + Kontroll-AK	*	0,0143	Logrank-Test
Abbildung 31	Vergleich Überleben WT vs. RIG-I ^{-/-}	3pRNA + Kontroll- AK	*	0,0257	Logrank-Test
Abbildung 31	Vergleich Überleben WT vs. RIG-I ^{-/-}	VSV-NDV-GFP + Anti-CTLA-4	**	0,0021	Logrank-Test
Abbildung 31	Vergleich Überleben WT vs. RIG-I ^{-/-}	VSV-NDV-HA- sPD1-Fc + Kontroll- AK	*	0,0364	Logrank-Test
Abbildung 31	Vergleich Überleben WT vs. RIG-I ^{-/-}	VSV-NDV-HA- sPD1-Fc + Anti- CTLA-4	**	0,0064	Logrank-Test

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung der onkolytischen Viren *in vitro*

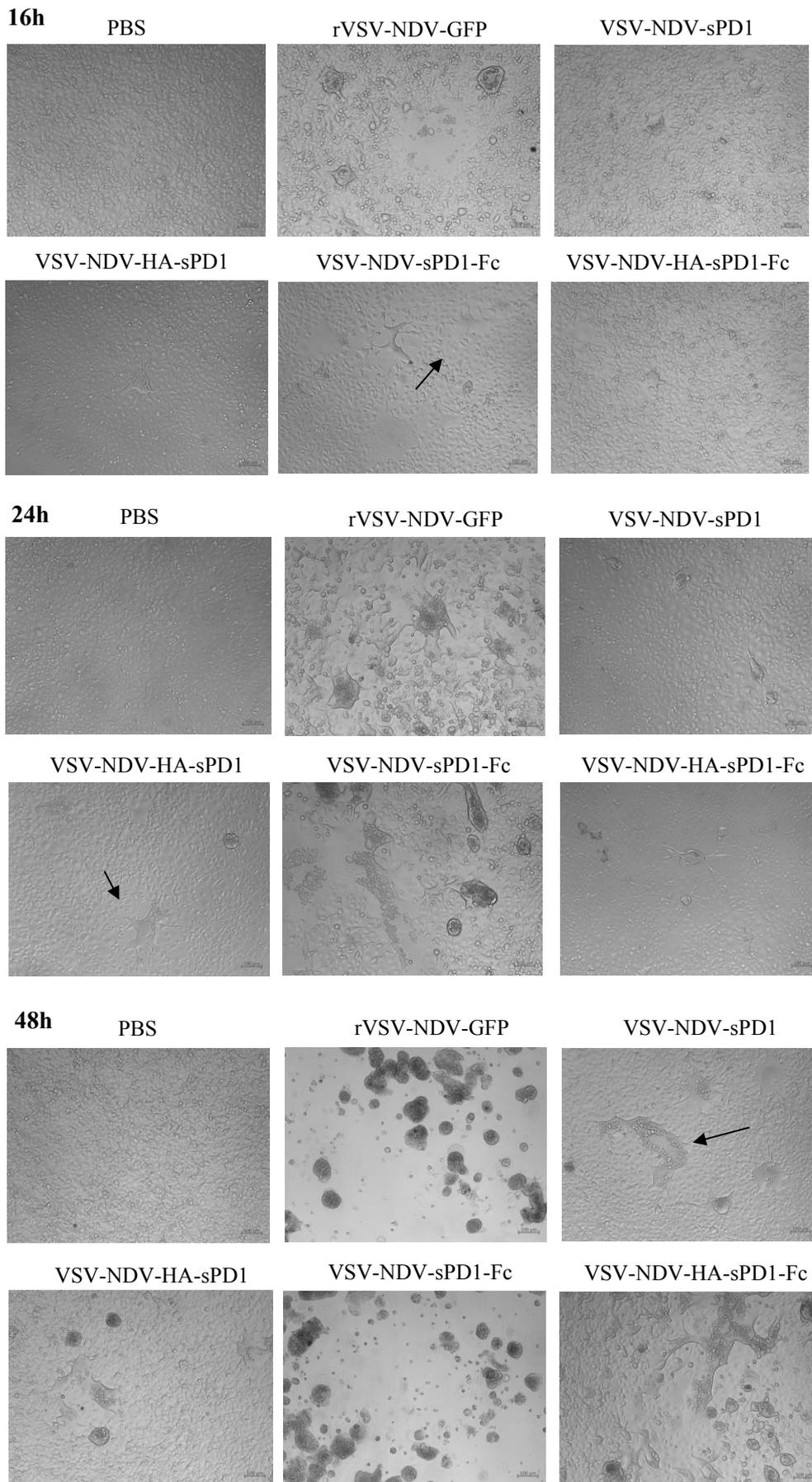
4.1.1 WT B16.OVA-Zellen lassen sich infizieren und bilden Synzytien aus

Um festzustellen, ob sich die WT B16.OVA-Zellen mit rVSV-NDV-GFP oder den neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten infizieren lassen und Synzytien ausgebildet werden, wurden die Zellen im Verlauf der Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch untersucht und Bilder aufgenommen (siehe Abbildung 9). Außerdem wurde diese Methode verwendet, um die neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten zum einen untereinander, zum anderen im Vergleich zu VSV-NDV-GFP in der Infektionsfähigkeit und der Ausbildung von Synzytien zu prüfen.

Die Mikroskop-Aufnahmen zeigten schon 16 h nach der Infektion von WT B16.OVA-Zellen erste Synzytien-Ausbildungen in allen infizierten Wells. Nach 24 h machte sich deutlich, dass die Infektion mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc deutlich fortgeschritten war. Über die Hälfte der WT B16.OVA-Zellen waren in große Fusionspartikel eingeschlossen, die sich teilweise über das ganze Well erstreckten. Im Vergleich dazu lagen die drei VSV-NDV-sPD1-Varianten in der Infektion der Tumorzellen zurück und es waren nur vereinzelt Zellfusionierungen zu sehen.

Bereits nach 48 h hatten sich alle Tumorzellen von der Monoschicht der Wells, die mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc infiziert waren, gelöst und flotierten als Zellklumpen im Medium. Nach 72 h hatte sich die Infektion der drei übrigen VSV-NDV-sPD1-Varianten verzögert in Form von mehreren Synzytien über das gesamte Well ausgebreitet.

Alle Viren waren in der Lage, die WT B16.OVA-Zellen zu infizieren. VSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc zeigten einen gleichen zeitlichen Verlauf der Synzytien-Bildung, bis hin zur völligen Ablösung und Tötung der Tumorzellen. Im Vergleich dazu war die Infektion und die Ausbildung von Tumorzellfusionen in den mit den anderen VSV-NDV-sPD1-Varianten infizierten Wells zeitlich verzögert. Der Unterschied des zeitlichen Verlaufs der Infektion mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten war unerwartet und es ist bisher nicht bekannt, woran das liegen könnte.



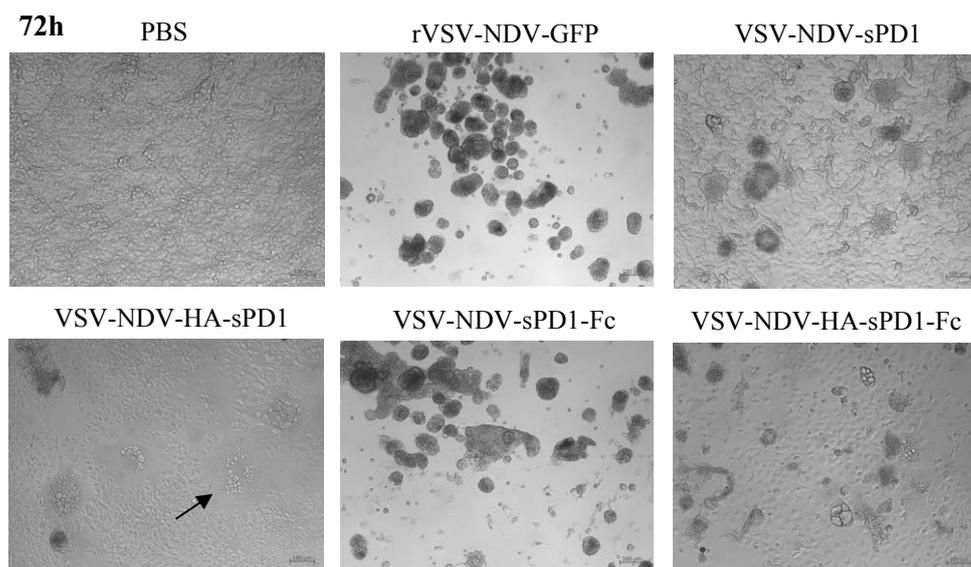


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen infizierter WT B16.OVA

WT B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI 0,01). 16h, 24h, 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen mit einer Vergrößerung von x200 visualisiert und Bilder gemacht. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf die gebildeten Synzytien.

Zusätzlich zu den Hellfeld-Aufnahmen wurde das fluoreszierende GFP, das von mit rVSV-NDV-GFP infizierten Zellen exprimiert wird, mit Hilfe des ultravioletten Lichts unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Ziel war es, die Lokalisation des Virus innerhalb der Synzytien nachzuweisen (siehe Abbildung 10).

Die Aufnahmen zeigten nach 16 h und 24 h ein deutliches GFP-Signal, ausgehend von den gebildeten Tumorzellfusionierungen. Die umliegenden Zellen fluoreszierten dagegen nicht, was darauf schließen ließ, dass diese Zellen noch nicht, oder auf einem niedrigen Niveau infiziert waren. Nach 48 h ließ sich keine Fluoreszenz mehr detektieren, da zu diesem Zeitpunkt bereits alle Zellen abgestorben waren.

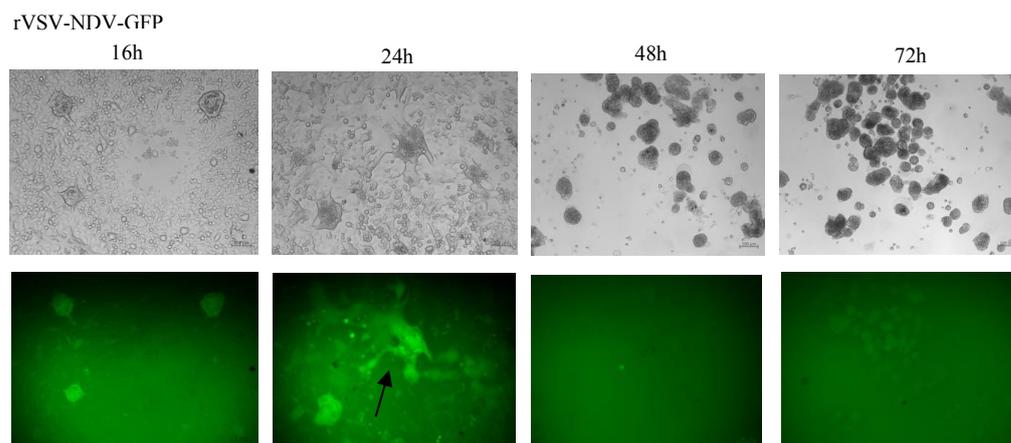


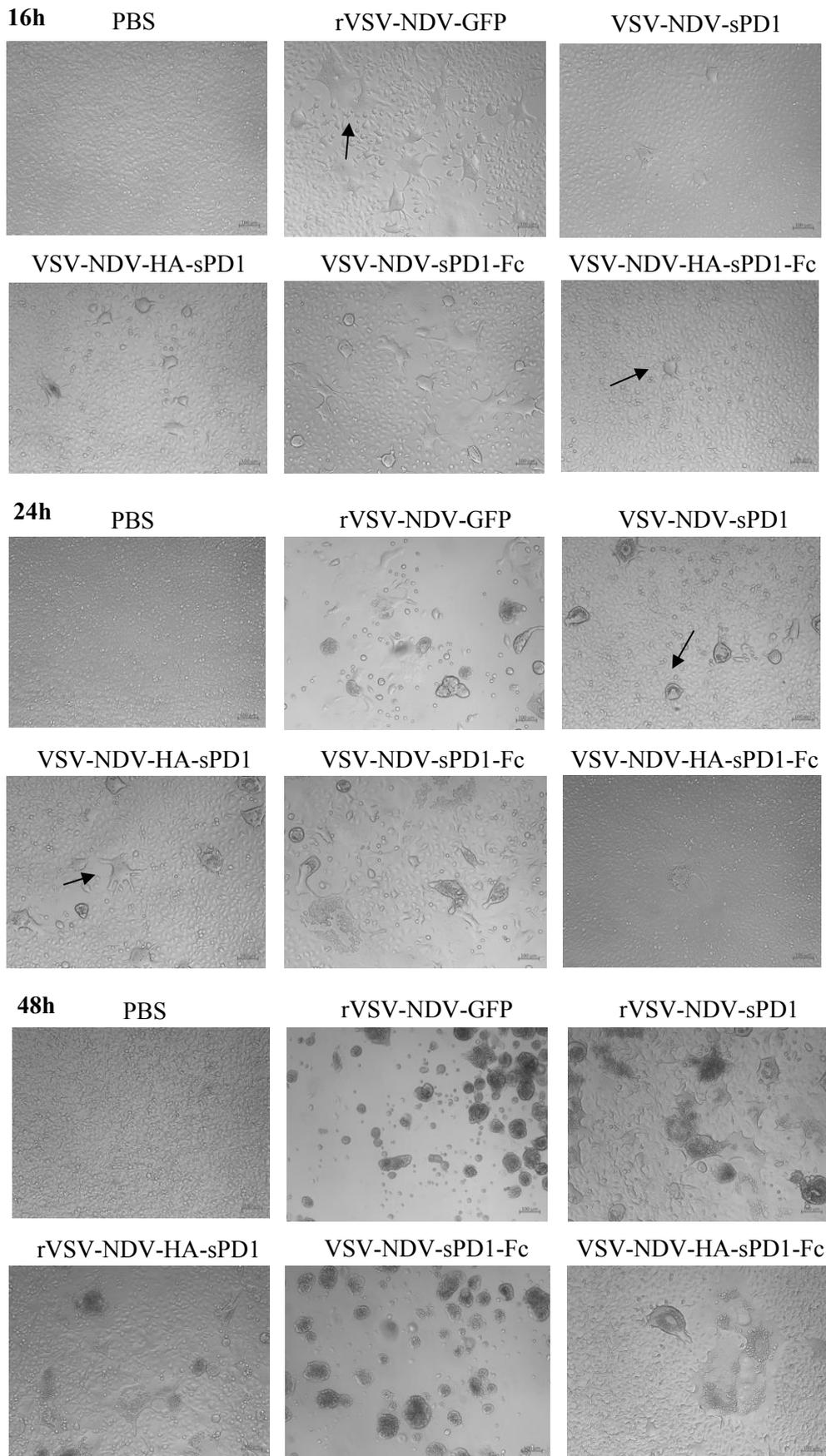
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter WT B16.OVA mit rVSV-NDV-GFP

WT B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP infiziert (MOI: 0,01). 16, 24, 48 und 72h nach der Infektion, wurden die Zellen mit einer Vergrößerung von x200 beurteilt und mit eines Fluoreszenz-Anregungslichtes das GFP-Signal visualisiert und repräsentative Bilder gemacht. Obere Bildreihe: Hellfeld-Aufnahmen, untere Bildreihe: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus dem jeweils gleichen Sichtfeld. Die Pfeile deuten beispielhaft auf das GFP-Signal

4.1.2 RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen lassen sich infizieren und bilden Synzytien aus

Um herauszufinden, ob RIG-I einen Einfluss auf die Empfindlichkeit einer Infektion mit rVSV-NDV-GFP oder den VSV-NDV-sPD1-Varianten *in vitro* hat, wurden RIG-I-defiziente RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter dem Mikroskop untersucht (siehe Abbildung 11). Anschließend konnten die Mikroskop-Aufnahmen im Hinblick auf die Infektiosität und Ausbildung von Tumorzellfusionierungen mit den vorherigen Ergebnissen der WT B16.OVA-infizierten Zellen verglichen werden.

Die Mikroskop-Aufnahmen aller mit Virus infizierten RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen zeigten bereits nach 16 h erste Ausbildungen von Synzytien. Allerdings ist zu erkennen, dass in dem mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc infizierten Well, im Vergleich zu den restlichen Viren, kaum eine Tumorzellfusionierung auffindbar war. Nach 24 h war die Infektion in allen infizierten Wells weiter vorangeschritten und zeigte, vor allem in den mit rVSV-NVD-GFP und mit VSV-NDV-sPD1-Fc infizierten Wells, eine Synzytien-Ausbreitung über die gesamte Monolage. Nach 48 h waren bereits alle Tumorzellen, die mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc infiziert wurden, tot und schwammen als Zellklumpen im Medium. Im Gegensatz dazu lagen die anderen Viren in der Infektion zurück. Es gelang den übrigen Viren zwar, nach 72 h so gut wie alle Tumorzellen in große Synzytien miteinzuschließen, dennoch schienen sie in der Effizienz der Infektion hinter rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc zu liegen.



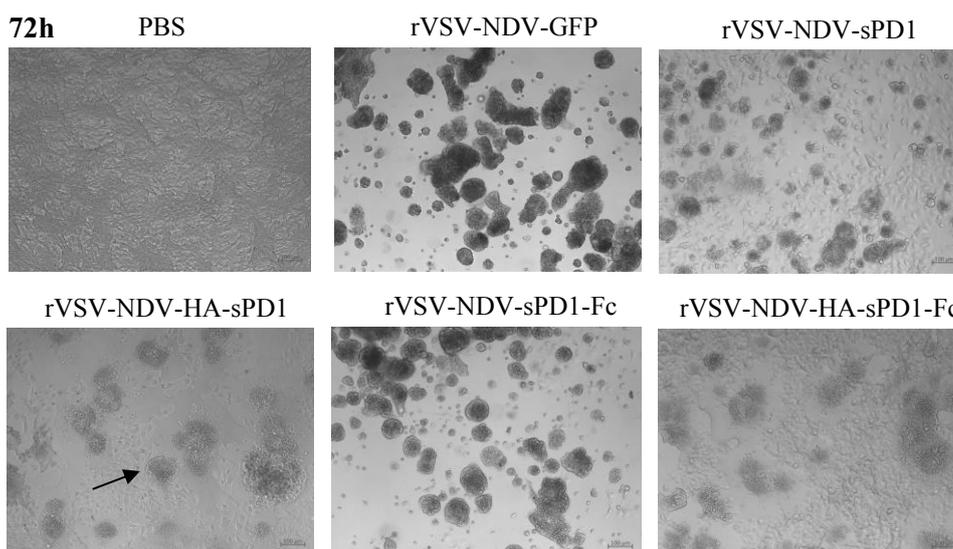


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen infizierter RIG-I^{-/-} B16.OVA

RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI 0,01), das Kontroll-Well mit PBS. 16h, 24h, 48h und 72h nach der Infektion wurden die Zellen mit einer Vergrößerung von x200 visualisiert und repräsentative Bilder gemacht. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf gebildete Synzytien.

Auch in diesem Versuch wurden zusätzlich fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der GFP-Expression infizierter Zellen angefertigt. Schon nach 16 h war eine Fluoreszenz, ausgehend von den Synzytien zu erkennen (siehe Abbildung 12). Auch nach 24 h war das GFP-Signal deutlich in den Tumorzellfusionierungen zu detektieren. Zu den späteren Zeitpunkten war keine Fluoreszenz mehr vorhanden, was daran lag, dass 48 h nach der Infektion mit rVSV-NDV-GFP schon alle Zellen zerstört waren und somit das GFP nicht mehr exprimiert werden konnte.

