

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung der verbesserten menschlichen Immunreaktionen durch GM-CSF-
kodierende HSV-1 induzierte Melanomzelllysate

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Veronika Elisabeth Böswald
aus Erlangen

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachterin:

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Das maligne Melanom.....	2
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	2
2.1.2 Pathologie und Klassifikation	3
2.1.3 Aktuelle leitliniengerechte Therapie des malignen Melanoms	4
2.2 Herpesviren	5
2.2.1 Taxonomie.....	5
2.2.2 Virion und Genom	7
2.2.3 HSV-1.....	8
2.2.4 Infektion und Replikation von HSV-1.....	9
2.3 Das menschliche Immunsystem.....	11
2.3.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem.....	11
2.3.2 Dendritische Zellen.....	13
2.3.3 Zytotoxische T-Lymphozyten und ihre Bedeutung in der Tumorabwehr	16
2.3.4 Das immunstimulatorische Zytokin GM-CSF	18
2.3.5 Tumor-Immun-Escape-Mechanismen	19
2.4 Onkolytische Viren.....	21
2.4.1 Historie	21
2.4.2 Wirkmechanismus von onkolytischen Viren	22
2.4.3 Der Effekt onkolytischer Viren auf das Immunsystem.....	24
2.4.4 Onkolytische Viren in der Krebstherapie	26
2.4.5 Das genetisch modifizierte HSV-1 Virus Talimogen Laherparepvec....	28
3 Material.....	31

3.1	Lösungsmittel und Chemikalien.....	31
3.1.1	Lösungsmittel p.a.	31
3.1.2	Chemikalien.....	31
3.2	Zytokine und Zytostatika.....	32
3.2.1	Zytokine.....	32
3.2.2	Zytostatika.....	33
3.3	Antikörper.....	33
3.3.1	Primärantikörper.....	33
3.3.2	Sekundärantikörper.....	34
3.4	Zelllinien und Viren.....	34
3.4.1	Zelllinien.....	34
3.4.2	Viren.....	35
3.5	Medien, Puffer und Lösungen.....	35
3.5.1	Medien für Zellkultur.....	35
3.5.2	Puffer und Lösungen.....	36
3.6	Verbrauchsmaterialien.....	37
3.7	Geräte.....	38
4	Methoden.....	39
4.1	Zellbiologische Methoden.....	39
4.1.1	Kultivierung von Zellen.....	39
4.1.2	Passagieren adhärenter Zellen.....	40
4.1.3	Kryokonservierung von Zellen.....	40
4.1.4	Auftauen von Zellen.....	41
4.1.5	Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung.....	41
4.1.6	Separation peripherer mononukleärer Zellen aus humanem Blut.....	41
4.1.7	Adhärenzisolierung von Monozyten.....	43
4.1.8	Ausreifung dendritischer Zellen aus Monozyten.....	43
4.1.9	Magnetassoziierte Zellseparation (MACS).....	43

4.1.10	Kokultur	45
4.2	Virologische Methoden	46
4.2.1	Infektion adhärenter Zellen.....	46
4.3	Immunologische Methoden	48
4.3.1	FACS-Analyse.....	48
4.3.2	Quantitative Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Analyse der Ausreifung dendritischer Zellen nach Kokultur mit HSV-1 induzierten Tumorzelllysaten und Zytostatikabehandlung	53
5.1.1	Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86	53
5.1.2	Produktion proinflammatorischer Zytokine	57
5.2	Analyse der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen nach Kokultur mit HSV-1 induzierten Tumorzelllysaten und iDCs und Zytostatikabehandlung.....	63
5.2.1	Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD69.....	63
5.2.2	Produktion proinflammatorischer Zytokine	66
6	Diskussion	68
6.1	Immunaktivierung durch Infektion der Melanomzellen mit HSV-1-Derivaten	69
6.1.1	DC-Ausreifung.....	69
6.1.2	T-Zell-Aktivierung	72
6.2	Einfluss des GM-CSFs im Genom des T-VECs auf die Immunantwort.....	75
6.3	Beurteilung des Immuneffekts der Kombination von onkolytischen Herpesviren mit Zytostatika	77
6.3.1	Vincristin.....	79
6.3.2	Cisplatin.....	81
6.3.3	Doxorubicin	83
6.4	Klinische Bedeutung der Ergebnisse und Schlussfolgerung	84
7	Zusammenfassung	86
8	Literaturverzeichnis	88

Danksagung.....	XII
Lebenslauf	XIII

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5FU	5-Fluorouracil
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BCNU	Bischlorethylnitrosourea
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CCNU	Chlorethylcyclohexylnitrosourea
CD	Unterscheidungsgruppen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDC	Konventionelle dendritische Zelle (<i>conventional dendritic cell</i>)
Cis	Cisplatin
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4</i>
DAMP	<i>Danger-associated Molecular Pattern</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxorubicin
ds	Doppelstrang

E	Früh (<i>early</i>)
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym gekoppelter Immunoassay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
<i>et al.</i>	Et alii
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein
FOXP3	Forkhead box P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Gy	Gray
H-1PV	Parvovirus H1
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCF	Wirtszellfaktor (<i>host cell factor</i>)
HCl	Salzsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HMGB1	High Mobility Group Box 1 Protein
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSP	Hitzeschockprotein (<i>heat-shock-protein</i>)
HSV	Herpes simplex Virus
i.v.	Intravenös

ICI	Immuncheckpointinhibitor
ICOS	Induzierbarer T-Zell-Kostimulator (<i>inducible T-cell costimulator</i>)
ICOS-L	Induzierbarer T-Zell-Kostimulator Ligand
ICP	<i>Infected Cell Protein</i>
iDC	Unreife dendritische Zelle (<i>immature dendritic cell</i>)
IE	Unmittelbar früh (<i>immediate early</i>)
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Interne Wiederholung (<i>internal repeat</i>)
JAK	Januskinase
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Spät (<i>late</i>)
MACS	Magnetassoziierte Zellseparation (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
mDC	Reife dendritische Zelle (<i>mature dendritic cell</i>)
MDSC	Myeloide Suppressorzelle (<i>myeloid-derived suppressor cell</i>)
mg	Milligramm
mGM-CSF	Muriner Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
miRNA	Mikroribonukleinsäure
ml	Milliliter
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiciply of infection</i>)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogencarbonat
NaCl	Natriumchlorid

NDV	Newcastle Disease Virus
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OV	Onkolytisches Virus
p.a.	Pro analysi
p.o.	Per os
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle <i>(peripheral blood mononuclear cell)</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PD1	Programmed cell death Protein 1
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PDL1	Programmed cell death 1 Ligand
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaue bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
pg	Pikogramm
PGE	Prostaglandin E
PKR	Proteinkinase R
PRR	Pathogen Recognition Rezeptor
R	Wiederholung (<i>repeat</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T-VEC	Talimogen Laherparepvec

TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TME	Tumormikroumgebung (<i>tumor microenvironment</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Terminale Wiederholung (<i>terminal repeat</i>)
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
U	Einzig (<i>unique</i>)
UV	Ultraviolett
VEGF	Vasoendothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VHS	<i>Virion Host Shutoff</i>
Vin	Vincristin
VP	Virales Protein
vs.	Versus
VZV	Varizella Zoster Virus
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Herpesvirions.....	7
Abbildung 2: Replikationszyklus von HSV-1	10
Abbildung 3: Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen.....	16
Abbildung 4: Tumorummunabwehr	18
Abbildung 5: Wirkmechanismus von onkolytischen Viren.....	24
Abbildung 6: Genetische Modifikationen von JS1 zu T-VEC	31
Abbildung 7: Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	42
Abbildung 8: Prinzip der magnetassoziierten Zellsortierung.....	45
Abbildung 9: Humanes Melanommodell	46
Abbildung 10: Aufbau des FACS	49
Abbildung 11: Prinzip des Sandwich ELISAs.....	52
Abbildung 12: CD80/86-Expressionsanalyse.....	55
Abbildung 13: CD86/83-Expressionsanalyse.....	57
Abbildung 14: IL-6-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1	58
Abbildung 15: IL-6-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22.....	59
Abbildung 16: GM-CSF-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1	60
Abbildung 17: GM-CSF-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22.....	61
Abbildung 18: TNF- α -Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1	62
Abbildung 19: TNF- α -Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22.....	62
Abbildung 20: CD4/CD69-Expressionsanalyse	64
Abbildung 21: CD8/CD69-Expressionsanalyse	66
Abbildung 22: Vergleich der CD4- und CD8- Aktivierung nach Kokultur mit Melanomzelllysaten und iDCs	66
Abbildung 23: IL-2-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1	67
Abbildung 24: IL-2-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22.....	68

Tabelle 1: Gängige Schemata der Polychemotherapie bei malignem Melanom	5
Tabelle 2: Einteilung der humanpathogenen Herpesviren.....	6
Tabelle 3: Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten Zytokine.....	13

1 Einleitung

Maligne Erkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache weltweit dar und es wird erwartet, dass sie in den nächsten Jahrzehnten die Herz-Kreislauf-Erkrankungen als führende Todesursache ablösen (1). Obwohl die verfügbaren Therapieschemata das Überleben der Patienten verlängern können, ist Heilung in vielen Fällen nicht möglich (2) und besonders Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium haben weiterhin oft eine infauste Prognose (1). Deshalb ist ihre Behandlung Gegenstand vieler Forschungen und auch Inhalt dieser Arbeit.

Im vergangenen Jahrzehnt ist die Behandlung von Tumoren mithilfe des patienteneigenen Immunsystems zunehmend in den Fokus gerückt. In dieses Feld der Immuntherapie zählen auch die in dieser Arbeit behandelten onkolytischen Viren. Neben der direkten Tumorzelllyse durch onkolytische Viren wurde der Forschungsschwerpunkt zuletzt auf den Effekt der Virusinfektion auf das Immunsystem und die Tumormikroumgebung gelegt (3). Onkolytische Viren haben die Fähigkeit gezeigt, eine spezifische tumorgerichtete Immunantwort zu induzieren, indem sie unter anderem die Ausreifung von antigenpräsentierenden Zellen unterstützen und T-Zellen aktivieren (4-9).

Das einzige in Europa bisher zugelassene onkolytische Virus ist das modifizierte Herpes simplex Virus Talimogen Laherparepvec (T-VEC) (10, 11). In sein Genom wurde eine für das immunstimulatorische Zytokin GM-CSF kodierende Sequenz inseriert, wodurch die Immuneffekte verbessert werden sollen (12). Ein gutes Sicherheitsprofil sowie ein erhöhtes Therapieansprechen mit Lebenszeitverlängerung bei Melanompatienten führten zu seiner Zulassung für diese Indikation (13, 14). Der Wirkmechanismus, insbesondere die Immuneffekte von T-VEC wurden bisher jedoch unzureichend *in vitro* untersucht.

In dieser Arbeit soll deshalb zunächst der immunstimulatorische Effekt von T-VEC in einem *In-vitro*-Melanommodell untersucht werden. Durch Kokulturversuche wird die Ausreifung von humanen dendritischen Zellen, die Aktivierung von T-Lymphozyten und eine potentiell vermehrte Zytokinsekretion nach Virusinfektion der Tumorzellen untersucht. T-VEC wird dabei mit dem ihm bis auf die GM-CSF kodierende Gensequenz gleichen JS1 verglichen, um einen möglichen verbesserten immunstimulatorischen Effekt durch die Modifikation aufzuzeigen.

Die Behandlung von Krebserkrankungen ist in der Regel eine Kombinationsbehandlung. Man verspricht sich ein erhöhtes Therapieansprechen durch Kombination verschiedener antitumoröser Mechanismen sowie die Reduktion der Einzeldosen der Wirkstoffe, um Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen zu minimieren. Dass onkolytische Viren mit Standardtherapieverfahren sicher sind und eine mindestens additive Kombination ergeben, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (7, 15-21). Allerdings wurde bisher der Schwerpunkt auf die zytotoxischen und weniger auf die immunmodulatorischen Effekte einer solchen Kombination gelegt. Da es wenige präklinische Erkenntnisse zu möglichen Kombinationen von T-VEC gibt und das Virus noch nicht lange klinisch verwendet wird, stellt dies einen zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit dar: Es wird die Kombination der beiden Viren T-VEC und JS1 mit den Chemotherapeutika Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin bezüglich der Immuneffekte im Melanommodell untersucht.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das maligne Melanom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das maligne Melanom ist eine bösartige Neoplasie der Haut und für den Großteil der hautkrebsbedingten Todesfälle verantwortlich (22). Mit einer Inzidenz von 11 150 Fällen bei Frauen (19,9/100 000) und 12 090 (21,0/100 000) bei Männern zählte das maligne Melanom 2016 bei beiden Geschlechtern zu den fünf häufigsten Tumorentitäten (Platz 5 bzw. 4) in Deutschland (23). Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag für Frauen bei 60 Jahren, Männer erkrankten im Durchschnitt acht Jahre später. Die Betrachtung der Erkrankungsraten im Verlauf der letzten 20 Jahre zeigt eine signifikante Zunahme der Melanomerkrankungen in Deutschland (24). Erkrankten noch 1998 etwa 12,5/100 000 Frauen, liegt diese Ziffer seit 2012 relativ konstant bei 19 bis 20, wobei dieser Anstieg zum Teil auf die verbesserte Früherkennung und das 2008 in Deutschland eingeführte Screening zurückzuführen ist.

Anders als die Inzidenzrate blieb die Sterberate in den vergangenen Jahren relativ konstant. Sie lag 2016 bei 1,5 bzw. 2,7/100 000 (23). Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 93 % bzw. 91 % weist das maligne Melanom eine vergleichsweise niedrige Mortalität auf, was auch darauf zurückzuführen ist, dass etwa zwei Drittel der

Melanome im Stadium I diagnostiziert werden. Liegt in diesem Stadium die Überlebensrate noch bei fast 100 %, fällt sie mit Fortschreiten der Erkrankung auf 15 bis 23 % im Stadium IV ab (23). Dies zeigt den Forschungsbedarf für die Therapie des Melanoms in fortgeschrittenem, metastasiertem Stadium.

Das Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter ab dem 25. Lebensjahr an (25). Zusätzliche konstitutionelle Risikofaktoren sind ein heller Hauttyp und Melanome in der Familie (26). Patienten mit Hauttyp I haben ein doppelt so hohes Risiko, an einem Melanom zu erkranken wie Patienten mit Hauttyp IV (26). Zu den konstitutionellen Risikofaktoren kommen im Laufe des Lebens erworbene Faktoren hinzu. Als wichtige exogene Risikofaktoren gelten eine hohe intermittierende UV-Licht-Exposition und Sonnenbrände in der frühen Kindheit (27). Diese UV-Exposition resultiert in einer erhöhten Anzahl erworbener Nävi, welche als eigener Faktor das Melanomrisiko erhöhen (28). Darüber hinaus steigern Melanome in der Vorgeschichte (26) und klinisch atypische, dysplastische Pigmentmale (29) das Risiko einer Erkrankung signifikant.

2.1.2 Pathologie und Klassifikation

Das maligne Melanom entsteht als epidermaler Tumor durch maligne Transformation der pigmentbildenden Melanozyten des Stratum basale der Epidermis. UV-Licht induziert in den Melanozyten DNA-Schäden, welche bei intakten DNA-Reparaturmechanismen korrigiert werden können. Sind diese Mechanismen defekt bzw. fehlerhaft, kommt es zur Melanomentwicklung. Zusätzlich fördert UV-Licht die Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies, welche oxidative DNA-Schäden bewirken und so die Entstehung eines malignen Melanoms unterstützen (22). Das Melanom gilt als ein in der Regel hoch immunogener Tumor (30).