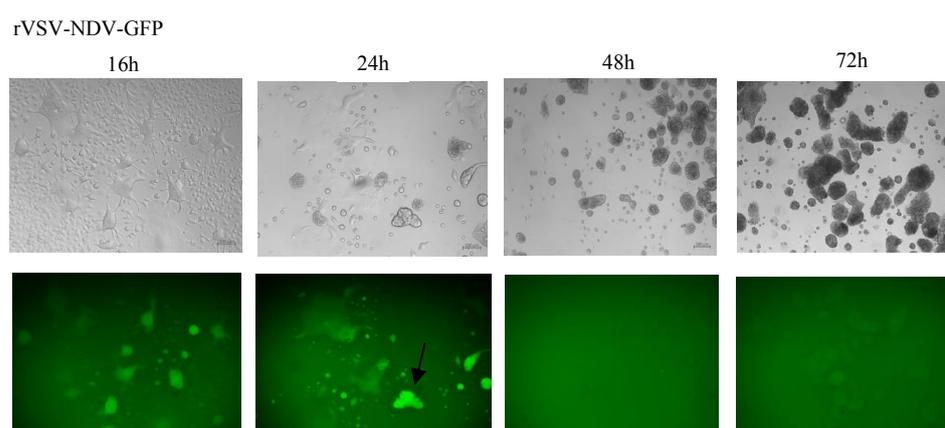


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen infizierter RIG-I^{-/-} B16.OVA mit rVSV-NDV-GFP

RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP infiziert (MOI: 0,01). 16, 24, 48 und 72h nach der Infektion wurden die Zellen mit einer Vergrößerung von x200 beurteilt und mit eines Fluoreszenz-Anregungslichtes das GFP-Signal visualisiert und repräsentative Bilder gemacht. Obere Bildreihe: Hellfeld-Aufnahmen, untere Bildreihe: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus dem jeweils gleichen Sichtfeld. Die Pfeile deuten beispielhaft auf das GFP-Signal.

Vergleicht man nun die vorherigen Aufnahmen der infizierten WT B16.OVA Zellen mit den infizierten RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen kann man sagen, dass beide Zelllinien vor allem auf die Infektion mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc sehr empfindlich reagierten und alle Tumorzellen schon nach 48 h vollständig getötet wurden. Im Hinblick auf den Einfluss des RIG-I-Rezeptors auf die Infektiosität der Zellen, lässt sich anhand der Mikroskop-Aufnahmen keinen großen Unterschied feststellen.

4.1.3 Nachweis der Zytotoxizität und Replikation in WT B16.OVA

Um nachzuweisen, inwieweit die verwendeten Viren einen zytotoxischen Einfluss auf die WT B16.OVA-Zellen haben, wurden im Verlauf der Infektion Proben genommen, um die LDH-Freisetzung als Marker der Zytotoxizität zu bestimmen. Außerdem konnten anhand des Ergebnisses die zytotoxische Effektivität und Schnelligkeit der verwendeten Viren untereinander verglichen werden (siehe Abbildung 13).

Es lässt sich feststellen, dass die beiden Viren rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc einen schnelleren zytotoxischen Effekt aufweisen, als die übrigen VSV-NDV-sPD1-Varianten. Im Einklang mit den vorherigen Analysen der Mikroskop-Bilder verdoppelte sich bei rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc von Zeitpunkt zu Zeitpunkt der zytotoxische Effekt auf die Tumorzellen und erreichte nach 48 h mit über 80 % das Maximum. Im Vergleich dazu brauchten die anderen Viren zeitlich länger, um die Tumorzellen zu zerstören, erreichten aber dennoch nach 72 h ein ähnliches Niveau.

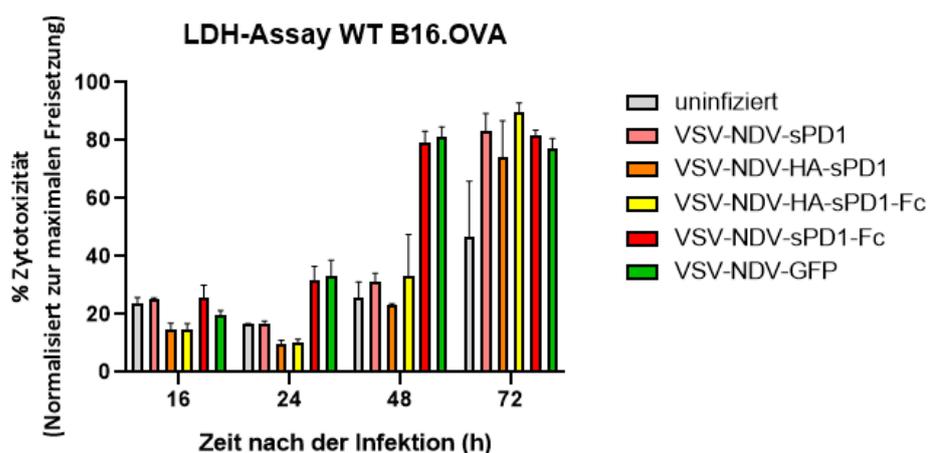


Abbildung 13: Übersicht der Zytotoxizität infizierter WT B16.OVA

WT B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI: 0,01) und die LDH-Freisetzung an den Zeitpunkten 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion zur Bestimmung der Zytotoxizität gemessen. Zur Kontrolle blieb ein Well uniniziert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Viren haben aber nicht nur einen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen, sondern können sich in den infizierten Zellen auch replizieren und vermehren. Zur Analyse der Replikationsfähigkeit wurden WT B16.OVA-Zellen mit rVSV-NDV-GFP und den VSV-NDV-NDV-sPD1-Varianten mit der gleichen MOI infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Virustiter mit Hilfe des TCID₅₀-Assays bestimmt. Anschließend wurde anhand der Werte eine Wachstumskurve erstellt (siehe Abbildung 14).

In Übereinstimmung mit den Zytotoxizitätsdaten zeigten rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc einen ähnlichen Replikationsverlauf. Dabei erreichte allerdings rVSV-NDV-GFP insgesamt einen höheren Virustiter als VSV-NDV-sPD1-Fc, mit einem Replikationspeak nach bereits 24 h. Die Titer nahmen dann aufgrund der Reduktion der Wirtszellen durch die zytotoxische Wirkung ab, da weniger Nachkommen produziert werden konnten.

Die Virusvermehrung von VSV-NDV-HA-sPD1 war im Vergleich zu den anderen Viren deutlich verzögert und erreichte erst nach 72 h einen Virustiter von 10⁴ TCID₅₀/ml.

Auch bei der Replikationsfähigkeit lässt sich feststellen, dass sich die beiden Viren rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc sehr ähnlich, und die anderen Viren zeitlich verzögert sind.

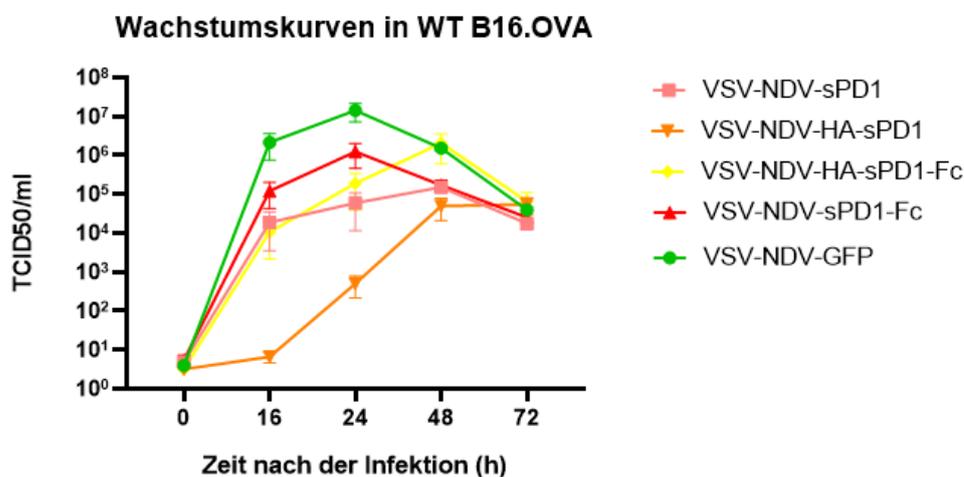


Abbildung 14: Wachstumskurven von rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten in WT B16.OVA

WT B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI: 0,01). Der Virustiter wurde 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion mittels des TCID₅₀-Assay bestimmt. Anhand dieser Daten wurde die Wachstumskurve erstellt. Die Experimente wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

4.1.4 Nachweis der Zytotoxizität und Replikation in RIG-I^{-/-} B16.OVA

Um nachzuweisen, inwieweit die verwendeten Viren einen zytotoxischen Einfluss auf die RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen haben, wurden im Verlauf der Infektion Proben genommen, um die LDH-Freisetzung als Marker der Zytotoxizität zu bestimmen. Ziel war es, diese Ergebnisse mit den vorherigen Daten der Zytotoxizitätsbestimmung infizierter WT B16.OVA-Zellen zu vergleichen und zu untersuchen, ob RIG-I die Infektionsfähigkeit der Viren *in vitro* beeinflusst.

Der zeitliche Verlauf der verursachten Zytotoxizität durch die Virusinfektion korrespondierte mit den vorherigen Mikroskop-Aufnahmen (siehe Abbildung 15). Die Viren rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Fc zeigten schon nach 48 h einen zytotoxischen Effekt von 80 % auf die infizierten Zellen. Die anderen rekombinanten Viren hingegen waren in ihrer Eigenschaft, die Tumorzellen zu schädigen und abzutöten, verzögert.

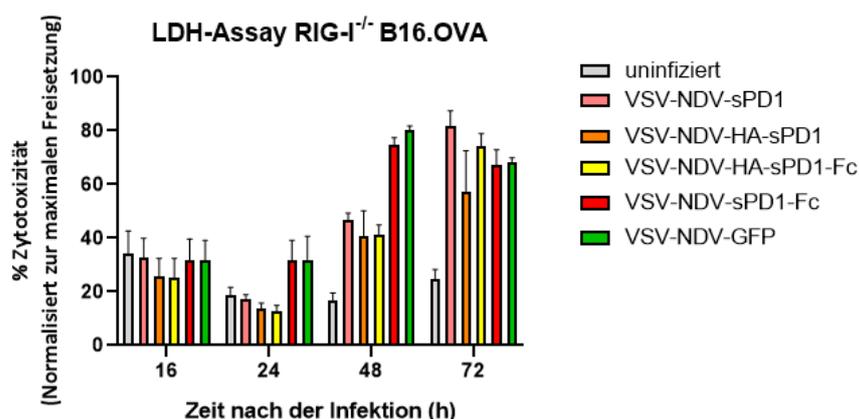


Abbildung 15: Übersicht der Zytotoxizität infizierter RIG-I^{-/-} B16.OVA

RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI: 0,01) und die LDH-Freisetzung an den Zeitpunkten 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion zur Bestimmung der Zytotoxizität gemessen. Zur Kontrolle blieb ein Well uniniziert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Viren haben aber nicht nur einen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen, sondern können sich in den infizierten Zellen auch replizieren und vermehren. Zur Analyse der Replikationsfähigkeit wurden RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen mit rVSV-NDV-GFP und den VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Virustiter mit Hilfe des TCID₅₀-Assays bestimmt. Anschließend wurde anhand der Werte eine Wachstumskurve erstellt.

Anhand der Wachstumskurve lässt sich feststellen, dass sich VSV-NDV-sPD1-Fc in den ersten 16 h nach der Infektion am schnellsten replizierte und seinen höchsten Titer mit

10^5 TCID₅₀/ml erreichte (siehe Abbildung 16). rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc zeigten einen ähnlichen Replikationsverlauf. Die übrigen beiden Viren waren in ihrer Replikationsfähigkeit etwas verzögert und brauchten länger, um sich zu vermehren.

Im Vergleich zu den Wachstumskurven der Viren in den WT B16.OVA-Zellen zeigte sich, dass in den RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen unerwarteterweise nicht solch ein hoher Virustiter erreicht werden konnte, als in den WT B16.OVA-Zellen. Besonders rVSV-NDV-GFP, der in den WT B16.OVA-Zellen schon nach 24 h einen Titer von 10^7 TCID₅₀/ml erreichte, schaffte seinen Replikationshöhepunkt von knapp über 10^5 TCID₅₀/ml in den RIG-I-defizienten Zellen erst nach 48 Stunden. Die eigentliche Vermutung war, dass sich das Virus in den RIG-I-defizienten Zellen besser und effektiver replizieren kann, als in den Wildtyp-Zellen.

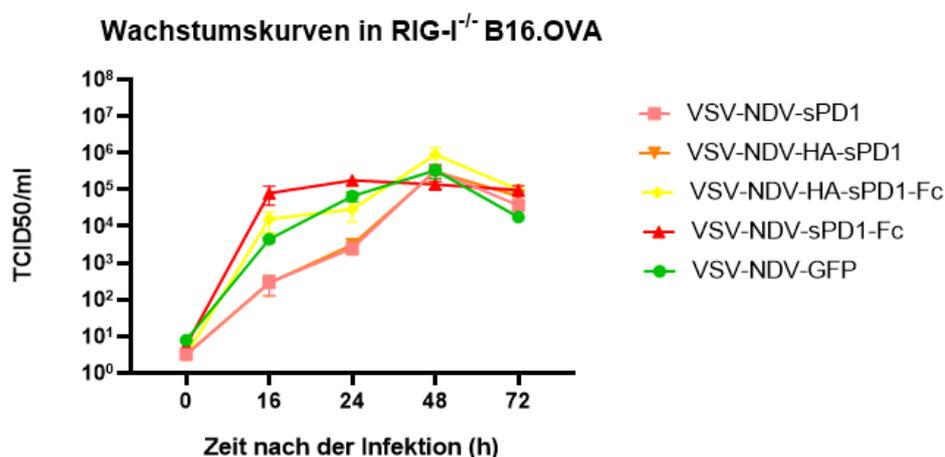


Abbildung 16: Wachstumskurven von rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten in RIG-I^{-/-} B16.OVA

RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen wurden mit rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI: 0,01). Der Virustiter wurde 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion mittels des TCID₅₀-Assay bestimmt. Anhand dieser Daten wurde die Wachstumskurve erstellt. Die Experimente wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt und die Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4.1.5 Infizierte WT B16.OVA-Zellen exprimieren und sezernieren sPD1

Zum Nachweis, dass das sPD1-Molekül von den WT B16.OVA-Zellen, die mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert wurden, exprimiert und sezerniert wird, wurde die Western-Blot-Methode verwendet. Dazu wurden WT B16.OVA-Zellen zunächst mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen. Der Zellaufschluss sollte dazu dienen, die Expression des sPD1 in den Zellen zu detektieren. Um festzustellen, ob das exprimierte sPD1 von der Zelle auch sezerniert wird, wurde der Überstand auf sPD1 getestet.

Sowohl im Überstand infizierter Zellen mit VSV-NDV-sPD1, als auch im Überstand

infizierter Zellen mit VSV-NDV-sPD1-Fc, ließ sich das sPD1-Protein deutlich nachweisen (siehe Abbildung 17), was für eine Expression und Sekretion des Proteins spricht. In den anderen Überständen, der mit VSV-NDV-HA-sPD1 und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc infizierten Zellen ließ sich das Protein ebenfalls nachweisen, allerdings mit einer deutlich schwächeren Bande. Dies liegt vermutlich an der hohen Affinität des HAsPD1-Moleküls an die Zellmembran, das dadurch nur in geringer Menge im Überstand zu detektieren ist. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass sPD1 von allen infizierten Zellen exprimiert wird und 24-48 h später als sezerniertes Protein im Überstand aufzufinden ist.

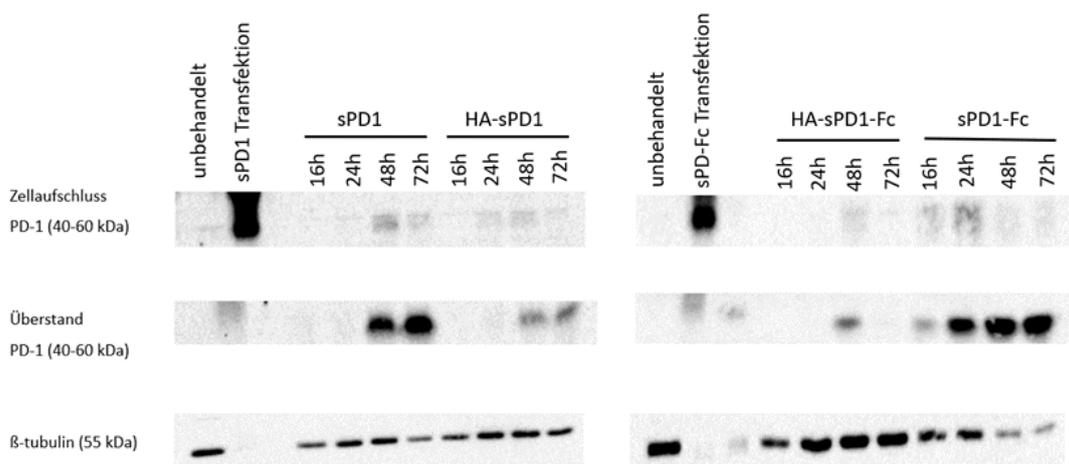


Abbildung 17: sPD1-Expression und -Sekretion infizierter WT B16.OVA

WT B16.OVA-Zellen wurden mit VSV-NDV-sPD1-Varianten infiziert (MOI: 0,01). Zu den Zeitpunkten 16, 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurden Proben vom Zellaufschluss und des Überstandes gesammelt und das Gel mit jeweils 10 µg der Proteinproben geladen. Die Banden wurden anschließend mit einem Chemilumineszenz-Detektionskit nachgewiesen

4.2 Untersuchung der onkolytischen Viren und der Immuncheckpoint-Inhibition *in vivo*

Da die Komplexität der Mikroumgebung des Tumors und der Einfluss des Immunsystems des Wirtes eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Wirkung der Behandlung mit onkolytischen Viren spielt, können sich die *in vivo*-Ergebnisse oft erheblich von den Resultaten der *in vitro*-Untersuchungen unterscheiden. Deshalb ist es unabdingbar, die Effektivität von VSV-NDV und den sPD1-exprimierenden Varianten in einem *in vivo*-Melanom-Modell zu analysieren. Des Weiteren lässt sich die Wirkung des Immuncheckpoint-Inhibitors Anti-CTLA-4 in Kombination mit den onkolytischen Viren nur in einem funktionierenden Immunsystem untersuchen.

4.2.1 Überlebensstudie A: WT B16.OVA vs. RIG-I^{-/-} B16.OVA

In dieser Überlebensstudie wurde untersucht, welche Rolle die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors innerhalb der Tumorzellen im Anschluss an eine Behandlung mit dem onkolytischen Virus rVSV-NDV-GFP in der Ausbildung einer antitumoralen Immunreaktion spielt. Dazu wurden einer Gruppe von Mäusen WT B16.OVA-Zellen und der anderen Gruppe RIG-I-defiziente Tumorzellen bilateral in die Flankengegend implantiert. Nach einer Woche erfolgte die Injektion des onkolytischen Virus dreimal im Abstand von drei Tagen in den rechten Tumor. Als Kontrollgruppen dienten entweder PBS als Negativkontrolle oder 3pRNA, ein Ligand des RIG-I-Rezeptors als Positivkontrolle. Um festzustellen, ob eine antitumorale Immunantwort ausgelöst wird, wurde das Wachstum des rechten, injizierten Tumors mit dem des linken, nicht injizierten Tumors verglichen.