Histopathologisch wird das Melanom anhand der TNM-Kriterien des American Joint Committee on Cancer (AJCC) eingeteilt, welche die anatomische Ausbreitung des Tumors beschreiben. T beschreibt die lokale Ausbreitung des Primärtumors anhand seiner Dicke nach Breslow und dem Vorhandensein von Ulzerationen (31, 32). Es werden die invasiven Stadien T1 bis T4 unterschieden. Hat der Tumor die Basalmembran noch nicht durchbrochen, spricht man von Tis. N0 bis N3 beschreiben den Befall der Lymphknoten und M das Vorhandensein (M1) oder Fehlen (M0) von Fernmetastasen (31, 32). Die 8. Fassung der AJCC definiert anhand der TNM-Kriterien

die vier Tumorstadien I bis IV, welche prognostische Relevanz haben und anhand derer über das therapeutische Vorgehen entschieden wird (32).

2.1.3 Aktuelle leitliniengerechte Therapie des malignen Melanoms

Die Therapie des malignen Melanoms erfolgt stadienabhängig und besteht aus den Säulen der Chirurgie, der Strahlentherapie, der Kombinationschemotherapie und der Immuntherapie. Bei Verdacht auf ein Melanom erfolgen primär eine komplette Exzision mit Sicherheitsabstand und die histologische Untersuchung. Die tumorrestfreie Exzision ist die einzige kurative Therapie des malignen Melanoms und in frühen Stadien ausreichend (32). Auch in fortgeschrittenen Stadien ist sie die erste Wahl, im Folgenden wird jedoch nicht weiter auf die chirurgische Therapie eingegangen.

Liegen nach der Operation ein makroskopischer oder mikroskopischer Tumorrest bzw. Inoperabilität oder Metastasierung vor, werden zusätzliche Therapieoptionen relevant. Patienten im Stadium IIB/C, entsprechend einem lokal fortgeschrittenem Tumor ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasierung, sollte eine adjuvante Interferontherapie angeboten werden (32). Studien zeigten eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens (33).

Bei lokoregionaler Lymphknotenmetastasierung (AJCC IIIA-D) sollte eine individuelle Therapie mit kurativer Intention gewählt werden. Zusätzlich zur therapeutischen Lymphadenektomie und der Bestrahlung des Lymphabflussgebiets mit 50 bis 60 Gy sollte eine medikamentöse adjuvante Therapie erfolgen. Hierzu werden Immuncheckpointinhibitoren (ICI) wie Anti-PD1-Antikörper oder bei entsprechendem Mutationsnachweis BRAF- und MEK-Inhibitoren empfohlen (32). Bei Patienten im Stadium III bis IV haben Anti-PD-1-Antikörper eine signifikante Verlängerung des rezidivfreien Überlebens sowie eine geringere Rate an unerwünschten Nebenwirkungen im Vergleich zu CTLA-4-Inhibitoren gezeigt und sollten deshalb gegenüber diesen bevorzugt werden (34).

Liegen bei einem Patienten Fernmetastasen vor, befindet er sich im Stadium IV nach AJCC und die mediane Überlebenszeit verkürzt sich auf 17 Monate (Stand 2014, (35)). Initial sollte eine komplette operative Metastektomie angestrebt werden, bei Inoperabilität oder nicht möglicher R0-Resektion folgt die palliative Behandlung. Adjuvant bzw. bei nicht resezierbaren Metastasen wird wie im Stadium III eine Immuntherapie mit Anti-PD1-Inhibitoren, sowie BRAF- oder MEK-Inhibitoren empfohlen (32).

Seit 2015 ist das onkolytische Virus Talimogen Laherparepvec (T-VEC) zugelassen für die Stadien IIIB, IIIC und IVM1a (10, 36). Das Virus wird intratumoral appliziert und zeigte in einer randomisiert kontrollierten Studie im Vergleich zu subkutanem GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) ein signifikant erhöhtes Ansprechen und ein klinisch relevant verlängertes Gesamtüberleben (14).

Falls eine Immuntherapie nicht möglich ist, sollte den Patienten eine Chemotherapie angeboten werden (32). Diese besteht aus einer Monotherapie mit Dacarbazin oder einer Polychemotherapie nach verschiedenen Schemata (siehe Tabelle 1) (32). Das Ansprechen auf die Polychemotherapie war in Studien besser als auf die Monotherapie, jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant und beide Therapien führten nicht zu einer Lebenszeitverlängerung (37). Zudem ist eine Chemotherapie mit einer hohen Rate an unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert, sodass der Bedarf an einer neuen, weniger toxischen und dennoch vielversprechenden Therapie für fortgeschrittene Melanome besteht.

Schema	Dosierung
CarboTax	Carboplatin AUC6 i.v., Paclitaxel 225 mg/m ² i.v.
GemTreo	Gemcitabin 1000 mg/m ² i.v., Treosulfan 3500 mg/ m ² i.v.
DVP	DTIC 450 mg/m ² .v., Vindesin 3 mg/m ² i.v., Cisplatin 50 mg/m ² i.v.
BHD	BCNU (Carmustin) 150 mg/m ² i.v., Hydroxyurea 1500 mg/m ² p.o., DTIC 150 mg/m ² i.v.
BOLD	Bleomycin 15 mg i.v., Vincristin 1 mg/m ² i.v., CCNU 80 mg/m ² p.o., DTIC 200 mg/m ² i.v.

Tabelle 1: Gängige Schemata der Polychemotherapie bei malignem Melanom, verändert nach (32)
AU = Area under the curve

2.2 Herpesviren

2.2.1 Taxonomie

Die Gattung der Herpesvirales umfasst drei Gruppen: die *Malacoherpesviridae*, die *Alloherpesviridae* und die *Herpesviridae*, wobei nur letztere in der Lage sind, Säugetiere zu infizieren (38). Es gibt etwa 100 verschiedene Viren in der Familie der *Herpesviridae*, wovon acht primär humanpathogen sind (humane Herpesviren HHV 1-8) (39) und auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Charakteristisch für Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion des Wirts in diesem zu persistieren und im Laufe der Zeit durch Reaktivierung erneut in einen lytischen Zyklus mit produktiver Replikation und Krankheitssymptomen einzutreten (40). Die diversen Viren der Familie unterscheiden sich zum einen durch die von ihnen verursachten

Krankheiten, die von bläschenförmigen Ausschlägen (HSV-1/2, VZV) über Fruchtschäden (CMV) bis hin zu malignen Neoplasien (EBV, HHV8) reichen (40). Zum anderen kann die Familie der Herpesviren anhand ihrer Zellspezifität, ihrer Pathogenität und ihrer Vermehrungseigenschaften in drei Unterfamilien (α , β , γ) eingeteilt werden (41). Die Unterfamilien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Gruppe der α -Herpesviren beinhaltet an humanpathogenen Typen die Herpes simplex Viren (HSV) 1 und 2 sowie das Varizella Zoster Virus (VZV) (40). Sie haben ein breites Wirtsspektrum, replizieren sich in Epithelzellen der Haut und Schleimhaut und wandern nach der Primärinfektion retrograd in neuronale Ganglien. Von dort gelangen sie bei Reaktivierung anterograd entlang der Axone wieder zu ihren Zielzellen. Alphaherpesviren haben einen kurzen Replikationszyklus und vermehren sich somit schnell *in vitro* (39).

Das Cytomegalievirus (CMV), HHV6 und HHV7 bilden die Gruppe der β -Herpesviren, die spezifisch B- und T-Lymphozyten sowie Monozyten befallen und in diesen persistieren (40). Sie weisen eine deutlich langsamere Vermehrung durch einen längeren Replikationszyklus sowie ein engeres Wirtsspektrum auf (39).

In der dritten Gruppe, den γ -Herpesviren, finden sich mit dem Epstein Barr Virus (EBV) und HHV 8 zwei Viren, die bevorzugt lymphoblastische Zellen infizieren und in diesen lebenslang verbleiben (39). Sie sind charakterisiert durch ein sehr schmales Wirtsspektrum und sind mit Krebserkrankungen assoziiert (39, 40).

Unterfamilie	Genus	Humanpathogene Vertreter
α -Herpesviren	Simplexvirus	HHV1 = Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) HHV2 = Herpes simplex Virus 2 (HSV-2)
	Varicellovirus	HHV3 = Varizella Zoster Virus (VZV)
β -Herpesviren	Cytomegalovirus	HHV5 = Humanes Cytomegalievirus (CMV)
	Roseolovirus	HHV6 HHV7
γ -Herpesviren	Lymphocryptovirus	HHV4 = Epstein Barr Virus (EBV)
	Rhadinovirus	HHV8

Tabelle 2: Einteilung der humanpathogenen Herpesviren, verändert nach (41)

2.2.2 Virion und Genom

Die Virionen der Herpesviren sind 100 bis 200 nm groß (40) und haben subgruppenübergreifend einen nahezu identischen Aufbau (42). Sie bestehen aus einem symmetrischen ikosaedrischen Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren, welches das Genom umgibt. Jedes Kapsomer besteht aus jeweils sechs Molekülen des Proteins VP5, welche über Disulfidbrücken mit weiteren Kapsidproteinen verbunden sind (41). Herpesviren besitzen eine Hüllmembran aus einer Lipiddoppelschicht, die Glykoproteine und unglykierte Proteine enthält (42). Sie entsteht durch Exozytose des Virions aus der Wirtszellmembran und ist für die Adsorption an Zellrezeptoren (41), sowie das Eindringen des Virus in die Zelle von Bedeutung (42). Der amorphe Raum zwischen Kapsid und Hülle wird als Tegument bezeichnet. Es besteht aus 26 Proteinen, welche an Transportaufgaben (UL36, UL37, ICP0), am DNA-Eintritt in den Zellkern (VP1-2, UL36), an der Degradierung der mRNA (VHS, UL41) (42) und an der Replikationsinitiation (VP16) (40) beteiligt sind. Der Aufbau des Herpesvirions ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Das Herpesvirusgenom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA mit einer Länge von 125 000 bis 230 000 Basenpaaren (39). Alle Virustypen verfügen über sich wiederholende (*repeat*) Sequenzabschnitte sowie einmalige (*unique*) Abschnitte, deren Anordnung bei den verschiedenen Virustypen variiert (41). Während der Latenzphase des Virus in seiner Wirtszelle liegt die DNA zirkulär und an Histone gebunden vor (43). Bei Eintritt in die lytische Replikation wird diese chromatinartige Struktur gelockert, die DNA liegt linear vor und kann durch die virale Polymerase transkribiert werden (40).

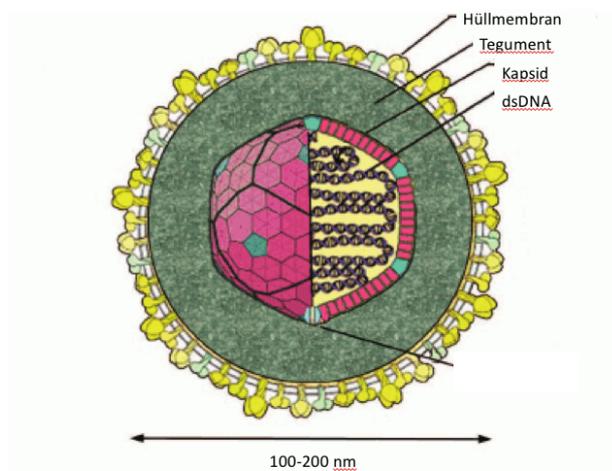


Abbildung 1: Aufbau des Herpesvirions, verändert nach (42)

Das Virion hat einen Durchmesser von 100 bis 200 nm und besteht von innen nach außen aus der dsDNA, dem Kapsid, dem Tegument und der Hüllmembran.

2.2.3 HSV-1

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden aus dem Herpes simplex Virus 1 modifiziert. HSV-1 befällt die Epithelzellen der Haut und Schleimhaut und verursacht typischerweise den Lippenherpes, eine bläschenförmige, schmerzhaft Dermatitis (40). Auch Enzephalitiden und Keratitiden können infolge einer HSV-1-Infektion auftreten. Das Virus persistiert in Nervenzellen, bevorzugt dem Trigeminalganglion (41), von wo aus es in unregelmäßigen Abständen zur Reaktivierung kommt und die Erkrankung wiederholt symptomatisch wird (40). Als Trigger für eine solche Reaktivierung gelten unter anderem Stress, UV-Licht, Fieber sowie hormonelle Einflüsse (44). Ausgeschieden wird das Virus über den infektiösen Bläscheninhalt, über Speichel und andere Körperflüssigkeiten und wird bei Kontakt auf Gesunde übertragen (45). Weltweit sind etwa 90 % der Erwachsenen lebenslang mit dem Virus infiziert (46), wobei die Primärinfektion meist inapparent im Kindesalter erfolgt (41).

Das HSV-1-Genom ist 152 000 Basenpaare lang und in ein langes (L) und ein kurzes (S) Segment unterteilt, welche kovalent verbunden sind (45). Jedes Segment enthält einen *unique* Anteil (U_L/ U_S), der von *repeat* Sequenzen flankiert wird (R). Die R-Sequenzen werden entweder als *internal repeat* (IR) oder als *terminal repeat* (TR) bezeichnet, je nachdem ob sie am Genomende oder -zentrum mit der U-Sequenz verbunden sind (41). Das Genom besteht somit aus einer sich wiederholenden Abfolge von Sequenzen, die nach dem folgenden Muster angeordnet sind:

$TR_L\text{-----} U_L\text{-----} IR_L IR_S \text{-----} U_S\text{-----} TR_S$

Durch verschiedene Orientierung der U-Sequenzen zueinander und Rekombination der invertierten R-Sequenzen können vier verschiedene Isomere entstehen, die sich in ihrer Viruleszenz und Replikationspotenz nicht unterscheiden (47).

Es wurden drei Stellen im Genom identifiziert, an denen die Replikation während des lytischen Zyklus startet: die *oriL* im Zentrum der U_L -Sequenz und zwei *oriS* an den beiden Enden der U_S -Sequenz (41).

Die Hüllmembran von HSV-1 enthält elf Glykoproteine (gB bis gL), gegen die als Folge der Infektion spezifische Antikörper vom Wirtsimmunsystem gebildet werden (41) und von denen vier (gD, gH, gL, gB) am Eintritt von HSV-1 in die Wirtszelle beteiligt sind (45).

2.2.4 Infektion und Replikation von HSV-1

Der virale Replikationszyklus besteht aus den aufeinanderfolgenden Prozessen der Adsorption, der Penetration, der Freisetzung der viralen Nukleinsäure (*Uncoating*), der Replikation, der Morphogenese und der Freisetzung der infektiösen Partikel (41, S.23-27). Er ist in Abbildung 2 dargestellt. Ein Zyklus dauert bei HSV-1 etwa 18 bis 20 Stunden (42). Im Fall von HSV-1 müssen zwei Zyklen unterschieden werden: der lytische und der latente. Die Transkription und Replikation der viralen DNA, die Synthese von viralen Proteinen und das Zusammensetzen des Kapsids finden im Wirtszellkern statt (42).

HSV-1 bindet über seine Glykoproteine gC und gB an Glykosaminoglykane auf der Oberfläche seiner Zielzellen (48). Als Hauptzielmolekül für die HSV-1-Adsorption wurde Heparansulfat identifiziert. Für die Penetration des Nukleokapsids werden gB, gD, gH und gL benötigt. Durch die Interaktion des Viruspartikels mit den zellulären Strukturen kommt es zur Fusion der Hüllmembran mit der Zellmembran und das Nukleokapsid gelangt ins Zellinnere (48). Das nun unbehüllte Kapsid wird im Zytoplasma durch Interaktion mit Mikrotubuli zum Zellkern transportiert und das virale Genom gelangt durch dessen Poren ins Nukleoplasma (49). Das lineare Genom zirkularisiert und liegt als Episom im Kernplasma vor (41). Dort interagiert das Tegumentprotein VP16 mit dem *host cell factor* (HCF) und dem Bindeprotein Oct-1, sodass ein Aktivorkomplex entsteht (46).