Die intratumorale Injektion von rVSV-NDV-GFP führte zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung der WT B16.OVA-Tumorzellen im Vergleich zur intratumoralen Behandlung mit PBS (siehe Abbildung 18). Zusätzlich hatte die Behandlung mit dem onkolytischen Virus auch einen positiven Effekt auf das Wachstum des kontralateralen, nicht injizierten Tumors. Die Injektion der Positivkontrolle zeigte eine ähnliche Tumorgößenentwicklung, wie die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP.

In den RIG-I-defizienten Tumorzellen dagegen hatte die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP keinen Effekt auf den kontralateralen, nicht injizierten Tumor, der in gleicher Geschwindigkeit wie die Tumore der Negativkontrollgruppe wuchs (siehe Abbildung 18 B). Dennoch führte die direkte intratumorale Injektion von rVSV-NDV-GFP auch in den RIG-

I B16.OVA-Zellen zu einer Wachstumsverzögerung. Die Positivkontrolle zeigte den gleichen Effekt wie rVSV-NDV-GFP.

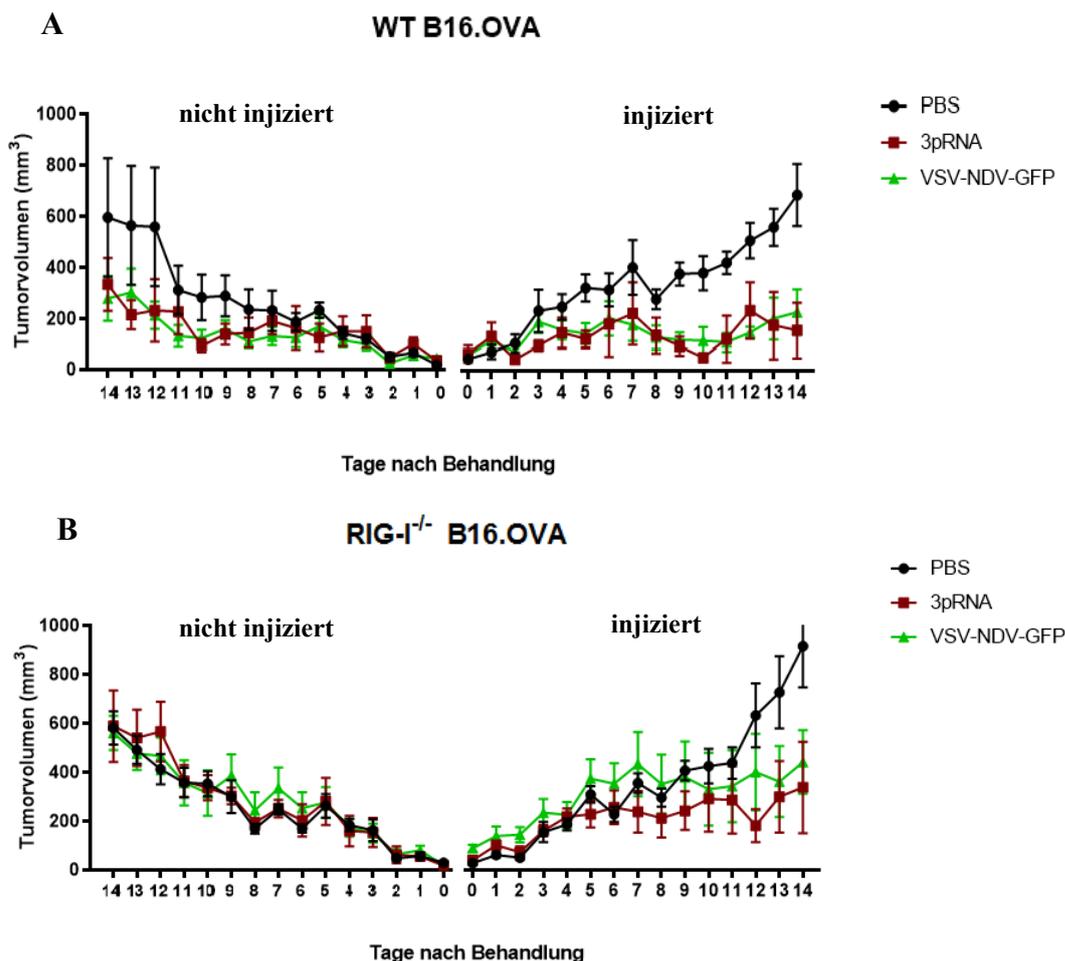


Abbildung 18: Tumorwachstum ab der ersten Behandlung

Eine Woche nach der Tumorumplantation erfolgte die dreimalige intratumorale Behandlung (PBS/3pRNA/VSV-NDV-GFP) im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor wurde nicht behandelt (nicht injiziert). Alle Tumore wurden ab der ersten Behandlung täglich vermessen und eine Wachstumskurve erstellt. **A** Implantation von WT B16.OVA-Zellen. Anzahl (n) der Mäuse/Gruppe: n=6/PBS; n=4/3pRNA; n=6/VSV-NDV-GFP **B** Implantation RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen. Anzahl (n) der Mäuse/Gruppe: n=7/PBS; n=4/3pRNA; n=7/VSV-NDV-GFP

Zum Nachweis, ob die Behandlung mit dem onkolytischen Virus und die Aktivierung von RIG-I eine antitumorale Immunantwort induziert, wurde den Mäusen zwei Tage nach der letzten Behandlung Blut abgenommen und mittels der Durchflusszytometrie auf spezifische zytotoxische T-Zellen untersucht (siehe Abbildung 19). Da beide Tumorzelllinien das Ovalbumin OVA exprimieren, war es möglich mit Hilfe eines speziellen OVA-Tetramers, zytotoxische T-Zellen nachzuweisen, die spezifisch gegen OVA und somit gegen die Tumorzellen gerichtet sind.

Die Blut-Analyse ergab, dass Mäuse, die WT B16.OVA-Tumore hatten und mit 3pRNA behandelt wurden, tendenziell mehr zytotoxische T-Zellen ausbildeten, die gegen den Tumor gerichtet waren, als Mäuse, die RIG-I-defiziente Tumore hatten. In den anderen Behandlungsgruppen dagegen ließ sich kein Unterschied in der Bildung von spezifischen T-Zellen feststellen. Allerdings bedarf das Protokoll zur Blut-Analyse der T-Zell-Antwort einiger Optimierungen und es ist gut möglich, dass diese Daten die tatsächliche Situation nicht vollständig widerspiegeln.

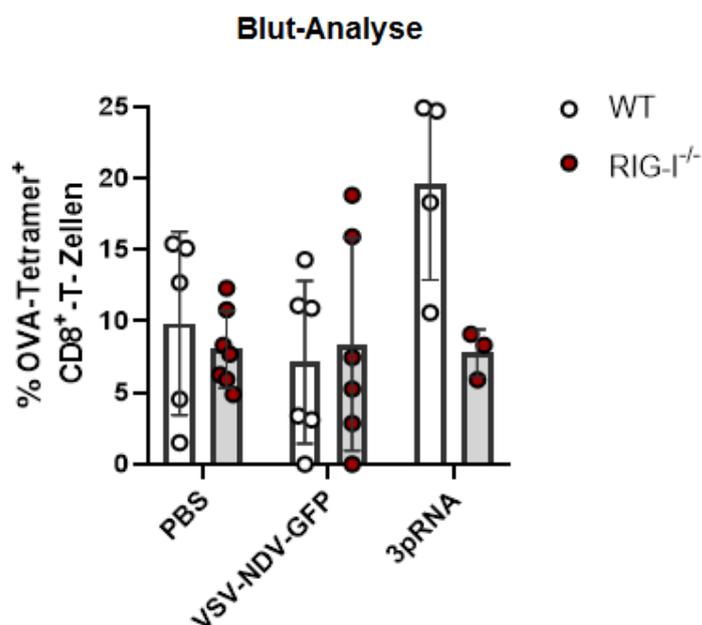


Abbildung 19: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort

Zwei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Blutentnahme der C57Bl6/J Mäuse. Anschließend wurden PBMCs aus dem peripheren Blut isoliert, mit einem CD8-Antikörper und einem OVA-spezifischen Tetramer gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Ergebnisse von WT B16.OVA-tumortragenden Mäusen (weiß) wurden mit von RIG-I^{-/-} B16.OVA-tumortragenden Mäusen (rot) verglichen. Dargestellt sind Balkendiagramme mit individueller Verteilung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem T-Test. (n=5/PBS in WT; n=7/PBS in RIG-I^{-/-}; n=6/VSV-NDV-GFP in WT und RIG-I^{-/-}; n=4/3pRNA in WT; n=3/3pRNA in RIG-I^{-/-})

Zur Feststellung, inwieweit die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP einen Überlebensvorteil gegenüber der Behandlung mit PBS hat, wurden am Ende der Studie Überlebenskurven erstellt und ausgewertet (siehe Abbildung 20). Außerdem konnte im Vergleich der Überlebenskurven beider verwendeter Tumorzelllinien untersucht werden, ob das Fehlen des RIG-I-Rezeptors die Überlebenszeit der Mäuse im Anschluss an die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP beeinflusst.

Betrachtet man die Überlebenskurve der mit rVSV-NDV-GFP behandelten Mäuse, die einen WT B16.OVA-Tumor trugen, zeigt sich ein signifikant längeres ($p = 0,0061$) Überleben im

Vergleich zu den Mäusen, die nur mit PBS behandelt wurden. Auch die Tiere der positiven Kontrollgruppe, die die 3pRNA als Ligand des RIG-I-Rezeptors erhielten, lebten länger ($p = 0,0142$). Analysiert man die Überlebenskurven der Mäuse, die einen RIG-I-defizienten Tumor hatten und mit rVSV-NDV-GFP behandelt wurden, lässt sich keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Negativkontrollgruppe feststellen. Auch die Gruppe von Mäusen, die eine intratumorale Injektion mit 3pRNA erhielten, starben in der gleichen Zeitspanne als die Mäuse, die PBS bekamen. Bei der Gegenüberstellung der Überlebenskurven der WT B16.OVA-tragenden Mäuse mit den Überlebenskurven der RIG-I^{-/-} B16.OVA-tragenden Mäuse ließ sich feststellen, dass das Fehlen des RIG-I-Rezeptors zu einem verminderten Ansprechen auf eine rVSV-NDV oder 3pRNA-Behandlung führte.

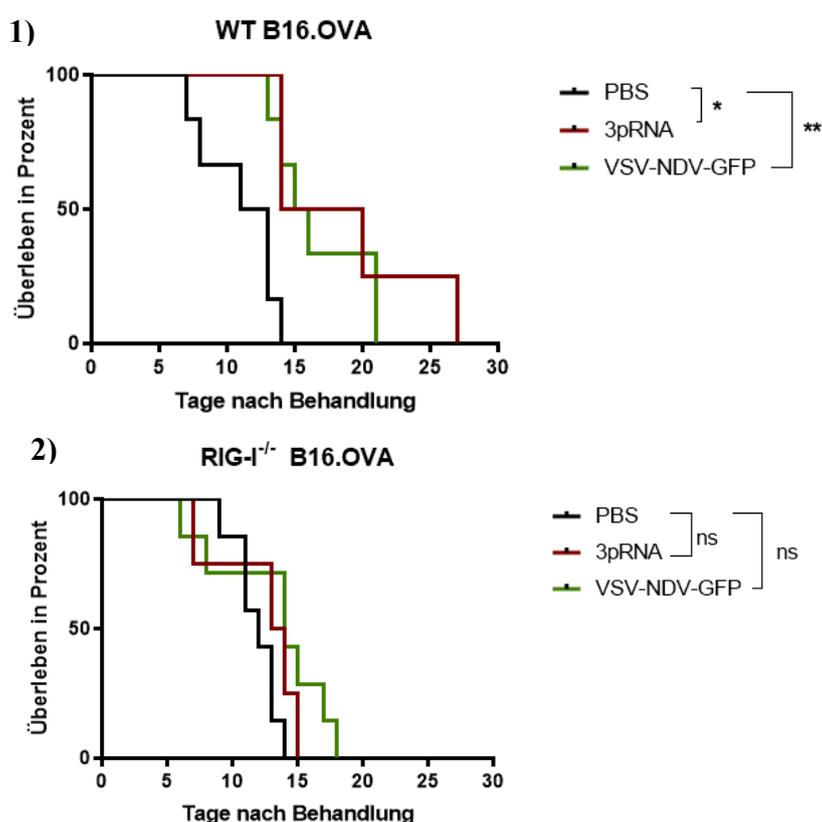


Abbildung 20: Überlebenskurven der Überlebensstudie A

Eine Woche nach der Tumorumplantation erfolgte die dreimalige intratumorale Behandlung (PBS/3pRNA/VSV-NDV-GFP) im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor blieb unbehandelt (nicht injiziert). Anhand der Zeitspanne von der ersten Behandlung bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Mäuse, wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt. **1)** Überlebenskurven von WT B16.OVA-tragenden Mäusen. Anzahl (n) der Mäuse/Gruppe: n=6/PBS; n=4/3pRNA; n=6/VSV-NDV-GFP. (*:p-Wert für 3pRNA vs. PBS <0,05; **:p-Wert für VSV-NDV-GFP vs. PBS <0,01) **2)** Überlebenskurven von RIG-I^{-/-}B16.OVA-tragenden Mäusen. Anzahl (n) der Mäuse/Gruppe: n=7/PBS; n=4/3pRNA; n=7/VSV-NDV-GFP.

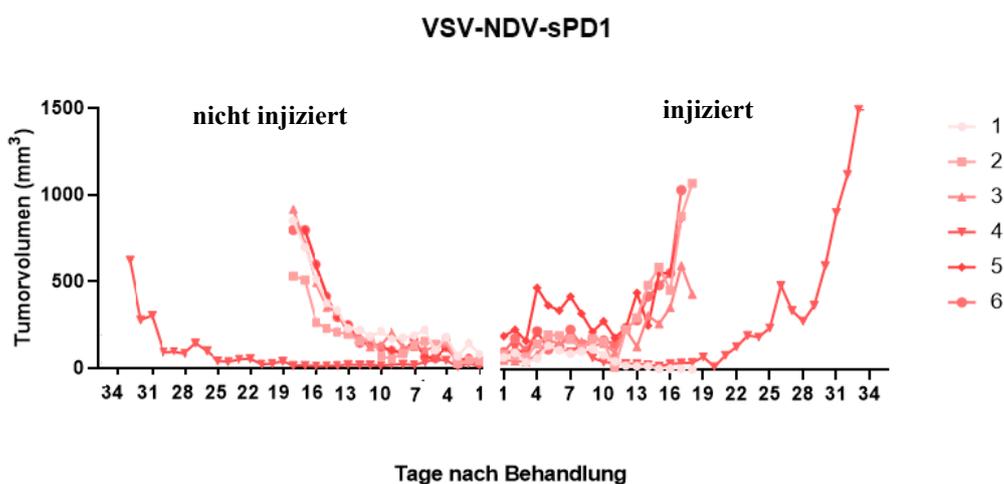
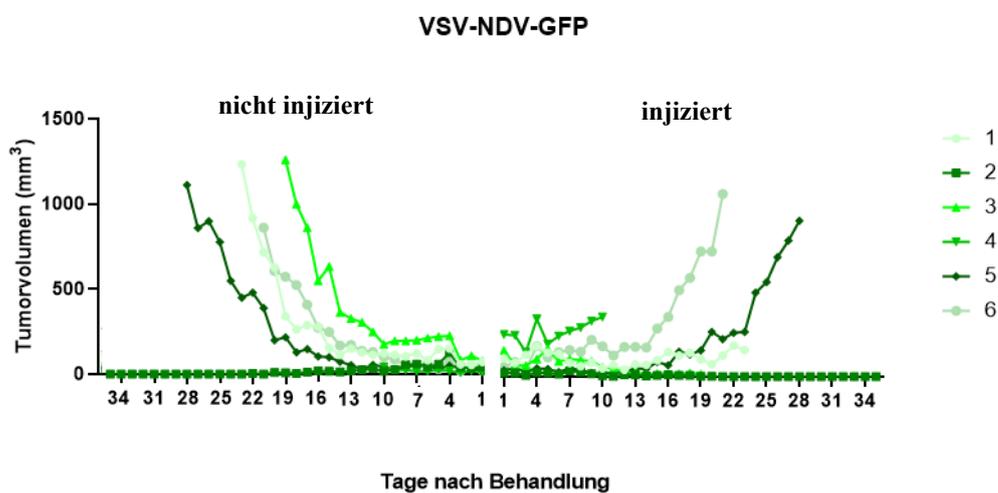
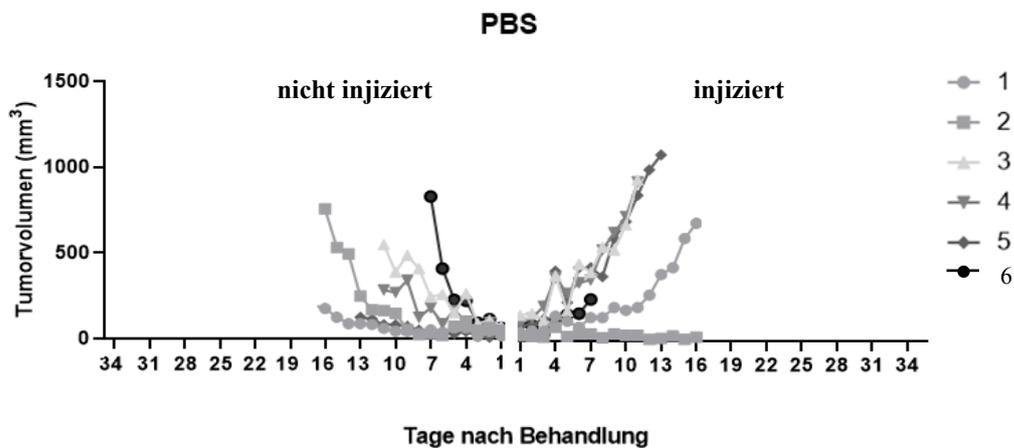
4.2.2 Überlebensstudie B: Vergleich der VSV-NDV-sPD1-Varianten

Um den onkolytischen Effekt der neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten *in vivo* zu charakterisieren und diesen mit rVSV-NDV-GFP zu vergleichen, wurde eine Überlebensstudie durchgeführt. Dazu wurden WT B16.OVA-Zellen bilateral in die Flankengegend der Mäuse implantiert. Der rechte Tumor wurde dreimal im Abstand von drei Tagen mit Virus oder PBS als Negativkontrolle injiziert, der Linke wurde nicht injiziert. Alle Tumore wurden ab der ersten intratumoralen Injektion während der gesamten Studie vermessen und Tumorwachstumskurven erstellt.

Um herauszufinden, inwieweit die Sekretion des sPD1-Moleküls, der mit VSV-NDV-sPD1-Varianten infizierter Tumorzellen, das Tumorwachstum direkt und indirekt beeinflusst und welche Rolle die einzelnen Modifikationen des sPD1 dabei spielen, wurden die erstellten Tumorwachstumskurven miteinander verglichen.

Betrachtet man zunächst das Wachstum aller Tumore, die mit den onkolytischen Viren injiziert wurden, erkennt man, dass das Tumolvolumen bis zur letzten Behandlung an Tag 10 auf dem gleichen Niveau gehalten oder gar verkleinert werden konnte, im Gegensatz zum schnellen Tumorwachstum der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 21). Außerdem hatte die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP, VSV-NDV-sPD1 und VSV-NDV-sPD1-Fc einen Einfluss auf den kontralateralen, nicht injizierten Tumor und verzögerte auch dort das Wachstum. Auffällig ist, dass dieser Effekt der Wachstumsverzögerung des nicht injizierten Tumors bei den VSV-NDV-HA-sPD1-Varianten nicht so eindeutig zu sehen war. Im Gegensatz dazu war der direkte Einfluss der injizierten Tumore mit VSV-NDV-HA-sPD1 und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc umso größer.

Bei einer Maus kam es nach der Behandlung mit rVSV-NDV-GFP zur vollständigen Lyse beider Tumore und führte zur langfristigen Tumorfreiheit. Das gleiche Bild zeigte sich bei einer Maus, die mit VSV-NDV-sPD1-Fc behandelt wurde.



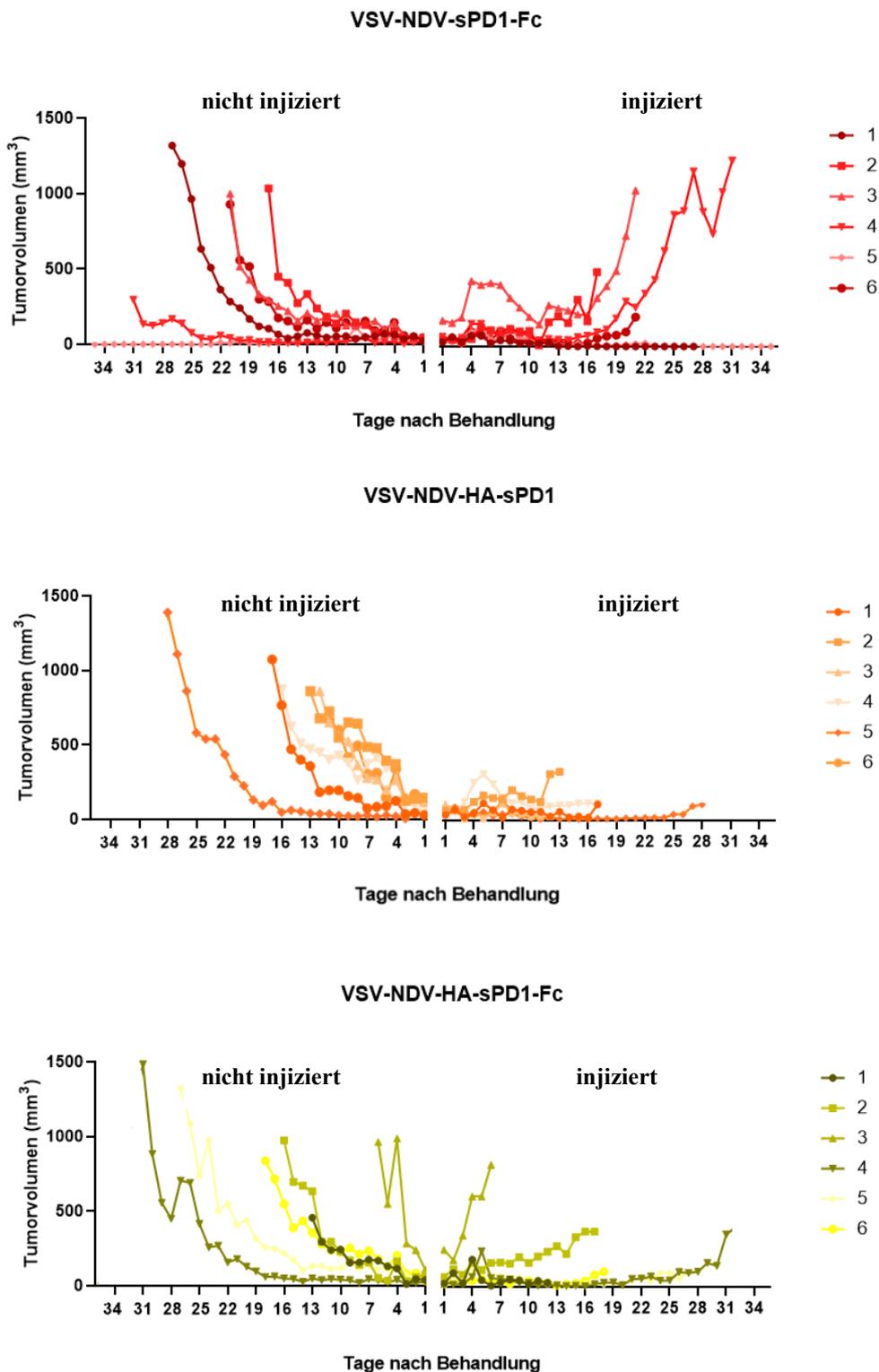


Abbildung 21: Individuelle Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe

Eine Woche nach der Tumorimplantation erfolgte die dreimalige intratumorale Injektion mit den VSV-NDV-GFP-Varianten, rVSV-NDV-GFP oder PBS im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Alle Tumore wurden ab der ersten Behandlung täglich vermessen und eine Wachstumskurve erstellt. (n=6/Behandlungsgruppe)

Um zu bestimmen, ob die Auswirkung bei injizierten Tumoren T-Zell-vermittelt gewesen sein könnte, wurde das Blut auf spezifische zytotoxische T-Zellen untersucht (siehe Abbildung 22). Dazu wurden den Mäusen zwei Tage nach der letzten Behandlung Blut abgenommen und mittels der Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von spezifischen T-Zellen überprüft.

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass es keine Zunahme der OVA-spezifischen CD8⁺-T-Zellen bei den mit Virus behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS-Gruppe gab. Es ist auch hier zu sagen, dass das Protokoll zu Blut-Analyse der antigenspezifischen T-Zellen nicht optimiert war und es wahrscheinlich ist, dass diese Daten nicht der wirklichen Situation entsprechen.

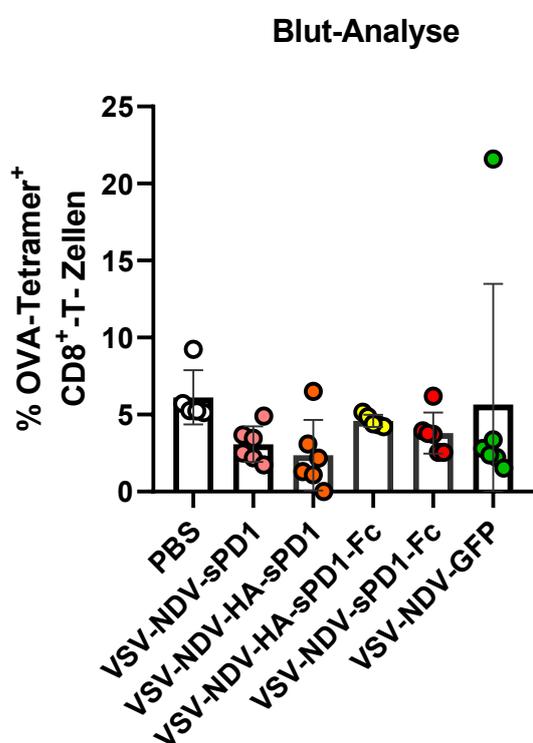


Abbildung 22: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort

Zwei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Blutentnahme der C57Bl6/J Mäuse. Anschließend wurden PBMCs aus dem peripheren Blut isoliert, mit einem CD8-Antikörper und einem OVA-spezifischen Tetramer gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind Balkendiagramme mit individueller Verteilung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem T-Test. (n=6/Behandlungsgruppe)

Am Ende der Überlebensstudie wurden Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt, um abschließend zu schauen, inwieweit die verwendeten Viren das Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit PBS verbessern konnten und inwieweit sich die VSV-NDV-sPD1-Varianten im Hinblick auf die Überlebenszeit voneinander unterschieden.

Insgesamt zeigte VSV-NDV-sPD1-Fc zwar die beste Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe mit PBS ($p = 0,0006$), hat aber das Überleben im Vergleich zu rVSV-NDV-GFP nicht signifikant verlängert. (siehe Abbildung 23). Auch in der Gruppe, die mit rVSV-NDV-GFP behandelt wurde, überlebten 50 % der Tiere bis 20 Tage nach der ersten Injektion und führte ebenfalls bei einer Maus zur langfristigen Tumorfreiheit. Von allen VSV-NDV-sPD1-Varianten zeigte die Behandlung mit VSV-NDV-HA-sPD1 den geringsten Effekt.

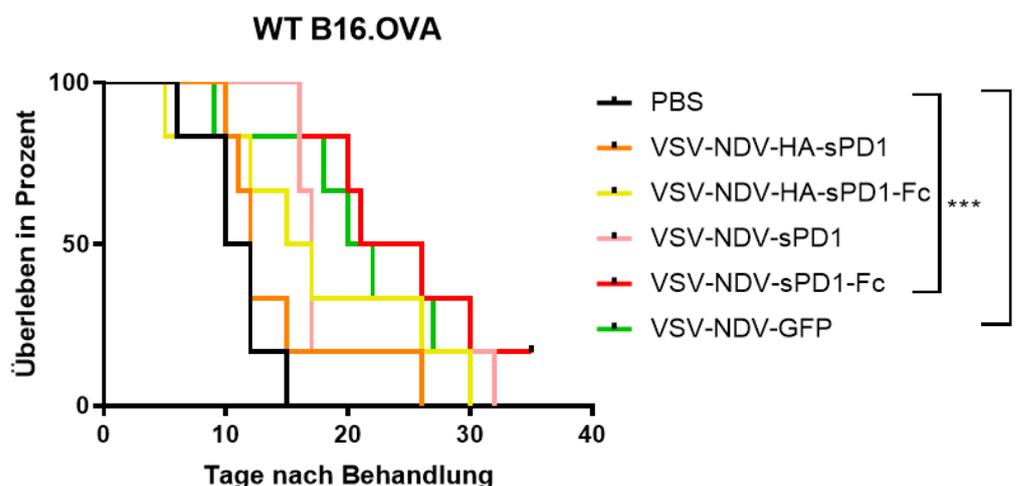


Abbildung 23: Überlebenskurven der Überlebensstudie B

Eine Woche nach der Tumorumplantation von WT B16.OVA erfolgte die dreimalige intratumorale Behandlung (PBS/VSV-NDV-GFP/VSV-NDV-sPD1-Varianten) im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Anhand der Zeitspanne von der ersten Behandlung bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Mäuse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt und statistisch mit Hilfe des Log-Rank-Tests ausgewertet. ($n=6$ /Behandlungsgruppe). (*:p-Wert für rVSV-NDV-GFP vs. PBS $<0,05$; ***:p-Wert für VSV-NDV-sPD1-Fc $<0,001$)

4.2.3 Überlebensstudie C: Kombinationstherapie in WT B16.OVA

In dieser Überlebensstudie ging es um die Fragestellung ob und in welchem Ausmaß eine Kombinationstherapie aus onkolytischem Virus mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 das Tumorwachstum, die Induktion einer spezifischen Antitumor-Immunantwort und das Gesamtüberleben der Mäuse beeinflusst. Dazu wurden WT B16.OVA-Zellen bilateral in die Flankengegend implantiert. Die Tiere erhielten dreimal im Abstand von drei Tagen eine intratumorale Injektion in den rechten Tumor mit Virus, 3pRNA oder PBS und zusätzlich eine intraperitoneale Injektion mit Anti-CTLA-4 oder einem Kontroll-AK. Der linke Tumor wurde nicht injiziert.

Ab der ersten Behandlung wurden die Tumore täglich vermessen und Tumorwachstumskurven erstellt, um die jeweiligen Gruppen, die Anti-CTLA-4 erhielten oder nicht, zu vergleichen (siehe Abbildung 24).

Deutlich zu erkennen ist, dass die injizierten Tumore mit Virus in Kombination mit einer intraperitonealen Anti-CTLA-4-Injektion, ein wesentlich verzögertes Wachstum oder sogar eine vollständige Regression aufwiesen. Auch bei den Mäusen, die intratumoral PBS erhielten und gleichzeitig den Antikörper, zeigte sich ein verzögertes Tumorwachstum und teilweise ein vollständiges Verschwinden des Tumors.

Betrachtet man das Wachstum der nicht injizierten Tumore lässt sich feststellen, dass vor allem bei der Gruppe an Mäusen, die mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc und Anti-CTLA-4 behandelt wurden, das Tumorwachstum deutlich verzögert war. Erst 22 Tagen nach der ersten Behandlung schien die Therapie das Wachstum der nicht injizierten Tumore nicht mehr aufhalten zu können.

Blickt man auf die Gruppen, die intratumoral mit onkolytischem Virus behandelt wurden, aber keinen Anti-CTLA-4-AK, sondern nur einen Kontroll-AK erhielten, sieht man dennoch, dass das Virus einen Effekt auf das Wachstum des nicht injizierten Tumors zu haben scheint. Auch hier war das Wachstum der Tumore verzögert, auch wenn der Effekt nicht gar so stark war, als in den Gruppen, die zusätzlich den CTLA-4-Antikörper bekamen.

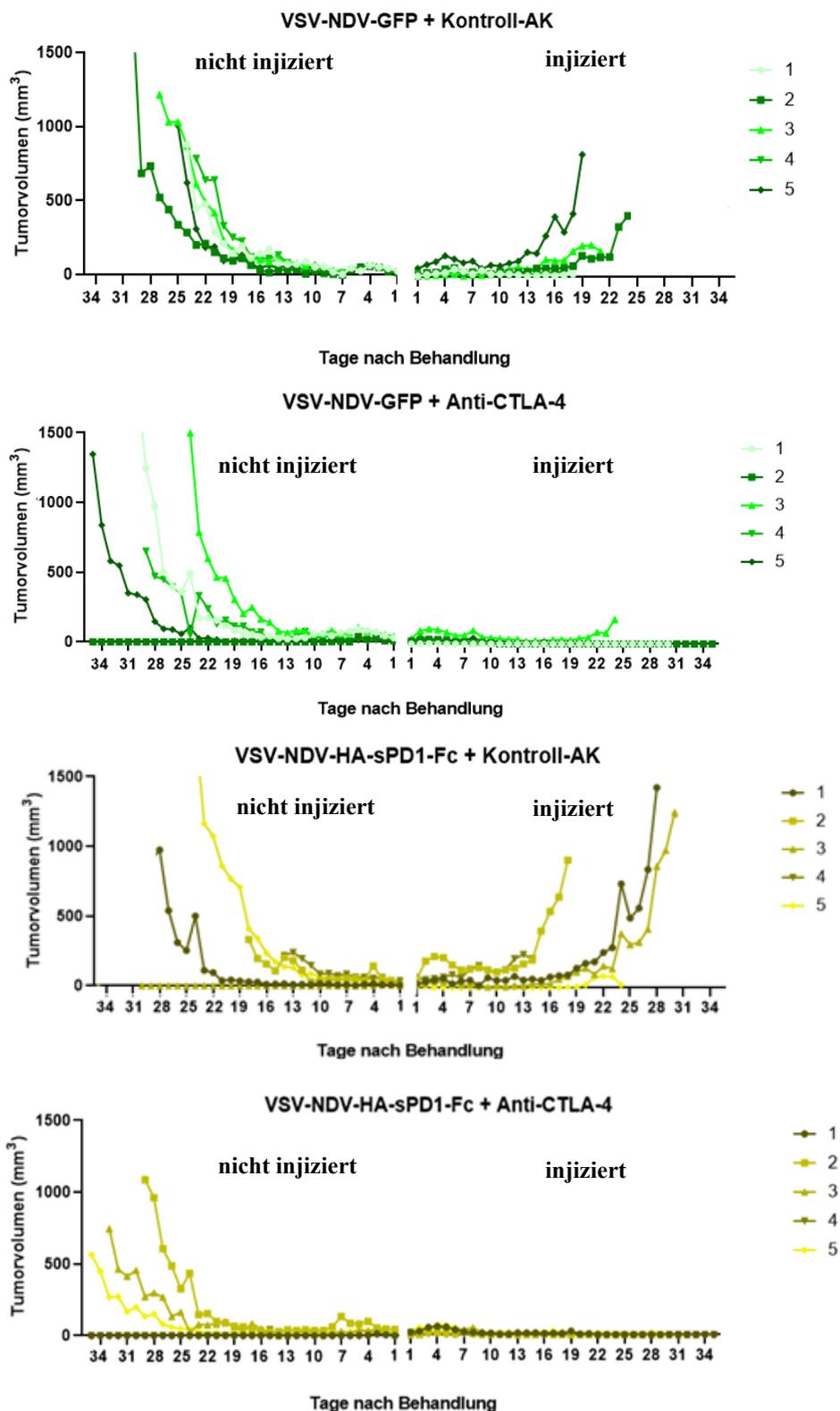


Abbildung 24: Individuelle Tumorzvolumenkurven je Behandlungsgruppe

Eine Woche nach der Tumorumplantation erfolgte die dreimalige intratumorale Behandlung des rechten Tumors mit rVSV-NDV-GFP, VSV-NDV-HA-sPD1-Fc, 3pRNA, PBS (injiziert) und zeitgleich die intraperitoneale Injektion von Anti-CTLA-4 bzw. dem Kontroll-AK. Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Die Tumore wurden täglich vermessen und eine Wachstumskurve erstellt. (n=5/Behandlungsgruppe)

Zum Nachweis, inwieweit die Kombinationstherapie aus Immuncheckpoint-Blockade und onkolytischem Virus, die Antitumor-Immunantwort beeinflusst und es zu einer Ausbildung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen kommt, wurden den Mäusen zwei Tage nach der letzten Behandlung Blut entnommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf eine OVA-Tetramer⁺/CD8⁺-T-Zell-Population untersucht (siehe Abbildung 25).

Die Analyse ergab, dass der prozentuale Anteil an OVA-Tetramer⁺/CD8⁺-T-Zellen in dem Blut der Mäuse, die den Antikörper Anti-CTLA-4 erhielten, deutlich höher war (PBS + Kontroll-AK vs. PBS + Anti-CTLA-4 p= 0,0105; VSV-NDV-GFP + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-GFP + Anti-CTLA-4 p=0,0122; VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Kontroll-AK vs. VSV-NDV-HA-sPD1-Fc + Anti-CTLA-4 p=0,0004; 3pRNA + Kontroll-AK vs. 3pRNA + Anti-CTLA-4 p=0,0137), als in der Vergleichsgruppe, die mit dem Kontroll-AK behandelt wurde.