Die Replikation von HSV-1 umfasst drei verschiedene, kaskadenartig nacheinander exprimierte Gengruppen: α , β und γ bzw. *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) (46). Nach der Bildung des Aktivorkomplexes werden zuerst die α -Gene mithilfe der Wirtszell-RNA-Polymerase II transkribiert (42). Zur α -Gruppe zählen ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 und US1.5, deren Genprodukte vorwiegend die Transkription der β -Gene induzieren. Durch die β -Gene kodierte Proteine und Enzyme sind von Bedeutung für den viralen Stoffwechsel, die vermehrte Transkription der γ -Gene und reduzierte Transkription der α -Gene. Zusätzlich kodieren sie Enzyme der viralen DNA-Replikation wie zum Beispiel UL30, das für die HSV-DNA-Polymerase kodiert (42). Im Anschluss an die virale DNA-Synthese im Zellkern werden die γ -Gene exprimiert, welche für Strukturproteine des Kapsids und des Teguments kodieren (46). Die replizierte DNA wird im Zellkern verpackt und das virale Kapsid zusammengesetzt (50). Durch das *Budding* des Kapsids durch die innere und äußere Kernmembran via

Membranfusion wird dieses aus dem Zellkern hinaus ins Zytosol transportiert, wo die Reifung der äußeren Form stattfindet. Das Kapsid bindet an die Membran der Golgivesikel, wodurch das Tegument und die reife Hüllmembran entstehen. Der letzte Schritt des Replikationszyklus ist die Exozytose des neuen, behüllten Virions mittels Fusion der Vesikelmembran mit der Zytoplasmamembran (50). Meist endet der lytische Zyklus wegen der Übernahme der Proteinsynthesemechanismen durch das Virus mit dem Zelltod der Wirtszelle (40).

Im Anschluss an den lytischen Zyklus gelangen die Virionen über Zell-Zell-Kontakte der infizierten Epithelzellen mit freien Nervenendigungen und retrograden axonalen Transport in ein Ganglion, wo sie in den latenten Zyklus eingehen (41). Das Genom wird zirkularisiert und mit Histonen in eine chromatinartigen Form verpackt (43). Zudem nutzt das Virus die epigenetischen Mechanismen der Wirtszelle, um seine Gene durch Methylierung zu *silencen* und so die Proteinsynthese auf ein Minimum zu reduzieren. Im Ganglion ist die Expression der α -Gene wegen des in Neuronen gebildeten Repressors Oct-2 nicht möglich, weshalb die Initiierung der DNA-Replikation nicht erfolgt (41). Während der Latenz werden nur miRNAs gebildet, die zum Latenzerhalt beitragen (41). Das virale Genom wird in der Latenz nicht-replikativ und nicht-pathogen erhalten und kann im Falle einer Reaktivierung in den lytischen Zyklus übergehen (45).

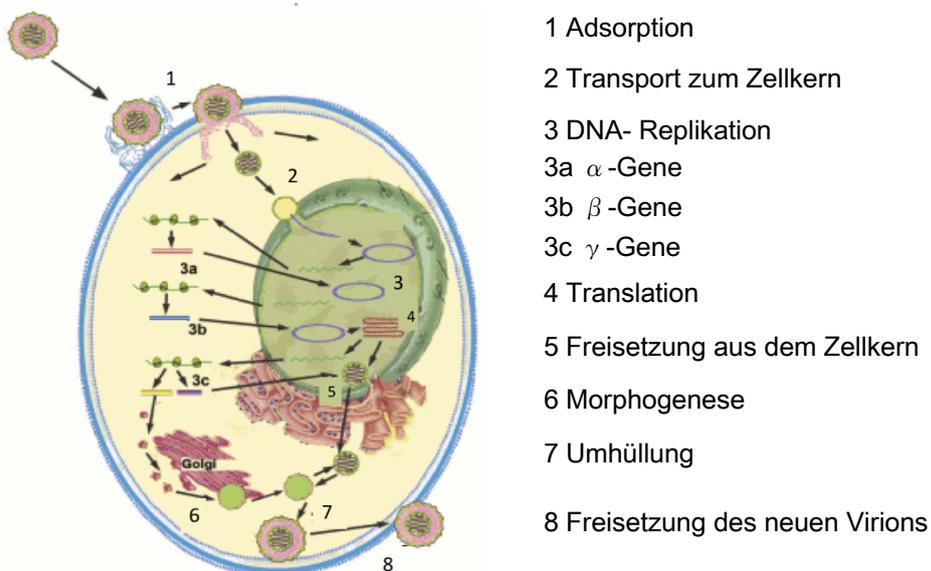


Abbildung 2: Replikationszyklus von HSV-1, verändert nach (42)

Auf die Adsorption des Virions an der Wirtszelle und der Membranfusion (1) folgt der Transport zum Zellkern (2), wo die virale DNA repliziert wird (3). Nacheinander werden α -, β - und γ -Gene transkribiert und es folgt die Translation (4). Nach Transport ins Zytosol werden die neuen Partikel zusammengesetzt (6) und ein neues Virion entsteht. Im letzten Schritt erhält es eine neue Hülle (7), bevor es freigesetzt wird (8).

2.3 Das menschliche Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System, das nur in einem für diese Arbeit relevanten Umfang beschrieben werden kann. Seine Aufgabe ist es, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden und als fremd erkannte Zellen zu eliminieren. Es wird unterteilt in ein angeborenes und ein erworbenes System, welche jeweils aus humoralen und zellulären Anteilen bestehen. Die beiden Systeme sind jedoch nicht streng getrennt, sondern interagieren, um eine effektive Immunantwort zu generieren.

2.3.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Anhand der Geschwindigkeit, der Spezifität und der beteiligten Zellen und Faktoren an der Immunantwort lassen sich das angeborene (unspezifische, inerte) und das erworbene (spezifische, adaptive) Immunsystem unterscheiden (51).

Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch eine schnelle, wenn auch unspezifische Reaktion auf Fremdartige aus (51). Es reagiert innerhalb weniger Stunden auf eine Infektion (52, S.5). Seine zellulären Hauptakteure sind Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und Natürliche Killerzellen (NK) (51). Humoral ist in der frühen Phase der Immunantwort vor allem das Komplementsystem von Bedeutung, welches durch eine Reaktionskaskade zur Zellyse und Opsonierung führt (51).

Makrophagen und dendritische Zellen haben die gemeinsamen Fähigkeiten der Phagozytose und Antigenpräsentation (51). Sie internalisieren Fremdartige, prozessieren sie im Proteasom und sind in der Lage, sie auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Die Präsentation extrazellulärer Pathogene erfolgt dabei gebunden an MHC-II-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*), welche von CD4⁺ T-Lymphozyten mit deren T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden werden und als erstes Signal zu deren Aktivierung beitragen (52, S.57) (Näheres siehe 2.3.3). Neben den MHC-II-Molekülen, die sich nur auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen befinden, exprimiert jede kernhaltige Zelle das MHC-I-Molekül. An dieses gebunden werden Bestandteile intrazellulärer Pathogene präsentiert. MHC-I wird von CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt und gebunden. Zellen, die kein MHC exprimieren, werden automatisch als „fremd“ erkannt und von darauf spezialisierten NK-Zellen lysiert (51).

Ein weiterer Mechanismus der schnellen Erkennung und Beseitigung von eindringenden Pathogenen ist der Toll like Rezeptor (TLR), ein Pathogen Recognition Rezeptor (PRR) auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems (53).

Er erkennt und bindet sogenannte *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs), hochkonservierte Moleküle von Pathogenen wie Virus- und Bakterienbestandteile. Ebenso erkannt werden *Danger-associated Molecular Patterns* (DAMPs), die bei Zellschaden und -stress von intra- nach extrazellulär gelangen und dort eine Entzündung induzieren (51). Durch die Bindung des TLR an die PAMPs und DAMPs kommt es zur Zellaktivierung und Zytokinproduktion.

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich im Gegensatz zum angeborenen durch eine langsamere, dafür aber spezifischere und langfristige Reaktion aus (51). Die Etablierung einer adaptiven Immunität geschieht im Zeitraum von Tagen nach der Infektion. Seine zellulären Akteure, die T- und B-Lymphozyten, müssen erst aktiviert werden, bilden dann aber zusätzlich Gedächtniszellen, um Fremdartigene bei einem zweiten Auftreten schneller erkennen und attackieren zu können (52, S.6). Als humorale Komponente sind vor allem lösliche Antikörper relevant, welche von aus B-Lymphozyten differenzierten Plasmazellen gebildet werden (52, S.42).