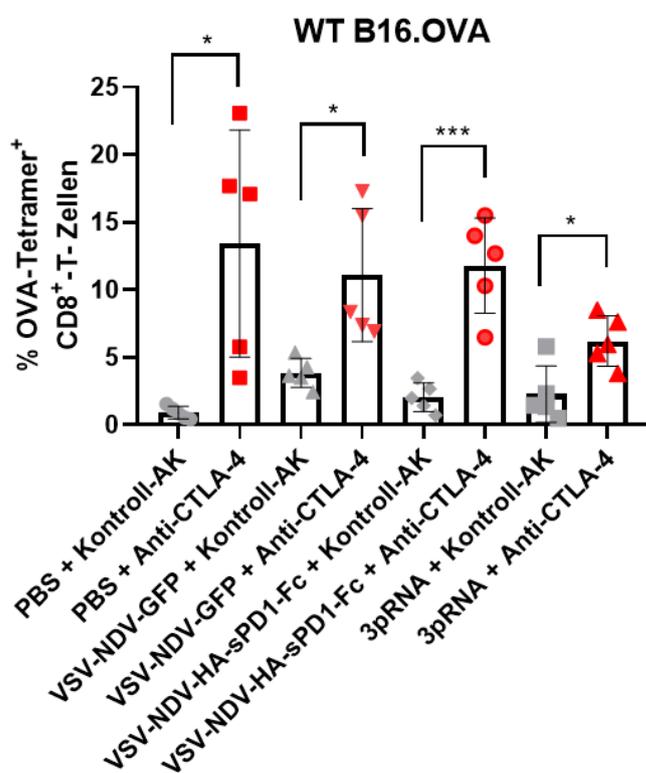


Abbildung 25: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort

Zwei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Blutentnahme der C57Bl6/J Mäuse. Anschließend wurden PBMCs aus dem peripheren Blut isoliert, mit einem CD8-Antikörper und einem OVA-spezifischen Tetramer gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind Balkendiagramme mit individueller Verteilung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem T-Test. N=5/Gruppe. (*:p-Wert <0,05; ***:p-Wert <0,001)

Am Ende der Überlebensstudie wurden Überlebenskurven erstellt, um den Einfluss des antitumoralen Effekts der jeweiligen Therapien auf das Überleben der Mäuse zu charakterisieren und zu beurteilen (siehe Abbildung 26).

Es ist zu erkennen, dass alle Gruppen, die zusätzlich zur intratumoralen Behandlung, den Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 erhielten, die längste Überlebenszeit aufwiesen. VSV-NDV-HA-sPD1-Fc in Kombination mit Anti-CTLA-4 zeigte ebenfalls eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu den anderen Gruppen. Den onkolytischen Viren gelang es dennoch, auch ohne Immuncheckpoint-Inhibitor, das Leben der Mäuse zu verlängern. Wie zu erwarten war, lebten die Mäuse aus der Kontrollgruppe (PBS und Kontroll-AK) nur bis zum 19. Tag nach der Behandlung im Vergleich zu den Mäusen, die mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc und Kontroll-AK behandelt wurden, wo die letzte Maus erst an Tag 36 euthanasiert werden musste.

Erstaunlicherweise schnitt unerwartet die Gruppe von Mäusen, die intratumoral mit PBS und intraperitoneal mit Anti-CTLA-4 behandelt wurde, am besten ab.

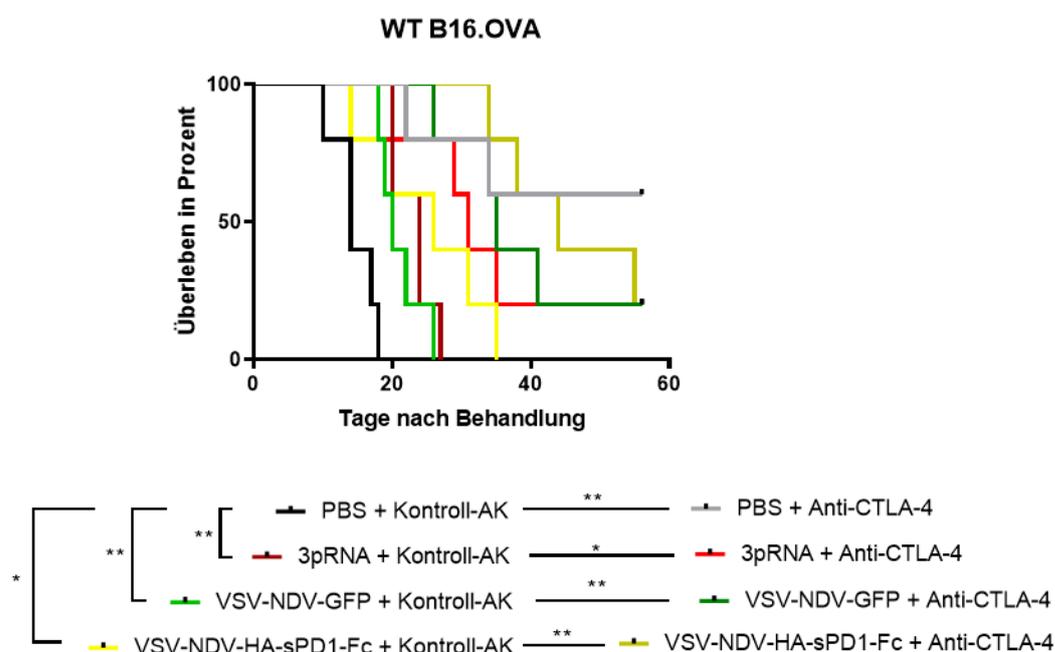


Abbildung 26: Überlebenskurven der Überlebensstudie C

Eine Woche nach der Tumorumplantation erfolgte die dreimalige intratumorale (PBS/3pRNA/VSV-NDV-GFP/VSV-NDV-HA-sPD1-Fc) und intraperitoneale (Kontroll-AK/Anti-CTLA-4) Behandlung im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Anhand der Zeitspanne von der ersten Behandlung bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Mäuse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt und statistisch mit Hilfe des Log-Rank-Tests ausgewertet. (n=5/Behandlungsgruppe). (*:p-Wert <0,05; **:p-Wert <0,01; ***:p-Wert <0,001)

4.2.4 Überlebensstudie D: Kombinationstherapie in RIG-I^{-/-}.OVA

In dieser Überlebensstudie wurde untersucht, welchen Einfluss das Fehlen des RIG-I-Rezeptors, auf eine Behandlung mit den onkolytischen Viren in Kombination mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 hat und inwieweit sich das auf die Ausbildung einer antitumoralen Immunreaktion auswirkt. Um dies zu analysieren, wurde diese Überlebensstudie nach dem gleichen Schema wie die vorherige Studie durchgeführt. Es wurden jedoch Tumorzellen verwendet, die nicht den RIG-I-Rezeptor exprimieren. Dazu wurden RIG-I-defiziente Tumorzellen bilateral in die Flankengegend der Mäuse implantiert. Anschließend erfolgte die Behandlung des rechten Tumors mit rVSV-NDV-GFP, VSV-NDV-HA-sPD1-Fc, 3pRNA oder PBS und gleichzeitig die intraperitoneale Injektion des Immuncheckpoint-Inhibitors Anti-CTLA-4 oder des Kontroll-AK. Der linke Tumor wurde nicht injiziert.

Ab der ersten Behandlung wurden die Tumore täglich vermessen und Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe erstellt und verglichen (siehe Abbildung 27).

Betrachtet man die Tumorwachstumskurven der mit rVSV-NDV-GFP behandelten Mäuse in Kombination mit Kontroll-AK oder Anti-CTLA-4 wuchsen sowohl die injizierten, als auch die nicht injizierten Tumore mit der gleichen Tendenz. Es lässt sich in den RIG-I-defizienten Tumoren in diesem Fall keinen Unterschied zwischen den Gruppen mit oder ohne Anti-CTLA-4-Behandlung feststellen. Auch in der Gruppe, die mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc und Anti-CTLA-4 behandelt wurden, zeigte sich, bis auf eine Ausnahme, in den nicht injizierten Tumoren ein ähnlich schnelles Wachstum, als in der Vergleichsgruppe, die den Kontroll-AK erhielten.

In der Kontrollgruppe, die PBS und Anti-CTLA-4 erhielt, zeigte sich ein recht unterschiedliches Bild des Tumorwachstums. Bei einer Maus wuchs der Tumor beidseitig so schnell, wie in der Gruppe, die den Kontroll-AK erhielten, bei den anderen Mäusen wuchs entweder der rechte oder der linke Tumor schneller und der kontralaterale Tumor langsamer, beziehungsweise gar nicht.

Zusammenfassend lässt sich bei der Betrachtung und Vergleichung der Tumorwachstumskurven feststellen, dass die Behandlung mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 in den RIG-I-defizienten Tumorzellen keinen eindeutigen Effekt auf das Tumorwachstum, besonders auf den unbehandelten Tumor aufwies, im Gegensatz zu den Ergebnissen in den Wildtyp-Tumorzellen.

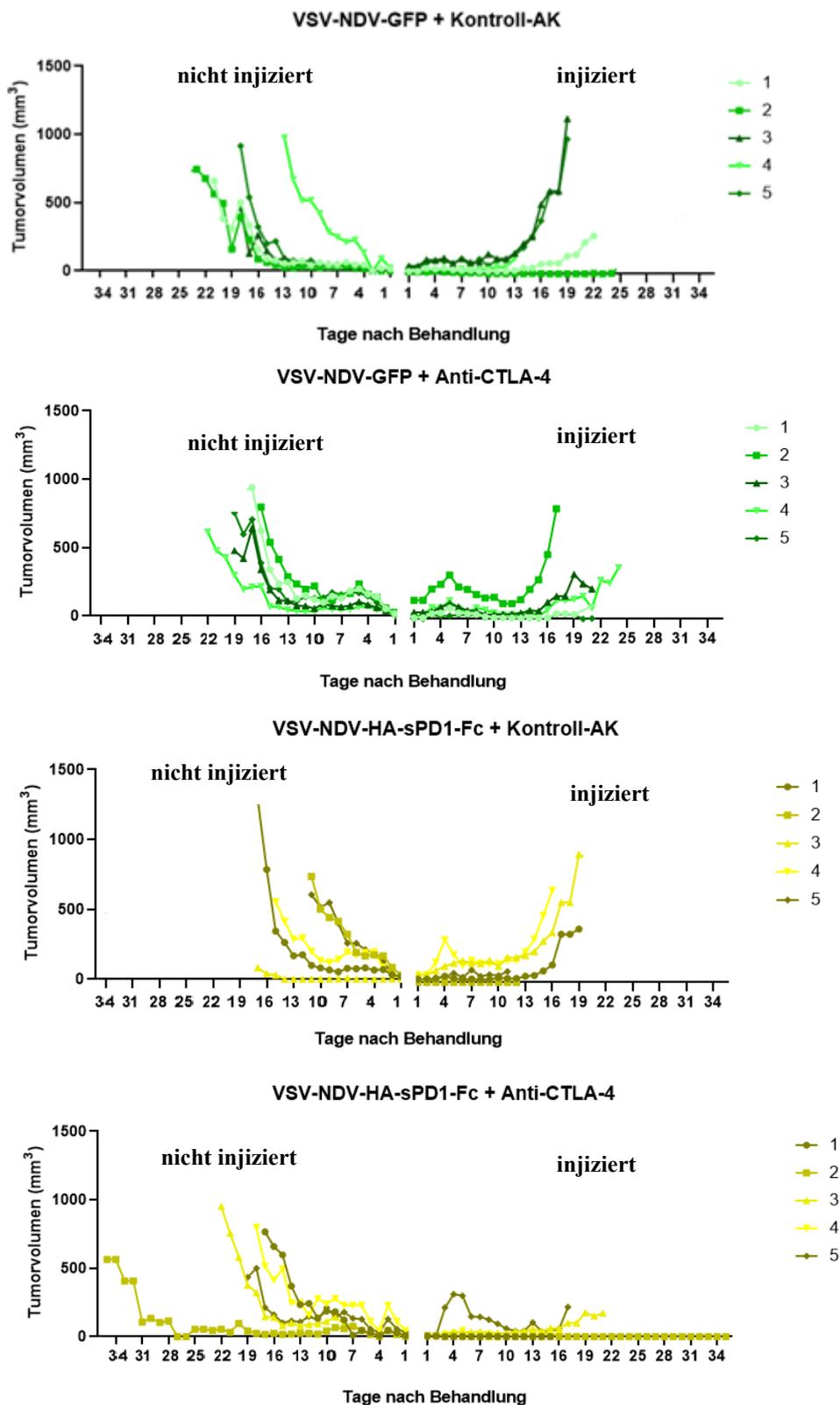


Abbildung 27: Individuelle Tumorwachstumskurven je Behandlungsgruppe

Eine Woche nach der Tumorumplantation erfolgte die dreimalige intratumorale Behandlung des rechten Tumors mit rVSV-NDV-GFP, VSV-NDV-HA-sPD1-Fc, 3pRNA oder PBS (injiziert) und zeitgleich die intraperitoneale Injektion von Anti-CTLA-4 oder dem Kontroll-AK. Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Alle Tumore wurden täglich vermessen und eine Wachstumskurve erstellt. (n=5/Behandlungsgruppe)

Zum Nachweis, inwieweit das Fehlen des RIG-I-Rezeptors und somit dessen Inaktivierung die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort beeinflusst und ob es dennoch auf die Kombinationstherapie zu einer Ausbildung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen kommt, wurden den Mäusen zwei Tage nach der letzten Behandlung Blut entnommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf eine OVA-Tetramer⁺/CD8⁺-T-Zell-Population untersucht (siehe Abbildung 28).

Die Blut-Analyse ergab, dass bei den Mäusen, die den CTLA-4-Antikörper erhielten, der prozentuale Anteil der zytotoxischen T-Zellen, die spezifisch gegen den Tumor gerichtet waren tendenziell höher lag, als bei den Gruppen, die nur mit dem Kontroll-AK behandelt wurden. Dennoch war dieser Unterschied nur in der Gruppe, die zusätzlich zum Anti-CTLA-4 noch rVSV-NDV-GFP erhielten signifikant ($p=0,0087$)

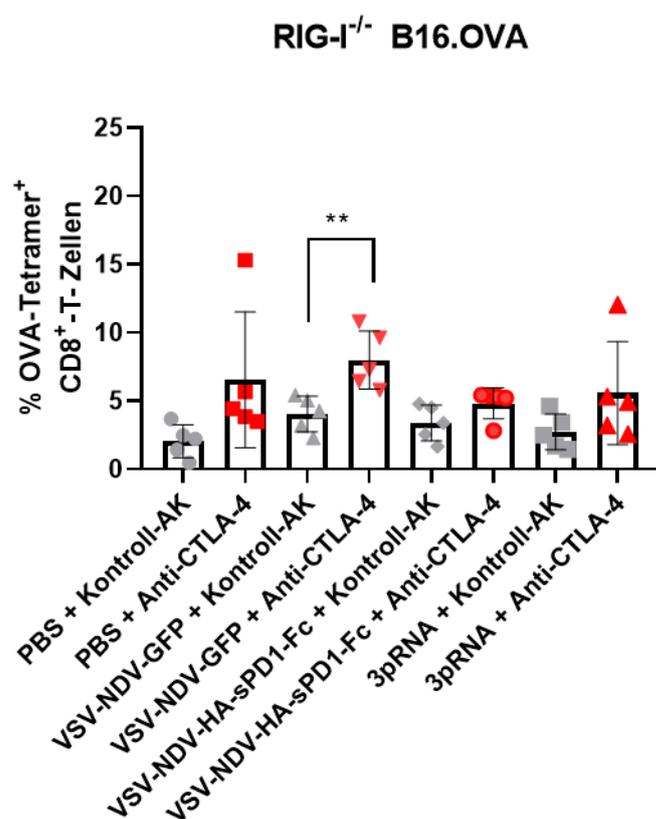


Abbildung 28: Blut-Analyse der spezifischen T-Zell-Immunantwort

Zwei Tage nach der letzten Behandlung erfolgte die Blutentnahme der C57Bl6/J Mäuse. Anschließend wurden PBMCs aus dem peripheren Blut isoliert, mit einem CD8-Antikörper und einem OVA-spezifischen Tetramer gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind Balkendiagramme mit individueller Verteilung. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem T-Test. N=5/Gruppe. (**:p-Wert <0,01)

Am Ende der Überlebensstudie wurden Überlebenskurven erstellt. Dadurch konnte der Einfluss des RIG-I-Rezeptors durch dessen Inaktivität in den RIG-I^{-/-} B16.OVA-Zellen auf die Therapien und letztendlich auf die Überlebenszeit der Mäuse dargestellt werden (siehe Abbildung 29).

Die Analyse der Überlebenskurven ergab, dass die Kombinationstherapie aus onkolytischem Virus mit Immuncheckpoint-Inhibitor, in den RIG-I-defizienten Tumoren nur minimalst zu einer Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse geführt hat. Auch die Mäuse, die mit onkolytischem Virus und Kontroll-AK behandelt wurden, lebten nur bis um den 22. Tag nach der ersten Behandlung. Nur rVSV-NDV-GFP gelang es, das Überleben der Mäuse im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe signifikant (P=0,0143) zu verlängern.

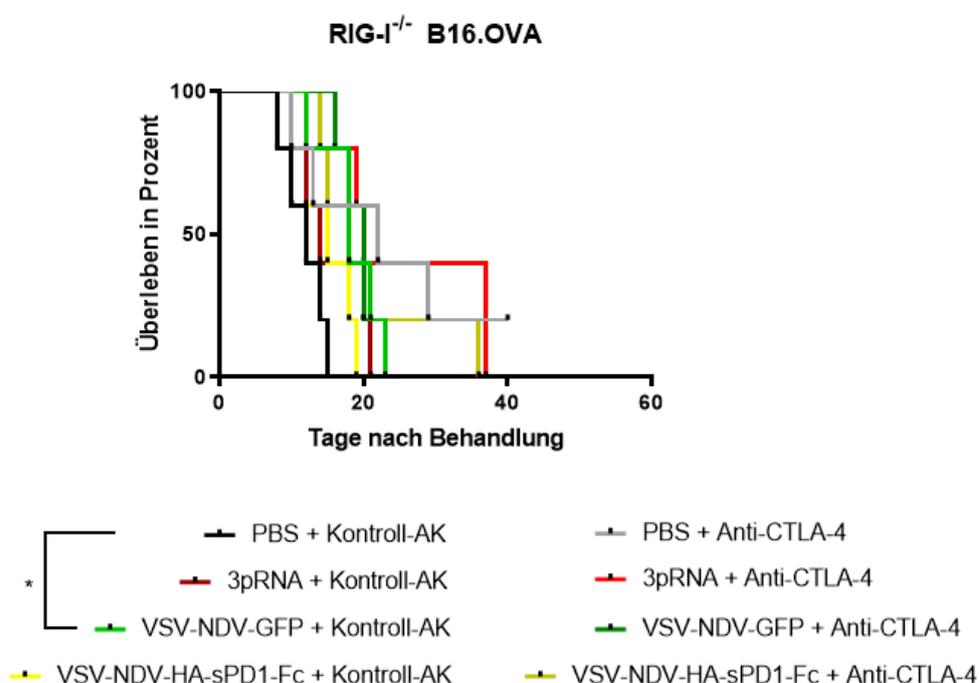


Abbildung 29: Überlebenskurven der Überlebensstudie D

Eine Woche nach der Tumorimplantation von RIG-I^{-/-} B16.OVA erfolgte die dreimalige intratumorale (PBS/3pRNA/VSV-NDV-GFP/VSV-NDV-HA-sPD1-Fc) und intraperitoneale (Kontroll-AK/Anti-CTLA-4) Behandlung im Abstand von drei Tagen des rechten Tumors (injiziert). Der linke Tumor wurde nicht injiziert. Anhand der Zeitspanne von der ersten Behandlung bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Mäuse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt und statistisch mit Hilfe des Log-Rank-Tests ausgewertet. (n=5/Behandlungsgruppe). (*:p-Wert <0,05)

4.2.5 Direkter Vergleich: WT B16.OVA vs. RIG-I^{-/-}B16.OVA

Zum besseren Verständnis, welche Rolle die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors im Anschluss an die Kombinationstherapie mit onkolytischem Virus und Immuncheckpoint-Inhibitor auf die Ausbildung einer antitumoralen Immunantwort und das Überleben der Mäuse spielt, wurden die Ergebnisse der Blut-Analyse (siehe Abbildung 30) und der Überlebenskurven der Überlebensstudien C und D (siehe Abbildung 31) direkt miteinander verglichen.