T-Lymphozyten lassen sich anhand der *Cluster-of-Differentiation*-Moleküle (CD) auf ihrer Oberfläche in CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL) unterscheiden (51). Beide tragen auf ihrer Oberfläche den charakteristischen T-Zell-Rezeptor. Die Rolle der CTLs wird später noch detailliert beschrieben. T_H-Zellen spielen mit ihrer Zytokinproduktion eine Rolle bei der Vermittlung zwischen humoraler und zellulärer adaptiver Immunantwort (54). Es werden die T_{H1}- und die T_{H2}-Antwort unterschieden: T_{H1}-Zellen sind proinflammatorisch und sezernieren IFN- γ und IL-2, wodurch eine Entzündung induziert und die Phagozytose und Antigenpräsentation verstärkt werden. Die T_{H2}-Antwort hingegen führt über die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 zur Aktivierung von B-Lymphozyten mit Antikörperproduktion und zur Differenzierung und Ausreifung von dendritischen Zellen. Ein weiterer Subtyp CD4⁺ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die eine immunsuppressive Funktion haben und hauptsächlich antiinflammatorisches IL-10 und TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) produzieren (54).

Zytokine sind Signalpeptide der interzellulären Kommunikation (51). Sie werden überwiegend von Zellen des Immunsystems gebildet und haben hochspezifische, regulierende Aufgaben in der Immunreaktion (52, S.68f.). Die Art von Zytokinen, die auf einen Stimulus hin sezerniert werden, entscheiden über die Art der darauf folgenden Immunreaktion (55). Es werden fünf Hauptgruppen unterschieden: die Interleukine (IL), die Interferone (IFN), die Chemokine, Tumornekrosefaktor-Liganden

(TNF-Liganden) und Wachstumsfaktoren (52, S.68f.). Für diese Arbeit relevante Zytokine werden in Tabelle 3 zusammengefasst, GM-CSF im Kapitel 2.3.4 detaillierter beschrieben.

Die Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem stellen dendritische Zellen dar, die als antigenpräsentierende Zellen das spezifische Immunsystem aktivieren.

Zytokin	Produzierende Zelle	Effekt	Referenz
IL-2	CTL, T _H	T-Zell-Proliferation↑ CTL-Aktivierung ↑ NK-Aktivierung ↑	(55, 56)
IL-6	Monozyten Makrophagen T-Lymphozyten B-Lymphozyten Endothelzellen	CTL-Aktivierung↑ B-Zell-Differenzierung ↑ Fieber TNF- α -Synthese ↓	(55)
TNF- α	Makrophagen Neutrophile Granulozyten T-Lymphozyten B-Lymphozyten	Inflammation ↑ DC-Maturation ↑ Fieber	(51, 56)
GM-CSF	Makrophagen Aktivierte T-Lymphozyten Endothelzellen	DC-Maturation ↑ Inflammation ↑ Makrophagen-Proliferation ↑ Makrophagen-Aktivierung ↑ APC-Rekrutierung ↑	(56, 57)

Tabelle 3: Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten Zytokine

2.3.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem einen wichtigen Beitrag zum Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Immunabwehr leisten. Sie sind von Bedeutung für die endogene Tumorabwehr und sind für die Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort essenziell.

Sie wurden 1973 zum ersten Mal von Steinman *et al.* in lymphatischen Organen von Mäusen beschrieben und zeichnen sich morphologisch durch dendritenförmige Zytoplasmafortsätze aus (58).

Die Rolle der dendritischen Zellen für den Erhalt der Immunhomöostase zeigten Scheinecker *et al.*, die die kontinuierliche Präsentation von Selbstantigenen durch DCs

an T-Lymphozyten in den Lymphknoten nachwiesen (59). Diese Präsentation in Abwesenheit einer Infektion oder Entzündung induziert eine periphere Immuntoleranz (59, 60). Zusätzlich sind DCs in der Lage, die Apoptose autoreaktiver T-Zellen zu induzieren und T_{reg} zu stimulieren, wodurch die Immuntoleranz weiter verstärkt wird (61).

Es werden verschiedene Subtypen der DCs unterschieden, die sich alle aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen entwickeln (61). Die beiden Hauptgruppen sind die plasmazytoiden DCs (pDC) und die konventionellen DCs (cDCs) (61). pDCs sezernieren überwiegend $IFN-\alpha$ und $-\beta$ zur T_{reg} -Induktion und sind somit eher immunregulierend, während cDCs als antigenpräsentierende Zellen (APCs) in der Aktivierung der T-Zell-Antwort von entscheidender Bedeutung sind (60). Zudem werden unreife (iDC) und reife (mDC) dendritische Zellen unterschieden.

iDCs exprimieren auf ihrer Oberfläche in geringem Ausmaß MHC-II, CD40, CD80 und CD86 (62) und sind primär phagozytisch aktiv (52, S.39). Durch Stimuli im Umfeld reifen sie aus, was durch eine vermehrte Expression der zuvor genannten Moleküle und dem zusätzlichen Nachweis des Reifemarkers CD83 charakterisiert wird (62). Sie reorganisieren ihre Adhäsionsmoleküle, um ihre Migrationsfähigkeit zu erhöhen und sekundär lymphatische Organe zu erreichen (63). Reife dendritische Zellen reduzieren zudem ihre Phagozytoseaktivität und werden verstärkt in der Antigenpräsentation aktiv (64). Außerdem sezernieren mDCs vermehrt $IL-6$, $TNF-\alpha$, $IFN-\alpha$ und $IL-12$ und sind in der Lage, T-Lymphozyten zu aktivieren (62).

Die Erkennung von Antigenen durch APCs führt zu deren Aufnahme, Prozessierung und Präsentation (61). Außerdem ist sie ein Ausreifungssignal für iDCs. Je nach Zytokinen im Umfeld, dem Typ der DC und des Antigens unterscheiden sich drei DC-Immunantworten (65). Für diese Arbeit ist die Typ-1-Immunantwort relevant, welche bei Anwesenheit intrazellulärer Pathogene durch cDCs induziert wird und die mit der Sekretion von $IFN-\gamma$, der T_{H1} -Polarisierung und der Aktivierung von CTLs einhergeht.

Neben der Erkennung und Prozessierung von Antigenen brauchen iDCs ein antigenunabhängiges Dangersignal zur Ausreifung (66). Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche eine hohe Anzahl an TLRs, mithilfe derer sie PAMPS und DAMPS als Dangersignale erkennen (61). Auch untergehende Tumorzellen bieten DCs die nötigen Signale in Form von DAMPs, wodurch eine tumorspezifische Immunantwort induziert

werden kann (67). Die schnelle Erkennung von Pathogenen durch den PRR der DCs und die konsekutive Zytokinproduktion aktiviert Zellen des angeborenen Immunsystems, sodass eine Infektion in Schach gehalten wird, bis die langsamere spezifische Immunantwort induziert wird (65). Die TLR-vermittelte Aktivierung und konsekutive IL-12-Sekretion stimuliert die Entwicklung einer T_{H1} -Antwort und damit eine zelluläre spezifische Immunantwort (53). Zudem können autokrin und parakrin sezernierte Zytokine (IL-1 β , GM-CSF, TNF- α) die iDC-Aktivierung regulieren (63).

mDCs migrieren vom Ort ihrer Ausreifung in regionale Lymphknoten, wo sie auf naive T-Zellen treffen (53). Durch direkte zelluläre Interaktion und die vermehrte Zytokinsekretion sind mDCs in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (51). MHC-Moleküle auf der Oberfläche der mDCs werden von T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen gebunden. MHC-II benötigt als Kostimulus CD4, weshalb die hieran gebunden präsentierten exogenen Antigene nur von T_H -Zellen erkannt werden (51).

Um CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch extrazelluläre Antigene zu aktivieren, bedienen sich dendritische Zellen einem als Kreuzpräsentation bezeichneten Mechanismus (64). CD8 bindet nur MHC-I, jedoch können hieran nur Antigene aus dem Intrazellularraum präsentiert werden. Durch Prozessierung im Proteasom sind DCs in der Lage, exogene Antigene an MHC-I gebunden zu präsentieren und so zytotoxische T-Zellen hiergegen zu aktivieren (52, S.65).

Für die effektive T-Zell-Aktivierung sind neben dem ersten Signal, der MHC-TCR-Interaktion, weitere kostimulatorische Signale nötig. Fehlen diese Signale, wird die T-Zelle anerg und gegenüber dem präsentierten Antigen tolerant. Das zweite Signal erfolgt über CD80/86 auf der Oberfläche der mDCs, welches als Gegenstück CD28 auf der T-Zelle bindet. Hierdurch wird der T-Zelle ein „Überlebenssignal“ gegeben. Zuletzt benötigen T-Zellen noch ein humorales Signal in Form von Zytokinen für ihre Aktivierung. Die drei Signale gemeinsam führen zur Aktivierung der T-Zellen (52, S.62) und sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Aktivierte CD4⁺ T-Zellen können über eine CD40/CD40L-Interaktion ein Überlebenssignal an DCs geben und diese zusätzlich ausreifen (66).

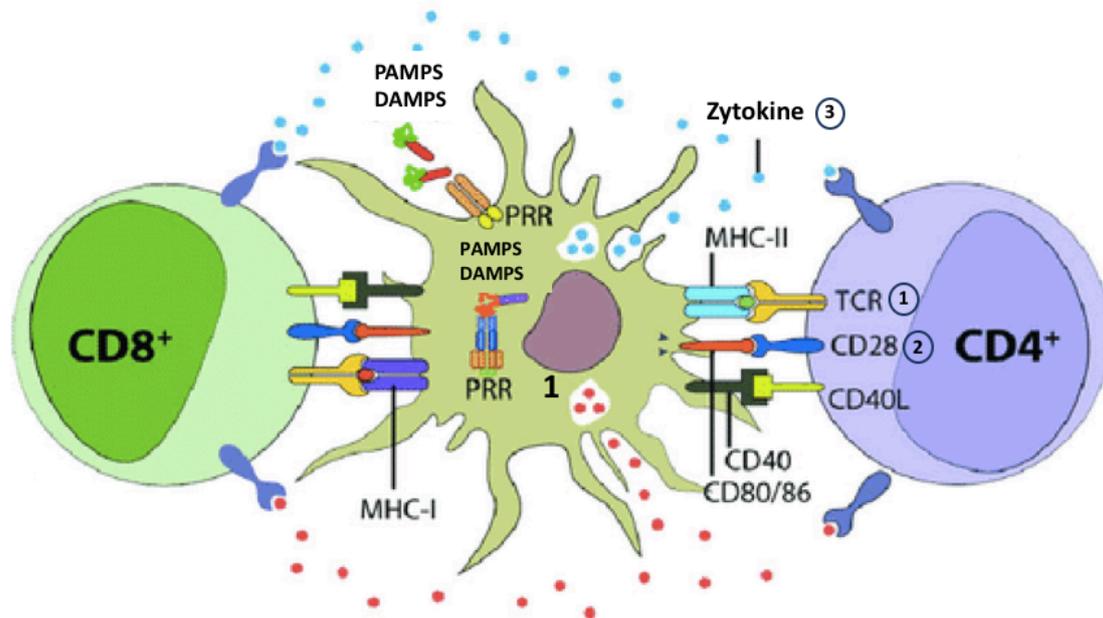


Abbildung 3: Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen, verändert nach (68)

Die dendritische Zelle erkennt mit ihrem PRR PAMPs und DAMPs aus ihrem Umfeld und reift dadurch aus. Für die Aktivierung von T-Zellen sind drei Signale notwendig: 1) Die Bindung vom TCR an MHC, 2) Die Bindung von CD28 an CD80/86, 3) Zytokine im Umfeld der Zellen. Zusätzlich bindet CD40L an CD40.

2.3.3 Zytotoxische T-Lymphozyten und ihre Bedeutung in der Tumorabwehr

Zytotoxische T-Lymphozyten sind die Effektorzellen der Antitumor-Immunantwort. Sie tragen auf ihrer Oberfläche das CD8-Molekül und sind dadurch in der Lage, an MHC-I gebundene Antigenpeptide zu erkennen.

Die Tumorabwehr beginnt, wie in Abbildung 4 zu sehen ist, mit der Freisetzung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) und Dangersignalen durch die Onkogenese und von untergehenden Tumorzellen, wodurch Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden (69). NK-Zellen sind in der Lage, Tumorzellen direkt und ohne vorherige Aktivierung zu lysieren, wohingegen das adaptive Immunsystem zuerst aktiviert werden muss (51). Dies geschieht durch APCs, die TAAs aufnehmen und an MHC-I und -II komplexiert präsentieren (69). Durch die Sekretion von IL-12, TNF- α und Interferonen aus den aktivierten DCs entwickelt sich eine T_{H1}-Antwort, wodurch tumorspezifische CTLs stimuliert werden (3). Für die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen zu CTLs sind die zuvor genannten drei Signale aus MHC-I/TCR-, CD80/86-CD28-Interaktion und ein Zytokinstimulus nötig (52, S.62). In diesem Fall ist IL-2 als T-Zell-Wachstumsfaktor unverzichtbar für die Aktivierung und Proliferation. Es wird von T_{H1}-Zellen sezerniert und die CTLs sind neben der parakrinen Stimulation durch T_{H1} in der Lage, sich durch eigene Produktion autokrin zu stimulieren (66).

Durch die Aktivierung der CTLs werden späte sekundäre kostimulatorische Signale auf ihnen hochreguliert (52, S.62f.). Der Rezeptor ICOS (*inducible T-cell costimulator*) bindet ICOS-L auf der dendritischen Zelle und forciert dadurch die IL-2-Produktion des CTLs, wodurch das Überleben, die Proliferation und die Effektorfunktion verstärkt werden. Ein zweites sekundäres Molekül ist CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4*), welches durch die MHC-TCR-Bindung hochreguliert wird und einen hemmenden Effekt auf den CTL ausführt. Es kompetitiert mit höherer Affinität als CD28 um die Bindung an CD80/86 und ist so in der Lage, die T-Zell-Antwort negativ zu regulieren.

Die aktivierten T-Zellen wandern, angelockt durch Chemokine, zum Tumor und infiltrieren diesen (69). Tumore präsentieren ihre Antigene an MHC-I gebunden auf ihrer Oberfläche. Aktivierte CTLs sind in der Lage, diese Komplexe direkt mit ihrem TCR zu erkennen, zu binden und die Tumorzelle anzugreifen. Die Tumorzelllyse führt zur erneuten Freisetzung von TAAs, wodurch die Immunantwort sich selbst verstärkt (siehe Abbildung 4).

Aktivierte CTLs sezernieren neben IL-2 auch IFN- γ , Perforin und Granzym B (66). IFN- γ hat direkt zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen, führt sekundär zur NK-Aktivierung und induziert die Hochregulation von MHC-Molekülen auf der Tumoroberfläche, wodurch die Lyse verstärkt und der Tumor immunogener wird (52, S.333). IL-2 verstärkt die Antitumoraktivität von NKs durch vermehrte Sekretion von IFN- γ und TNF- α , welche wiederum direkt zytotoxisch sind.

In die Synapse sezerniertes Perforin führt zu erhöhter Zellmembranpermeabilität und Membranperforation, sodass Granzym B ins Zytosol der Zielzelle gelangen kann (70, 71). Granzym B ist eine Serinprotease, die DNA-Doppelstrangbrüche sowohl caspaseabhängig als auch unabhängig induziert und die Tumorzelle damit lysiert (70). Ein weiterer Mechanismus, wie CTLs ihre Zielzelle lysieren, ist die Induktion der Apoptose über den Fas-Ligand (FasL) auf ihrer Oberfläche (71). FasL bindet den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle, wodurch in dieser Caspasen aktiviert werden und daraufhin Cytochrom C frei wird. Hierdurch kommt es zur Apoptose.