Betrachtet man die Blut-Analyse erkennt man, dass der prozentuale Anteil an gebildeten spezifischen T-Zellen in den Wildtyp-Tumor-tragenden Mäusen, die Anti-CTLA-4 erhielten, zwar nicht statistisch signifikant, aber dennoch tendenziell höher war, als in den Mäusen, die den RIG-I-defizienten Tumor trugen und Anti-CTLA-4 erhielten. In den restlichen Gruppen ließ sich kein Unterschied feststellen.

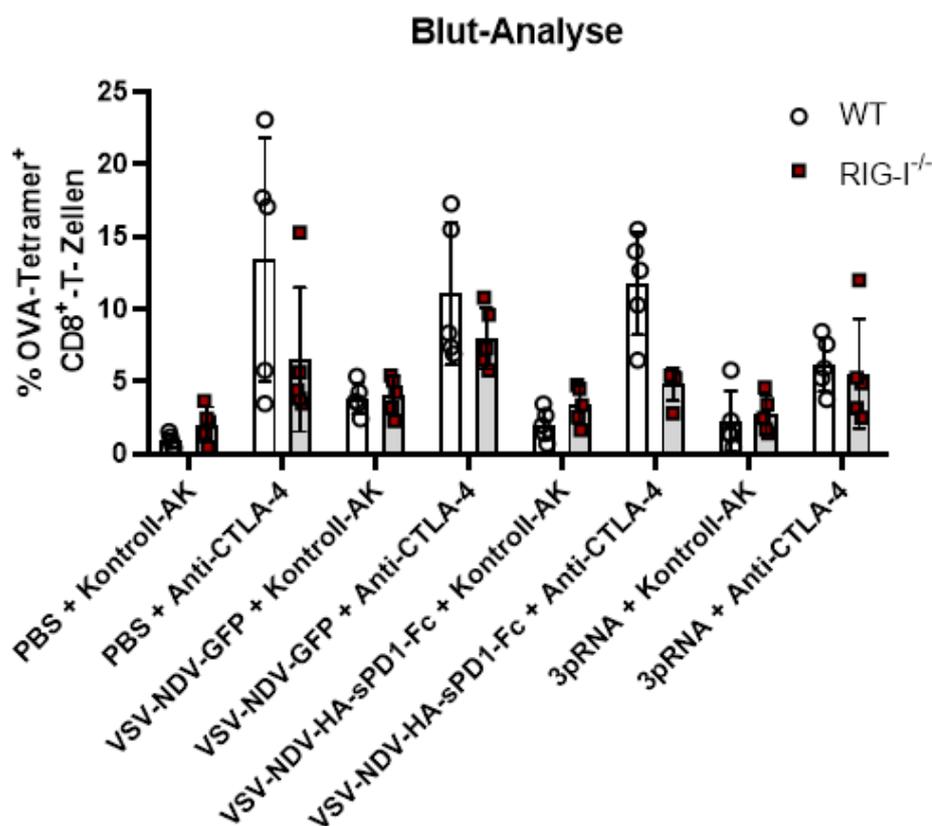


Abbildung 30: Vergleich der Blut-Analyse: WT vs. RIG-I^{-/-} B16.OVA

Gegenüberstellung der Blut-Analyseergebnisse der spezifischen T-Zell-Immunantwort der Überlebensstudien C und D zwei Tage nach der letzten Behandlung. Dargestellt sind Balkendiagramme mit individueller Verteilung je Behandlungsgruppe (Weiß: WT B16.OVA-tumortragende Mäuse; Rot: RIG-I^{-/-} B16.OVA-tumortragende Mäuse. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem T-Test. N=5/Gruppe. (**:p-Wert <0,01)

Beim direkten Vergleich der Überlebenskurven der Mäuse, die einen WT B16.OVA-Tumor hatten, mit den Überlebenskurven der Mäuse, die einen RIG-I-defizienten Tumor trugen, wird deutlich, dass vor allem in den Gruppen, die Anti-CTLA-4 bekamen, die Aktivierung von RIG-I einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Tiere hatte (siehe Abbildung 31). In den Gruppen, die zusätzlich zu Anti-CTLA-4, mit den onkolytischen Viren rVSV-NDV-GFP und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc behandelt wurden, war das Überleben in den WT B16.OVA-tragenden Mäusen signifikant verlängert, im Unterschied zur gleichen Behandlungsgurppe in den RIG-I-defizient-Tumor-tragenden Mäusen. Auch die Behandlung mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc ohne Anti-CTLA-4 zeigte eine Abhängigkeit von der Aktivierung des RIG-I-Rezeptors. Die Mäuse, die den WT B16.OVA-Tumr trugen, lebten signifikant länger als die Mäuse, bei denen der Tumor den RIG-I-Rezeptor nicht exprimierte. Im Gegensatz dazu schien die Behandlung mit rVSV-NDV-GFP unabhängig von dem Vorhandensein des RIG-I-Rezeptors zu sein.

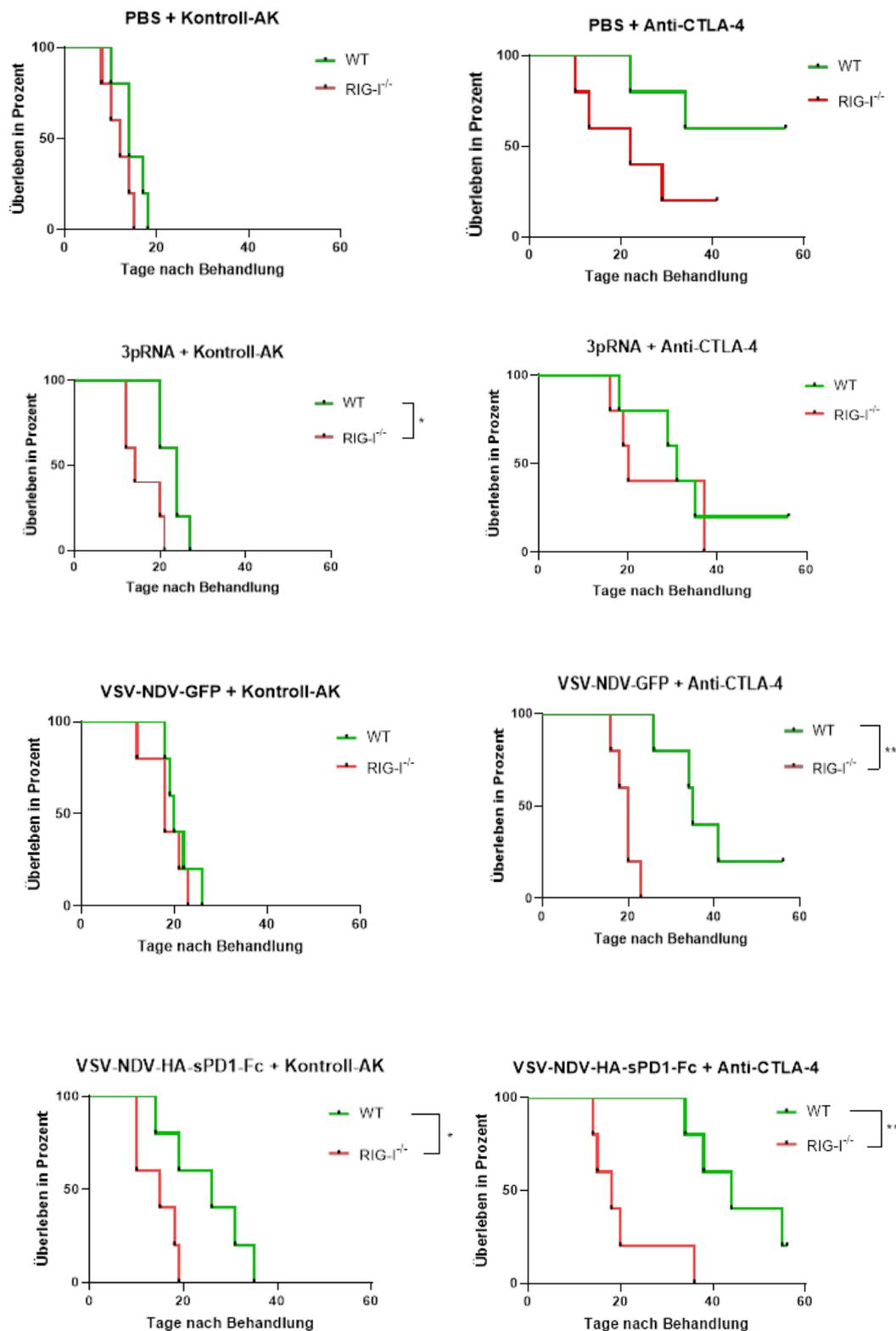


Abbildung 31: Vergleich der Überlebenskurven: WT vs. RIG-I^{-/-}B16.OVA

Anhand der Zeitspanne von der ersten Behandlung bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Mäuse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven der einzelnen Behandlungsgruppen erstellt, je Tumortyp (grün: WT B16.OVA; rot: RIG-I^{-/-} B16.OVA) direkt miteinander verglichen und statistisch mit Hilfe des Log-Rank-Tests ausgewertet. (n=5/Behandlungsgruppe). (*:p-Wert <0,05; **:p-Wert <0,01)

5 DISKUSSION

Onkolytische Viren stellen einen neuen und vielversprechenden Zweig der Immuntherapie gegen Krebserkrankungen dar und sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung und Entwicklung. Im Jahr 2015 wurde das erste onkolytische Virus, ein Herpes-Simplex-Virus, für die Therapie eines malignen Melanoms auf dem Markt zugelassen. Viele Weitere werden derzeit umfassend für den Einsatz als onkolytisches Immuntherapeutikum untersucht und entwickelt. Nun stehen die Forscher vor der Herausforderung, die Wirkung und Effektivität dieser Viren zu maximieren und dabei die Nebenwirkungen für den Patienten so gering wie möglich zu halten.

Das rekombinante Virus VSV-NDV stellt zum einen wegen seines guten Sicherheitsprofils, zum anderen wegen der Induktion eines immunogenen Zelltodes, eine vielversprechende Vektorplattform dar. Durch die entzündliche Wirkung onkolytischer Viren auf das Tumorgewebe wurde angenommen, dass die Induktion einer antitumoralen Immunantwort mit Hilfe einer systemischen Gabe von Immuncheckpoint-Blockaden verstärkt werden kann. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Kombinationstherapie aus dem Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 und VSV-NDV analysiert und bewertet. Durch zusätzliche Modifikationen des VSV-NDV soll sowohl die gezielte Onkolyse, als auch der immunvermittelte Effekt auf Tumorzellen optimiert und maximiert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten, neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten bieten die Möglichkeit, durch eine gezielte intratumorale Signaleinwirkung auf Immun-Kontrollpunkte, die Immunantwort gegen Tumorzellen zu reaktivieren und zu verstärken. Für das bessere Verständnis des Zustandekommens einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort im Anschluss an eine Therapie mit onkolytischem Virus und Immuncheckpoint-Inhibitoren wurde außerdem in dieser Arbeit die Rolle der Aktivierung des RIG-I Rezeptors untersucht.

5.1 Monotherapie vs. Kombinationstherapie mit Anti-CTLA-4

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das onkolytische Virus rVSV-NDV-GFP in der Lage ist, Tumorzellen zu infizieren und durch die Ausbildung von Synzytien zu zerstören. Es ist bekannt, dass es durch die Auflösung der Fusionen zu einer effizienten Präsentation von tumorassoziierten Antigenen durch dendritische Zellen kommt [15] und somit die Bildung von Synzytien zum immunogenen Zelltod führt. Dies kann die Mikroumgebung des Tumors in ein für das Immunsystem angreifbares Feld, durch die Infiltration von Zytokinen und zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, umwandeln und eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslösen [66]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Injektion von rVSV-NDV-GFP zu einer Wachstumsverzögerung sowohl des injizierten, als auch des weit entfernten kontralateralen Tumors kam. Dies kann an der Infiltration von spezifischen T-Zellen in den kontralateralen Tumor im Anschluss an die Injektion des Virus liegen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine intratumorale Therapie von B16-Melanom-Zellen mit NDV Entzündungsreaktionen, die zur Infiltration von tumorspezifischen CD8⁺-T-Zellen auch in dem entfernten Tumor führte und das Wachstum verzögerte [114].

Es ist bekannt, dass Immuncheckpoint-Inhibitoren besser ansprechen, wenn das Tumorgewebe schon eine immunogene Aktivität aufweist [42], was durch die Behandlung mit einem onkolytischem Virus erreicht werden kann. In dieser Arbeit führte die Kombinationstherapie aus rVSV-NDV-GFP und Anti-CTLA-4 zu einem deutlich verzögertem Tumorwachstum beider Tumore. Dies spiegelte sich auch in dem Überleben der Mäuse wider. Die Tiere, die zusätzlich zur Virotherapie, den Antikörper Anti-CTLA-4 erhielten, lebten deutlich länger als die Mäuse, die die Monotherapie aus Virus erhielten. Dies korreliert mit einer Studie, wo die Kombination aus T-Vec und Anti-CTLA-4 eine höhere Effektivität und zugleich ein besseres Sicherheitsprofil aufwies, als die jeweiligen Monotherapien [88]. Eine weitere Studie fand heraus, dass die Antitumor-Aktivität der Kombinationstherapie aus NDV und Anti-CTLA-4 von CD8⁺-T-Zellen, NK-Zellen und Typ-I- und -II-Interferon abhängt [114]. Auch in dieser Arbeit konnte in der Blut-Analyse gezeigt werden, dass in den Gruppen, die zusätzlich mit Anti-CTLA-4 behandelt wurden, der prozentuale Anteil an tumorantigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen höher war, als in den Gruppen der Monotherapie.

Zusätzlich zur Kombination aus rVSV-NDV-GFP und Anti-CTLA-4, wurde in dieser Arbeit auch das neu entwickelte VSV-NDV-HA-sPD1-Fc in Kombination mit Anti-CTLA-4 *in vivo* getestet. Es ist bekannt, dass die Kombination aus den zwei Immuncheckpoint-Inhibitoren

Anti-CTLA-4 und Anti-PD-L1, die Effektivität und die Sicherheit bei einigen Tumorpatienten deutlich verbessern kann [87]. Die Behandlung mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc in Kombination mit Anti-CTLA-4 beinhaltet gleich drei Wirkmechanismen, die die Tumorzellen und dessen Mikroumgebung beeinflussen. Die erste Wirkung beruht auf dem onkolytischen Effekt des Virus. Durch die Ausbildung von Synzytien kann sich das Virus schnell vermehren und ausbreiten und verursacht eine effektive Zytotoxizität. Der zweite Wirkmechanismus beinhaltet die Expression und Sekretion des sPD1-Moleküls von mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc infizierten Tumorzellen. Dadurch gelingt die lokale Blockade des PD1:PD-L1-Signalwegs und die Aktivierung spezifischer T-Zellen. Der dritte Wirkmechanismus liegt in der Verstärkung der antitumoralen Immunantwort durch die systemische Gabe des Immuncheckpoint-Inhibitors Anti-CTLA-4. Dadurch soll die Effektivität der lokalen Immuncheckpoint-Inhibition von sPD1 verstärkt und die gerichtete Immunantwort gegen den Tumor verbessert werden.

In dieser Arbeit schnitt VSV-NDV-HA-sPD1-Fc in Kombination mit Anti-CTLA-4 im Vergleich zu den anderen onkolytischen Viren am besten ab und verlängerte signifikant das Überleben der Mäuse. Betrachtet man dazu die Tumorwachstumskurven zeigt sich, dass der injizierte Tumor keine Chance hatte zu wachsen. Auch der kontralaterale, nicht injizierte Tumor blieb bis um den Tag 20 auf einer konstant kleinen Größe. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit der Blut-Analyse. Der prozentuale Anteil an spezifischen zytotoxischen T-Zellen lag signifikant höher als in der Vergleichsgruppe, die nur mit VSV-NDV-HA-sPD1-Fc behandelt wurde. Dies zeigt, wie wichtig die Aktivierung und Ausbildung von spezifischen, gegen den Tumor gerichteten T-Zellen ist und dass Anti-CTLA-4 in der Lage ist, dies zu verstärken.

Überraschenderweise ist zu sagen, dass in dieser Arbeit die alleinige Gabe von Anti-CTLA-4 das Überleben der Mäuse signifikant verlängert hatte, auch ohne Kombination mit onkolytischem Virus. Das kann unter anderem daran liegen, dass die Konzentration des gegebenen Antikörpers zu hoch war und der Effekt des onkolytischen Virus nicht zum Vorschein kommen konnte. Des Weiteren können Umweltfaktoren einen Einfluss auf die Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren haben. Dazu zählt beispielsweise der Umweltstress (z.B. thermischer Stress) oder die Zusammensetzung des Darmmikrobioms [24].

Zwar ist die Immuncheckpoint-Therapie mit Anti-CTLA-4 sehr erfolgreich und kann das Überleben der Patienten deutlich verlängern [48], jedoch sind die Nebenwirkungen, die unter der Therapie mit Anti-CTLA-4 auftreten können, nicht zu unterschätzen. Aufgrund der immunvermittelten Wirkung von Anti-CTLA-4 kann es zu immunbedingten Störungen in

verschiedenen Organsystemen kommen [106]. Außerdem sprechen nur eine kleine Minderheit an Patienten auf eine Monotherapie mit Anti-CTLA-4 an. Die Kombination aus onkolytischem Virus und Immuncheckpoint-Inhibitor ermöglicht zum einen, die Effektivität der Induktion einer Antitumor-Immunantwort zu verbessern und zum anderen immunbedingte Nebenwirkungen durch potenzielle Reduzierung der erforderlichen Dosis zu minimieren.

5.2 VSV-NDV-sPD1-Varianten

Die immunvermittelte Wirkung von onkolytischen Viren kann durch eine Reihe von immunregulatorischen Mechanismen innerhalb des Tumorgewebes, unter anderem durch den PD1:PD-L1-Signalweg, gehemmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein modifiziertes Myxoma-Virus (vPD1), das eine lösliche Form von PD1 aus infizierten Zellen absondert, wirksamer war, als das unveränderte Virus [14]. Die hier verwendeten und neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten sollen auch durch die Sezernierung eines löslichen PD1-Moleküls, den Kontrollpunkt zwischen Tumorzelle und T-Zelle überwinden, indem sie gezielt und lokal den PD1:PD-L1-Signalweg blockieren und somit die immunvermittelte Wirkung des Virus verstärken. Außerdem könnte der Einsatz dieser Viren, die gezielt Tumorzellen infizieren, mögliche Nebenwirkungen, die bei der systemischen Verabreichung von Antikörpern auftreten können, reduzieren. Ein weiterer Vorteil wäre die Kostenlimitierung, da die virusvermittelte Expression des Moleküls für die PD1:PD-L1-Blockade wesentlich billiger wäre, als eine Kombinationstherapie mit einem Antikörper. Die Neuheit der VSV-NDV-sPD1-Varianten liegt bei den einzelnen Modifikationen des PD1-Moleküls, die das Molekül zum einen stabiler (Fc), oder hoch-affin (HA) für seinen Liganden machen sollen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten das Tumorwachstum, insbesondere der injizierten Tumore reduziert und das Gesamtüberleben der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verlängert hat. VSV-NDV-sPD1-Fc schnitt dabei am besten ab, was mit den Ergebnissen der *in vitro* Versuche korreliert, wo gezeigt werden konnte, dass das Virus sich am schnellsten repliziert und eine effektive Zytotoxizität verursacht. Interessanterweise zeigten im Vergleich dazu die beiden Viren VSV-NDV-HA-sPD1 und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc zwar *in vitro* eine verlangsamte Replikationsrate und einen verzögerten zytotoxischen Effekt, dennoch führte die intratumorale Behandlung der Viren zu einer deutlichen Tumorwachstumsverzögerung im injizierten Tumor im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen.

Bei der Analyse der sPD1-Expression und Sekretion der rekombinanten sPD1-Viren stellte

sich heraus, dass sPD1 hauptsächlich im Überstand von mit VSV-NDV-sPD1 und VSV-NDV-sPD1-Fc infizierten Tumorzellen aufzufinden war, im Gegensatz zum Überstand der mit VSV-NDV-HA-sPD1 und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc infizierten Zellen. Dies kann an der hoch-affinen Bindung der HA-sPD1-Moleküle an den Liganden PD-L1 auf der Membran der Tumorzellen liegen, die dadurch nicht im Überstand zu finden sind. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein chimäres lösliches HA PD-1-Protein eine 45-fache Erhöhung der Bindung an PD-L1 aufwies [67]. Außerdem zeigte das HA PD-1-Protein eine verstärkte Bindung an menschliche dendritische Zellen und eine erhöhte T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion in einer gemischten Lymphozyten-Reaktion (MLR) [67]. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit der Analyse der Tumorwachstumskurven. Bei den mit VSV-NDV-HA-sPD1 und VSV-NDV-HA-sPD1-Fc behandelten Mäuse blieb der antitumorale Effekt auf den mit Virus injizierten Tumor beschränkt und zeigte keine Auswirkung auf den kontralateralen Tumor. Dennoch war die lokale Wirkung viel stärker ausgeprägt als bei den anderen Viren. Möglicherweise bindet das HA-sPD1-Molekül, das von den infizierten Zellen sezerniert wird, mit solch einer hohen Affinität an PD-L1 der Tumorzellen, dass dadurch eine Vielzahl an CD8⁺-T-Zellen aktiviert werden und es, durch die Infiltration weiterer Immunzellen, bei einer stark lokalisierten, auf den injizierten Tumor beschränkten antitumoralen Immunantwort bleibt. Die Behandlung mit dem modifizierten Myxoma-Virus vPD1 führte ebenfalls zu einer lokalen Induktion von CD8⁺-T-Zell-Reaktionen innerhalb des Tumors [14]. Außerdem ist bekannt, dass die PD-L1-Expression nach einer Virusinfektion im Tumorgewebe ansteigt [65], was den Effekt der von mit VSV-NDV-sPD1-infizierten Tumorzellen sezernierten sPD1-Moleküle zusätzlich verstärken kann.

Um zu veranschaulichen, inwieweit die Behandlung mit den VSV-NDV-sPD1-Varianten eine bessere Wirkung erzielen, als die alleinige Gabe des Antikörpers PD1, müssten zusätzlich Versuche durchgeführt werden, die diese Gruppen miteinander vergleichen. Generell ist zu erwähnen, dass die systemische Gabe des Antikörpers PD1 nicht in allen Patienten anschlägt und den gewünschten Erfolg erzielt. Die Wirksamkeit der Therapie scheint auf der Verstärkung einer bereits bestehenden Antitumor-Reaktion zu beruhen [14]. Aus diesem Grund wird, durch die Kombination zusätzlicher Medikamente versucht, die Immunantwort zu verbessern [65]. Dies hat jedoch den nachteiligen Effekt, dass vermehrt hohe autoimmunähnliche Nebenwirkungen bei den Patienten auftreten [65]. Die intratumorale Behandlung mit einem rekombinanten VSV-NDV-sPD1 macht es möglich, die PD1-Wirkung lokal begrenzt zu halten, ohne das gesunde Gewebe zu beeinflussen und kann dadurch immunvermittelte Nebenwirkungen reduzieren. Außerdem kann die Wirksamkeit von PD1

durch die Antitumor-Reaktion des Virus an sich verstärkt werden.

Zur weiteren Optimierung und Maximierung des onkolytischen Effekts und des Einflusses der Hemmung des PD1:PD-L1-Signalwegs durch sPD1 der VSV-NDV-sPD1-Varianten wäre es in Zukunft interessant, den Effekt einer systemischen Gabe des Virus zu analysieren. Da onkolytische Viren einen Tropismus für Tumorzellen aufweisen, würde das Virus bei einer systemischen Gabe gezielt zum Tumorgewebe gelangen und dieses infizieren. Somit könnten auch Tumore erreicht werden, die aufgrund ihrer Lage nicht für eine intratumorale Injektion geeignet sind.

5.3 Rolle des RIG-I-Rezeptors

Der Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) -Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung viraler RNA und bei der Auslösung einer antiviralen Immunantwort. Außerdem kann die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors innerhalb von Tumorzellen dessen Wachstum beeinflussen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors durch 3pRNA zum Tod von Melanom-Zellen mit anschließender Kreuzpräsentation von tumorassoziierten Antigenen durch dendritische Zellen mit nachfolgender systemischer Aktivierung von tumorantigenspezifischen T-Zellen *in vivo* führte [17].

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors, sowohl durch die 3pRNA, als auch durch rVSV-NDV-GFP zu einem verlangsamten Tumorwachstum beider Tumore führte. Im Vergleich dazu hatte die Behandlung mit onkolytischem Virus oder 3pRNA von RIG-I^{-/-}-tumorzelltragenden Mäusen nur einen Einfluss auf den direkt injizierten und nicht auf den entfernten nicht injizierten Tumor. Durch die fehlende RIG-I-Aktivierung in den RIG-I-defizienten Tumorzellen bleibt möglicherweise die systemische Bildung von tumorantigenspezifischen T-Zellen aus, was zum uneingeschränkten Tumorwachstum des nicht injizierten Tumors führt. Generell ist zu sagen, dass die 3pRNA als Ligand den RIG-I-Rezeptor zwar aktiviert und somit das Tumorwachstum im positiven Sinne beeinflussen kann, jedoch bleibt die Wirkung auf diesen Signalweg beschränkt. Onkolytische Viren, wie VSV-NDV hingegen, sind nicht nur in der Lage RIG-I zu stimulieren, sondern können mit ihren einzigartigen Eigenschaften den antitumoralen Effekt zusätzlich verstärken.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von RIG-I den Effekt von Immuncheckpoint-Inhibitoren verstärkt. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Immuncheckpoint-Inhibition durch Anti-CTLA-4 deutlich von der Aktivierung des RIG-I-Rezeptors abhängt. Es ist davon

auszugehen, dass rVSV-NDV-GFP in den WT B16.OVA-tragenden Mäusen den RIG-I-Rezeptor aktivierte und dadurch die Wirkung der CTLA-4-Inhibition potenzierte. Außerdem lag der prozentuale Anteil an tumorantigenspezifischen T-Zellen im Blut von WT B16.OVA-tumorzelltragenden Mäusen über dem Anteil von RIG-I^{-/-} B16.OVA-tumorzelltragenden Mäusen. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer Studie, bei der die Expansion und Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen durch die Bindung von 3pRNA an RIG-I in Kombination mit Anti-CTLA-4 einen stark synergistischen Effekt aufwies, was zu einer verbesserten antitumoralen Immunantwort führte [45].

Interessanterweise hatte die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors durch VSV-NDV-HA-sPD1-Fc auch ohne die zusätzliche Gabe von Anti-CTLA-4 einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben der Mäuse. Möglicherweise liegt dies ebenfalls am synergistischen Effekt der Aktivierung des Rezeptors und der direkten Immuncheckpoint-Blockade durch die Sezernierung des sPD1 von infizierten Tumorzellen. Außerdem ist bekannt, dass die Aktivierung des RIG-I-Rezeptors durch eine ppp-RNA die Expression des PD-L1 auf akute myeloische Leukämie-Zellen induzierte und die Zellen für eine Therapie mit Anti-PD-1 sensibilisierte [95]. Demnach hat VSV-NDV-sPD1 durch die RIG-I-Aktivierung und der darauffolgenden Expression des PD-L1 das Potential, die Effektivität des löslichen PD1-Moleküls, das von infizierten Tumorzellen sezerniert wird, zusätzlich zu verstärken.

5.4 Ausblick

Forscher stehen vor der Aufgabe, den Einsatz onkolytischer Viren und deren Wirkung weiterzuentwickeln und zu maximieren. Gleichzeitig müssen Hindernisse bereits bestehender Therapieoptionen im Hinblick auf Nebenwirkungen, Toxizität und Resistenzen verbessert und optimiert werden. Die Kombination aus onkolytischem Virus und Immuncheckpoint-Blockade stellt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine vielversprechende Immuntherapie dar, um sowohl die antitumorale Effektivität zu optimieren, als auch die Nebenwirkungen zu minimieren. Durch spezifische Modifikationen onkolytischer Viren, wie die rekombinanten VSV-NDV-sPD1-Varianten, kann gezielt die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst werden, ohne das gesunde umliegende Gewebe zu beeinträchtigen. Mit Hilfe des bilateralen Melanom-Mausmodells war es möglich, den immunvermittelten Effekt des onkolytischen Virus VSV-NDV auf den unbehandelten, entfernten Tumor darzustellen und zu analysieren. Außerdem erlaubte das Modell, durch die Verwendung spezieller Melanom-Zellen, die ein Ovalbumin exprimierten, den Nachweis tumorantigenspezifischer T-Zellen, die als Reaktion auf die Therapie gebildet wurden. Jedoch ist zu sagen, dass es sich bei dem Ovalbumin um ein hoch immunogenes, körperfremdes Protein handelt und somit die Analyse der OVA-spezifischen T-Zellen ein künstliches System darstellt. Dennoch ist dies für immunologische Proof-of-Concept-Studien sehr nützlich. Um allerdings die therapeutischen Reaktionen bei Patienten besser vorhersagen zu können, müsste als nächster Schritt dieses System der T-Zell-Analyse an ein klinisch relevanteres Modell angepasst werden.

VSV-NDV ist aber nicht nur in der Lage Melanom-Zellen zu infizieren und zu zerstören. Bei orthotopen HCC-tragenden Mäusen führte die systemische Gabe des rekombinanten VSV-NDV zu einer Verdopplung der mittleren Überlebenszeit [1] und zeigt damit sein hohes Potential zukünftig auch gegen andere Tumorarten eingesetzt werden zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung einer optimierten onkolytischen Virus-Plattform für die Blockade von Immunkontrollpunkten beim Melanom

Das maligne Melanom stellt eine bösartige Tumorerkrankung dar, die nach Ausbildung von Metastasen eine ungünstige Prognose für die Patienten aufweist. Zwar existieren eine Reihe von verschiedensten Medikamenten, die bei der Behandlung des Melanoms zum Einsatz kommen, dennoch besteht, aufgrund von auftretenden Resistenzen und Nebenwirkungen das Bedürfnis, vor allem die vielversprechende Immuntherapie zu optimieren und zu verbessern. Dazu gehört die Erforschung und Entwicklung von onkolytischen Viren. In dieser Arbeit wurden die neu entwickelten VSV-NDV-sPD1-Varianten im Hinblick auf ihre Replikationsfähigkeit, Zytotoxizität und Effektivität *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Außerdem diente diese Arbeit dazu, die Kombinationstherapie aus dem Immuncheckpoint-Inhibitor Anti-CTLA-4 und dem rekombinanten onkolytischen Virus VSV-NDV zu analysieren und die Rolle des RIG-I-Rezeptors, der virale RNA erkennen kann, in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Die Ergebnisse der Charakterisierung der VSV-NDV-sPD1-Varianten zeigen, dass sich VSV-NDV-sPD1-Fc, ähnlich wie VSV-NDV-GFP, *in vitro* am schnellsten vermehren kann und eine effektive Zytotoxizität in B16.OVA-Zellen verursacht. Obwohl rVSV-NDV-GFP das Tumorwachstum bei B16-Tumoren äußerst wirksam verzögerte, wurde die Therapie durch die Modifikation des Virus zur Expression von sPD1 zusätzlich verbessert. Die Kombinationstherapie mit dem Immuncheckpoint-inhibitor Anti-CTLA-4 führte zu einem deutlich verzögerten Tumorwachstum sowohl des injizierten, als auch des nicht injizierten Tumors, was das Überleben der Mäuse signifikant verlängerte. Dazu korrelieren die Ergebnisse der Blut-Analyse, die zeigen, dass der prozentuale Anteil an tumorantigenspezifischen T-Zellen in den Mäusen, die den Antikörper Anti-CTLA-4 und rVSV-NDV erhielten deutlich höher war, als in den Vergleichsgruppen, die mit einem Kontroll-Antikörper behandelt wurden. Dabei zeigen die Ergebnisse, dass die Effizienz von Anti-CTLA-4 deutlich von der Aktivierung des RIG-I-Rezeptors abhängt und die Behandlung mit onkolytischen Viren diesen Effekt verstärken kann.

Deshalb stellt VSV-NDV eine vielversprechende Virusplattform als zukünftiges Immuntherapeutikum dar. Weitere Modifikationen ermöglichen einen gezielten Eingriff in Signalwege zwischen Tumorzellen und Immunzellen, um eine gezielte Antitumor-Immunantwort zu induzieren, zu verbessern und zu verstärken.

V. SUMMARY

Development of an optimized oncolytic virus platform for immune checkpoint blockade in melanoma

Malignant melanoma is a malignant tumor disease that, after metastasis has developed, has an unfavorable prognosis for the patient. Although there are a number of different drugs that are used in the treatment of melanoma, there is a need to optimize and improve the promising immunotherapy, due to the resistance and side effects that occur. This includes the research and development of oncolytic viruses. In this work, the newly developed VSV-NDV-sPD1 variants were characterized with regard to their replication ability, cytotoxicity and effectiveness *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, this work served to analyze the combination therapy of the immune checkpoint inhibitor anti-CTLA-4 and the recombinant oncolytic virus VSV-NDV and to investigate the role of the RIG-I receptor, which is able to recognize viral RNA, in this context. The results of the characterization of the VSV-NDV-sPD1 variants show that VSV-NDV-sPD1-Fc, similar to VSV-NDV-GFP, can multiply fastest *in vitro* and causes an effective cytotoxicity in B16.OVA cells. Although rVSV-NDV-GFP was extremely effective in delaying tumor growth in B16 tumors, the therapy was further improved by modifying the virus to express sPD1. The combination therapy with the immune checkpoint inhibitor anti-CTLA-4 led to a significantly delayed tumor growth, both of the injected and uninjected tumor, which significantly prolonged the survival of the mice. In addition, the results of the blood analysis correlate, showing that the percentage of tumor antigen-specific T cells was significantly higher in the mice that received the antibody anti-CTLA-4 and VSV-NDV than in the comparison groups that were treated with a control antibody. The results show that the efficiency of anti-CTLA-4 clearly depends on the activation of the RIG-I receptor and that treatment with oncolytic viruses can enhance this effect.

Therefore, VSV-NDV represents a promising virus platform as a future immunotherapeutic agent. Further modifications allow a targeted intervention in signaling pathways between tumor cells and immune cells in order to induce, improve and enhance a specific anti-tumor immune response.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Abdullahi, S., Jäkel, M., Behrend, S. J., Steiger, K., Topping, G., Krabbe, T., Colombo, A., Sandig, V., Schiergens, T. S., Thasler, W. E., Werner, J., Lichtenthaler, S. F., Schmid, R. M., Ebert, O., and Altomonte, J. 2018. A Novel Chimeric Oncolytic Virus Vector for Improved Safety and Efficacy as a Platform for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of virology* 92, 23.
- [2] Agar, N. and Young, A. R. 2005. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation research* 571, 1-2, 121–132.
- [3] Akinleye, A. and Rasool, Z. 2019. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *Journal of hematology & oncology* 12, 1, 92.
- [4] Alexander, D. J. 1988. *Newcastle Disease*. Developments in Veterinary Virology, 0924-5359 8. Springer US, Boston, MA.
- [5] Ali, Z., Yousaf, N., and Larkin, J. 2013. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC supplements : EJC : official journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et al.]* 11, 2, 81–91.
- [6] Altomonte, J., Marozin, S., Schmid, R. M., and Ebert, O. 2010. Engineered newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 2, 275–284.
- [7] Altomonte, J., Wu, L., Chen, L., Meseck, M., Ebert, O., García-Sastre, A., Fallon, J., and Woo, S. L. C. 2008. Exponential enhancement of oncolytic vesicular stomatitis virus potency by vector-mediated suppression of inflammatory responses in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1, 146–153.
- [8] American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2016.
- [9] Andtbacka, R. H. I., Kaufman, H. L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K. A., Spitler, L. E., Puzanov, I., Agarwala, S. S., Milhem, M., Cranmer, L., Curti, B., Lewis, K., Ross, M., Guthrie, T., Linette, G. P., Daniels, G. A., Harrington, K., Middleton, M. R., Miller, W. H., Zager, J. S., Ye, Y., Yao, B., Li, A., Doleman, S., VanderWalde, A., Gansert, J., and Coffin, R. S. 2015. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of*

- clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33, 25, 2780–2788.
- [10] Aruffo, A. and Seed, B. 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 23, 8573–8577.
- [11] Azuma, T., Yao, S., Zhu, G., Flies, A. S., Flies, S. J., and Chen, L. 2008. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111, 7, 3635–3643.
- [12] Barbee, M. S., Ogunniyi, A., Horvat, T. Z., and Dang, T.-O. 2015. Current status and future directions of the immune checkpoint inhibitors ipilimumab, pembrolizumab, and nivolumab in oncology. *The Annals of pharmacotherapy* 49, 8, 907–937.
- [13] Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., Mapa, F. A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P., Shipway, A., Engels, I. H., Cheng, J., Yu, G. K., Yu, J., Aspesi, P., Silva, M. de, Jagtap, K., Jones, M. D., Wang, L., Hatton, C., Palescandolo, E., Gupta, S., Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R. C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler, W., Reich, M., Li, N., Mesirov, J. P., Gabriel, S. B., Getz, G., Ardlie, K., Chan, V., Myer, V. E., Weber, B. L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J. L., Meyerson, M., Golub, T. R., Morrissey, M. P., Sellers, W. R., Schlegel, R., and Garraway, L. A. 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 7391, 603–607.
- [14] Bartee, M. Y., Dunlap, K. M., and Bartee, E. 2017. Tumor-Localized Secretion of Soluble PD1 Enhances Oncolytic Virotherapy. *Cancer research*, 11, 2952–2963.
- [15] Bateman, A. R., Harrington, K. J., Kottke, T., Ahmed, A., Melcher, A. A., Gough, M. J., Linardakis, E., Riddle, D., Dietz, A., Lohse, C. M., Strome, S., Peterson, T., Simari, R., and Vile, R. G. 2002. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer research* 62, 22, 6566–6578.
- [16] Batistatou, A., Zioga, A., Panelos, J., Massi, D., Agnantis, N. J., and Charalabopoulos, K. 2007. A new concept of melanocytic neoplasia pathogenesis based on the phenotype of common acquired nevi. *Medical hypotheses* 69, 6, 1334–1339.
- [17] Bek, S., Stritzke, F., Wintges, A., Nedelko, T., Böhmer, D. F. R., Fischer, J. C., Haas,

- T., Poeck, H., and Heidegger, S. 2019. Targeting intrinsic RIG-I signaling turns melanoma cells into type I interferon-releasing cellular antitumor vaccines. *Oncoimmunology* 8, 4, e1570779.
- [18] Brehm, W., Gehlen, H., Ohnesorge, B., and Wehrend, A. 2017. *Handbuch Pferdepraxis*. Enke Verlag, Stuttgart.
- [19] Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., and Golstein, P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 6127, 267–270.
- [20] Buchbinder, E. I. and Desai, A. 2016. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology* 39, 1, 98–106.
- [21] Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J., and Seed, B. 1991. The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147, 9, 3165–3169.
- [22] Cameron, F., Whiteside, G., and Perry, C. 2011. Ipilimumab: first global approval. *Drugs* 71, 8, 1093–1104.
- [23] Charan, S., Mahajan, V. M., and Agarwal, L. P. 1981. Newcastle disease virus antibodies in human sera. *The Indian journal of medical research* 73, 303–307.
- [24] Cogdill, A. P., Andrews, M. C., and Wargo, J. A. 2017. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *British journal of cancer* 117, 1, 1–7.
- [25] Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J.C., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P.A., and Davis, S. J. 2002. The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity* 17, 2, 201–210.
- [26] Cuadrado-Castano, S., Sanchez-Aparicio, M. T., García-Sastre, A., and Villar, E. 2015. The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus research* 209, 56–66.
- [27] Dariavach, P., Mattéi, M. G., Golstein, P., and Lefranc, M. P. 1988. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *European journal of immunology* 18, 12, 1901–1905.

- [28] Diaz, R. M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G., and Vile, R. G. 2007. Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer research* 67, 6, 2840–2848.
- [29] Diggs, L. P. and Hsueh, E. C. 2017. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomarker research* 5, 12.
- [30] Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., and Pópulo, H. 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy* 7, 35–49.
- [31] Dummer, R., Hauschild, A., Lindenblatt, N., Pentheroudakis, G., and Keilholz, U. 2015. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 Suppl 5, v126-32.
- [32] Ebert, O., Harbaran, S., Shinozaki, K., and Woo, S. L. C. 2005. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice. *Cancer gene therapy* 12, 4, 350–358.
- [33] Ebert, O., Shinozaki, K., Huang, T.-g., Savontaus, M. J., García-Sastre, A., and Woo, S. L. C. 2003. Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *Cancer research* 63, 13, 3605–3611.
- [34] Erdei, E. and Torres, S. M. 2010. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert review of anticancer therapy* 10, 11, 1811–1823.
- [35] Fábíán, Z., Csatory, C. M., Szeberényi, J., and Csatory, L. K. 2007. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *Journal of virology* 81, 6, 2817–2830.
- [36] Federal Select Agent Program. *Federal Select Agent Program - Select Agents and Toxins List*. <https://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>. Accessed 15 February 2020.
- [37] Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 127, 12, 2893–2917.
- [38] Francisco, L. M., Sage, P. T., and Sharpe, A. H. 2010. The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity. *Immunological reviews* 236, 219–242.

- [39] Freeman, A. I., Zakay-Rones, Z., Gomori, J. M., Linetsky, E., Rasooly, L., Greenbaum, E., Rozenman-Yair, S., Panet, A., Libson, E., Irving, C. S., Galun, E., and Siegal, T. 2006. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 1, 221–228.
- [40] Ganar, K., Das, M., Sinha, S., and Kumar, S. 2014. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus research* 184, 71–81.
- [41] Goldsmith, K., Chen, W., Johnson, D. C., and Hendricks, R. L. 1998. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *The Journal of experimental medicine* 187, 3, 341–348.
- [42] Gujar, S., Pol, J. G., Kim, Y., Lee, P. W., and Kroemer, G. 2018. Antitumor Benefits of Antiviral Immunity: An Underappreciated Aspect of Oncolytic Virotherapies. *Trends in immunology* 39, 3, 209–221.
- [43] Haas, C., Ertel, C., Gerhards, R., and Schirmacher, V. 1998. Introduction of adhesive and costimulatory immune functions into tumor cells by infection with Newcastle Disease Virus. *International journal of oncology* 13, 6, 1105–1115.
- [44] Hastie, E. and Grdzlishvili, V. Z. 2012. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. *The Journal of general virology* 93, Pt 12, 2529–2545.
- [45] Heidegger, S., Kreppel, D., Bscheider, M., Stritzke, F., Nedelko, T., Wintges, A., Bek, S., Fischer, J. C., Graalman, T., Kalinke, U., Bassermann, F., Haas, T., and Poeck, H. 2019. RIG-I activating immunostimulatory RNA boosts the efficacy of anticancer vaccines and synergizes with immune checkpoint blockade. *EBioMedicine* 41, 146–155.
- [46] Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M. A., and Schadendorf, D. 2001. Drug-resistance in human melanoma. *International journal of cancer* 93, 5, 617–622.
- [47] Heymann, J. J., Bulman, W. A., Swinarski, D., Pagan, C. A., Crapanzano, J. P., Haghighi, M., Fazlollahi, L., Stoopler, M. B., Sonett, J. R., Sacher, A. G., Shu, C. A., Rizvi, N. A., and Saqi, A. 2017. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. *Cancer cytopathology* 125, 12, 896–907.
- [48] Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J.

- B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., and Urba, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 8, 711–723.
- [49] Hotte, S. J., Lorence, R. M., Hirte, H. W., Polawski, S. R., Bamat, M. K., O'Neil, J. D., Roberts, M. S., Groene, W. S., and Major, P. P. 2007. An optimized clinical regimen for the oncolytic virus PV701. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 3, 977–985.
- [50] Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 6716, 263–266.
- [51] Ikehata, H. and Ono, T. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of radiation research* 52, 2, 115–125.
- [52] Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal* 11, 11, 3887–3895.
- [53] Johnson, J. E., Nasar, F., Coleman, J. W., Price, R. E., Javadian, A., Draper, K., Lee, M., Reilly, P. A., Clarke, D. K., Hendry, R. M., and Udem, S. A. 2006. Neurovirulence Properties of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vectors in Non-Human Primates. *Virology* 360, 1, 36–49.
- [54] Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD* 12, 4, 390-9; quiz 400-1.
- [55] Karimkhani, C., Reddy, B. Y., Dellavalle, R. P., and Sundararajan, S. 2017. Novel therapies for unresectable and metastatic melanoma. *BMJ (Clinical research ed.)* 359, j5174.
- [56] Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., and Zloza, A. 2015. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 9, 642–662.
- [57] Kaufman, H. L., Ruby, C. E., Hughes, T., and Slingluff, C. L. 2014. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma.

- Journal for immunotherapy of cancer* 2, 11.
- [58] Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J., and Wolchok, J. D. 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature reviews. Clinical oncology* 13, 5, 273–290.
- [59] Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., and Schreiber, R. D. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 7171, 903–907.
- [60] Krebsinformationsdienst and Krebsforschungszentrum, D. *Checkpoint-Inhibitoren: Atezolizumab ergänzt die zugelassenen Immuntherapien bei Krebs*. <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2017/fk24-checkpointhemmer-atezolizumab.php>. Accessed 15 January 2020.
- [61] Krummel, M. F. and Allison, J. P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine* 182, 2, 459–465.
- [62] Krummel, M. F. and Allison, J. P. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of experimental medicine* 183, 6, 2533–2540.
- [63] Kumar, S., Ingle, H., Mishra, S., Mahla, R. S., Kumar, A., Kawai, T., Akira, S., Takaoka, A., Raut, A. A., and Kumar, H. 2015. IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity. *Cell death & disease* 6, e1758.
- [64] Lamb, R. A. and Kolakofsky, D. 1996. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. Lippincott-Raven Press, Philadelphia.
- [65] Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., Long, G. V., Callahan, M. K., Postow, M. A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L. M., Horak, C., Hodi, F. S., and Wolchok, J. D. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* 373, 1, 23–34.
- [66] LaRocca, C. J. and Warner, S. G. 2018. Oncolytic viruses and checkpoint inhibitors:

- combination therapy in clinical trials. *Clinical and translational medicine* 7, 1, 35.
- [67] Lázár-Molnár, E., ScandiuZZi, L., Basu, I., Quinn, T., Sylvestre, E., Palmieri, E., Ramagopal, U. A., Nathenson, S. G., Guha, C., and Almo, S. C. 2017. Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy. *EBioMedicine* 17, 30–44.
- [68] Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)* 271, 5256, 1734–1736.
- [69] Lin, J. Y. and Fisher, D. E. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 7130, 843–850.
- [70] Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L., and Mittler, R. S. 1996. Intracellular Trafficking of CTLA-4 and Focal Localization Towards Sites of TCR Engagement. *Immunity* 4, 6, 535–543.
- [71] Liu, B. L., Robinson, M., Han, Z.-Q., Branston, R. H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S. K., Thornton, M., Bullock, P., Love, C. A., and Coffin, R. S. 2003. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene therapy* 10, 4, 292–303.
- [72] Liu, Y. and Sheikh, M. S. 2014. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Molecular and cellular pharmacology* 6, 3, 228.
- [73] Loo, Y.-M. and Gale, M. 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 5, 680–692.
- [74] Lorence, R. M., Roberts, M. S., O'Neil, J. D., Groene, W. S., Miller, J. A., Mueller, S. N., and Bamat, M. K. 2007. Phase 1 clinical experience using intravenous administration of PV701, an oncolytic Newcastle disease virus. *Current cancer drug targets* 7, 2, 157–167.
- [75] Lui, P., Cashin, R., Machado, M., Hemels, M., Corey-Lisle, P. K., and Einarson, T. R. 2007. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer treatment reviews* 33, 8, 665–680.
- [76] Mandai, M. 2016. PD-1/PD-L1 blockage in cancer treatment—from basic research to clinical application. *International journal of clinical oncology* 21, 3, 447.
- [77] Mandalà, M., Merelli, B., and Massi, D. 2016. PD-L1 in melanoma: facts and myths.

- Melanoma Management* 3, 3, 187–194.
- [78] McCoy, K. D. and Le Gros, G. 1999. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology* 77, 1, 1–10.
- [79] Melzer, M. K., Lopez-Martinez, A., and Altomonte, J. 2017. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus as a Viro-Immunotherapy: Defeating Cancer with a "Hammer" and "Anvil". *Biomedicines*, 1.
- [80] Mo, X., Zhang, H., Preston, S., Martin, K., Zhou, B., Vadalía, N., Gamero, A. M., Soboloff, J., Tempera, I., and Zaidi, M. R. 2018. Interferon- γ Signaling in Melanocytes and Melanoma Cells Regulates Expression of CTLA-4. *Cancer research* 78, 2, 436–450.
- [81] Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H. 2010. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [82] Neumann, U., Siegmann, O., and Behr, K.-P. 2011. *Kompendium der Geflügelkrankheiten. Unter Mitarbeit führender Spezialisten aus Lehre, Praxis und Forschung*. Vet. Schlütersche, Hannover.
- [83] Papaioannou, N. E., Beniata, O. V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O., and Samara, P. 2016. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of translational medicine* 4, 14, 261.
- [84] Pardoll, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* 12, 4, 252–264.
- [85] 2015. Pharmacogenomic agreement between two cancer cell line data sets. *Nature* 528, 7580, 84–87.
- [86] Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S. S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerd, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., Akira, S., Meyers, R., Häcker, G., Neuenhahn, M., Busch, D., Ruland, J., Rothenfusser, S., Prinz, M., Hornung, V., Endres, S., Tüting, T., and Hartmann, G. 2008. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nature medicine* 14, 11, 1256–1263.
- [87] Postow, M. A., Chesney, J., Pavlick, A. C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., Linette, G. P., Meyer, N., Giguere, J. K., Agarwala, S. S., Shaheen, M., Ernstoff, M. S.,

- Minor, D., Salama, A. K., Taylor, M., Ott, P. A., Rollin, L. M., Horak, C., Gagnier, P., Wolchok, J. D., and Hodi, F. S. 2015. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *The New England journal of medicine* 372, 21, 2006–2017.
- [88] Puzanov, I., Milhem, M. M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K. S., Anderson, A., Chou, J., Kaufman, H. L., and Andtbacka, R. H. I. 2016. Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 22, 2619–2626.
- [89] Raja, J., Ludwig, J. M., Gettinger, S. N., Schalper, K. A., and Kim, H. S. 2018. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *Journal for immunotherapy of cancer* 6, 1, 140.
- [90] Rehman, H., Silk, A. W., Kane, M. P., and Kaufman, H. L. 2016. Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy. *Journal for immunotherapy of cancer* 4, 53.
- [91] Reichard, K. W., Lorence, R. M., Cascino, C. J., Peeples, M. E., Walter, R. J., Fernando, M. B., Reyes, H. M., and Greager, J. A. 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *Journal of Surgical Research* 52, 5, 448–453.
- [92] Rhodes, A. R., Weinstock, M. A., Fitzpatrick, T. B., Mihm, M. C., and Sober, A. J. 1987. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. *JAMA* 258, 21, 3146–3154.
- [93] Russell, S. J. and Peng, K.-W. 2007. Viruses as anticancer drugs. *Trends in pharmacological sciences* 28, 7, 326–333.
- [94] Russell, S. J., Peng, K.-W., and Bell, J. C. 2012. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology* 30, 7, 658–670.
- [95] Ruzicka, M., Koenig, L. M., Formisano, S., Boehmer, D. F. R., Vick, B., Heuer, E.-M., Meinl, H., Kocheise, L., Zeitlhöfler, M., Ahlfeld, J., Kobold, S., Endres, S., Subklewe, M., Duester, P., Schnurr, M., Jeremias, I., Lichtenegger, F. S., and Rothenfusser, S. 2019. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia*.
- [96] Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pasdar, A., and Sahebkar, A. 2019. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer

- immunotherapy. *Journal of cellular physiology* 234, 10, 16824–16837.
- [97] Scheid, A. and Choppin, P. W. 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57, 2, 475–490.
- [98] Schirmacher, V. 2005. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection: improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 54, 6, 587–598.
- [99] Sergel, T. A., McGinnes, L. W., and Morrison, T. G. 2000. A single amino acid change in the Newcastle disease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion. *Journal of virology* 74, 11, 5101–5107.
- [100] Shen, Y. and Nemunaitis, J. 2006. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer gene therapy* 13, 11, 975–992.
- [101] Soliman, H., Khalil, F., and Antonia, S. 2014. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PloS one* 9, 2, e88557.
- [102] Stewart, B. W., Ed. 2014. *World Cancer Report 2014*. IARC Press, Lyon.
- [103] Stojdl, D. F., Abraham, N., Knowles, S., Marius, R., Brasey, A., Lichty, B. D., Brown, E. G., Sonenberg, N., and Bell, J. C. 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *Journal of virology* 74, 20, 9580–9585.
- [104] Stojdl, D. F., Lichty, B., Knowles, S., Marius, R., Atkins, H., Sonenberg, N., and Bell, J. C. 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature medicine* 6, 7, 821–825.
- [105] Suzuki, S., Ishida, T., Yoshikawa, K., and Ueda, R. 2016. Current status of immunotherapy. *Japanese journal of clinical oncology* 46, 3, 191–203.
- [106] Tarhini, A. 2013. Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica* 2013, 857519.
- [107] van den Pol, A. N., Dalton, K. P., and Rose, J. K. 2002. Relative neurotropism of a

- recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *Journal of virology* 76, 3, 1309–1327.
- [108] *Viral Therapy in Treating Patient With Refractory Liver Cancer or Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01628640>. Accessed 18 February 2020.
- [109] Weber, J. S. 2008. Tumor evasion may occur via expression of regulatory molecules: a case for CTLA-4 in melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 128, 12, 2750–2752.
- [110] Weinstock, M. A., Colditz, G. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Bronstein, B. R., Mihm, M. C., and Speizer, F. E. 1989. Nonfamilial cutaneous melanoma incidence in women associated with sun exposure before 20 years of age. *Pediatrics* 84, 2, 199–204.
- [111] Wu, L., Huang, T.-g., Meseck, M., Altomonte, J., Ebert, O., Shinozaki, K., García-Sastre, A., Fallon, J., Mandeli, J., and Woo, S. L. C. 2008. rVSV(M Delta 51)-M3 is an effective and safe oncolytic virus for cancer therapy. *Human gene therapy* 19, 6, 635–647.
- [112] Wu, Y., Wu, X., Wu, L., Wang, X., and Liu, Z. 2017. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 190, 51–60.
- [113] Yu, W. and Fang, H. 2007. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Current cancer drug targets* 7, 2, 141–148.
- [114] Zamarin, D., Holmgaard, R. B., Subudhi, S. K., Park, J. S., Mansour, M., Palese, P., Merghoub, T., Wolchok, J. D., and Allison, J. P. 2014. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Science translational medicine* 6, 226, 226ra32.
- [115] Zamarin, D. and Palese, P. 2012. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future microbiology* 7, 3, 347–367.
- [116] Zhang, K.-x., Matsui, Y., Hadaschik, B. A., Lee, C., Jia, W., Bell, J. C., Fazli, L., So, A. I., and Rennie, P. S. 2010. Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death. *International journal of cancer* 127, 4, 830–838.

VII. DANKSAGUNG

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Jennifer Altomonte für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin II am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität planen und angefertigt haben zu können. Sie war zu jeder Zeit eine sehr freundliche, außerordentlich hilfsbereite und fachlich äußerst kompetente Betreuerin. Ihr entgegengebrachtes Vertrauen und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Uni.-Prof. Dr. W. Thomas Göbel danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU. Er stand jederzeit für Rückfragen zur Verfügung und ermöglichte so eine gute Zusammenarbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch Teresa Krabbe, die mich hervorragend in die Laborarbeit eingearbeitet hat. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir sowohl fachlich als auch persönlich immer mit Rat und Tat zur Seite stand und stets geduldig meine Fragen beantwortet und mich bei auftretenden Problemen hilfreich unterstützt hat.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jennifer Altomonte bedanken. Unser angenehmes Arbeitsklima und unsere gegenseitige Unterstützung sowohl in fachlichen als auch in persönlichen Anliegen machte die Arbeit im Labor einzigartig und schön.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Moritz Stärz. Seine Liebe, sein Vertrauen und seine Unterstützung geben mir in allen Lebenssituationen sehr viel Kraft.

Zuletzt möchte ich mich inständig bei meiner gesamten Familie bedanken. Ich danke herzlichst meinem Bruder, mit dem mich so viel verbindet, dem ich alles anvertrauen kann und der immer ein offenes Ohr für mich hat. Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern Evelyn und Volker Marek, die immer an mich glauben, mich bei allem unterstützen und mir Rückhalt geben. Sie haben mir ermöglicht, dahin zu kommen, wo ich jetzt bin.