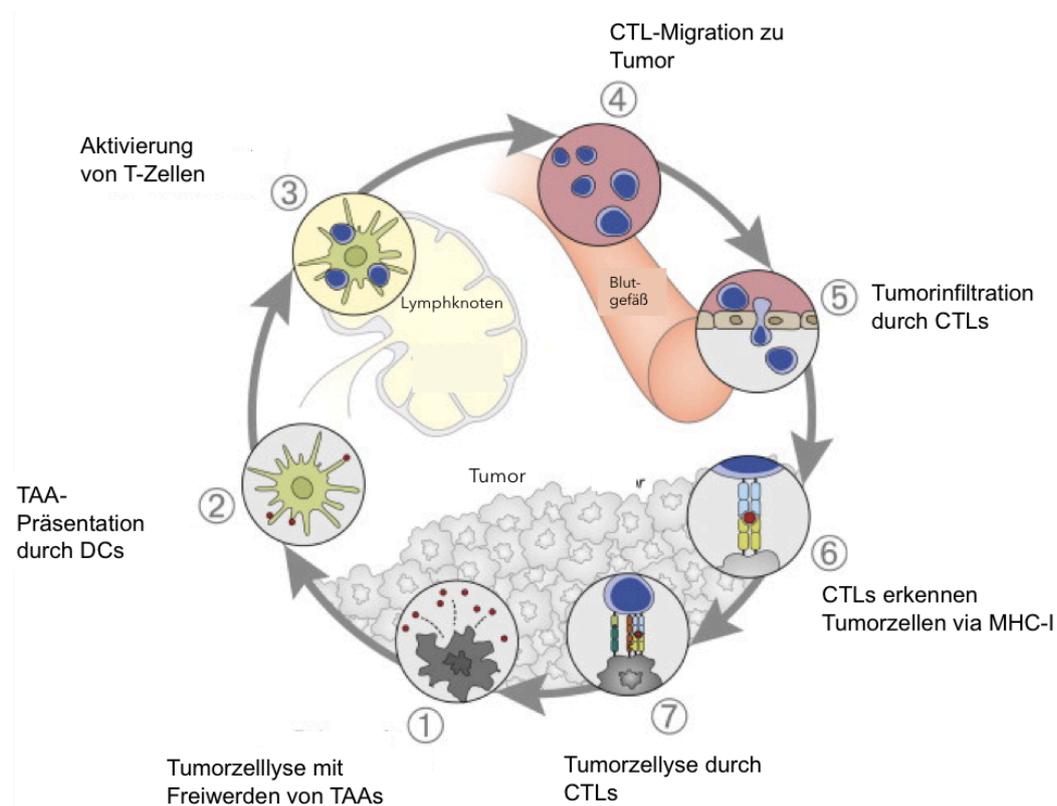


Abbildung 4: Tumorummunabwehr, verändert nach (69)

Durch Tumorzelluntergang werden Tumorantigene (TAAs) frei (1), die von dendritischen Zellen (DC) prozessiert und in den Lymphknoten präsentiert (2) werden. Durch die Interaktion mit DCs werden zytotoxische T-Zellen aktiviert (3) und migrieren entlang der Blutgefäße zum Tumor (4). Sie infiltrieren den Tumor (5), erkennen die Tumorzellen (6) und lysieren diese (7), wodurch erneut TAAs frei werden (1).

2.3.4 Das immunstimulatorische Zytokin GM-CSF

Das Zytokin GM-CSF gehört zur funktionellen Gruppe der Wachstumsfaktoren (52, S.77). GM-CSF wird von gewebeständigen Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten und Endothelzellen als Antwort auf eine Entzündung gebildet (52, S.78). IL-2, TNF- α und IFN- γ als proinflammatorische Zytokine steigern seine Sekretion, während die immunsuppressiven IL-10 und TGF- β die Freisetzung von GM-CSF senken (72).

Es vermittelt seine Wirkung über einen Typ-1-Zytokinrezeptor auf seinen Zielzellen. Dieser Rezeptor ist ein multimeres Transmembranprotein mit intra- und extrazellulärer Domäne. Bindet GM-CSF an die extrazelluläre Domäne, wird intrazellulär der JAK/STAT-Signalweg (*Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) in Gang gesetzt, der direkt die Modulation der Expression der Zielgene im Zellkern bewirkt. Durch die extrazelluläre Zytokinbindung werden intrazellulär essenzielle JAK-Proteine zum Rezeptorkomplex rekrutiert, wo sie die Phosphorylierung ihrer Tyrosine katalysieren. Dies bewirkt wiederum die Rekrutierung der STAT-Proteine und es kommt zu deren Phosphorylierung und Dimerisierung. Infolge der Dimerisierung der

STAT-Proteine translozieren diese in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren die Expression der Zielgene erhöhen (52, S.79ff.).

Der Effekt von GM-CSF ist abhängig von seiner Konzentration und dem Umfeld (72). In niedriger Dosis entwickelt GM-CSF einen immunregulatorischen Effekt, während hohe Dosen zu einer Verstärkung der Immunantwort führen. Es induziert die Reifung von APCs wie DCs und Monozyten und steigert dadurch die T-Zell-vermittelte Immunantwort (73). Durch die Hochregulierung von MHC-II-Molekülen auf der Oberfläche von APCs beeinflusst GM-CSF die Interaktion zwischen diesen und den T-Zellen (74). Es kommt zur vermehrten Antigenpräsentation durch GM-CSF-stimulierte DCs, gefolgt von einer verstärkten T-Zell-Aktivierung. Zusätzlich wird die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 und gesteigert (73).

In der Umgebung von Tumoren unterstützt GM-CSF die Rekrutierung von APCs und CD4^+ T-Zellen in die Tumormikroumgebung (75). Im Melanommodell konnte gezeigt werden, dass GM-CSF als Immunstimulator eine langanhaltende tumorspezifische T-Zell-Antwort induzieren kann (76). Zentral, im Knochenmark, ist eine erhöhte GM-CSF-Konzentration das Signal für hämatopoetische Vorläuferzellen, in Granulozyten und Monozyten zu differenzieren (52, S.77f.).

GM-CSF wird klinisch in der Tumorthherapie genutzt und zeigt auch in hohen Dosen eine gute Verträglichkeit (12).

2.3.5 Tumor-Immun-Escape-Mechanismen

Um erfolgreich proliferieren zu können und nicht vom Immunsystem angegriffen zu werden, haben Tumore verschiedene Mechanismen entwickelt, diesem zu entgehen und ein prokanzeröses Umfeld zu etablieren.

Zum einen exprimieren sie nur eine geringe Rate spezifischer, sondern überwiegend universelle TAAs, die auch unter physiologischen Bedingungen vorkommen (52, S.330). Gegen diese universellen TAAs wird keine Immunantwort generiert, da die T-Zellen gegenüber physiologischen Antigenen tolerant sind. Denselben Effekt hat die geringe bis fehlende Expression von MHC-I und -II und den kostimulatorischen Molekülen CD40 und CD80 auf der Tumorzelloberfläche (52, S.330, 77). Durch die geringe Anzahl an MHC-Molekülen fehlt den T-Zellen der primäre Aktivierungsstimulus. Falls die Bindung vom TCR an MHC-I auf Tumorzellen stattfindet, fehlt das kostimulatorische Signal, sodass diese anerg bleiben und nicht gegen den Tumor aktiviert werden, sondern eine Toleranz entwickeln (52, S.62). Die

Kreuzpräsentation von TAAs via MHC-I durch DCs, die das nötige kostimulatorische Signal bieten, ist somit von entscheidender Bedeutung, um eine effektive T-Zell-vermittelte Antitumorimmunität zu generieren (78). Der Tumor bietet jedoch primär keine Dangersignale für DCs, sodass die Immunzellaktivierung nicht ermöglicht wird (52, S.330).

Von besonderer Rolle ist die Tumormikroumgebung (TME). Tumore werden nicht mehr als reine Masse aus proliferierenden Krebszellen angesehen, sondern stellen ein komplexes System aus vielen verschiedenen Zelltypen, der Extrazellulärmatrix und sezernierten Zytokinen dar (79). Es finden sich neben maligne entarteten Zellen auch Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und antigenpräsentierende Zellen. Es zeigte sich eine Proportionalität zwischen der Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten und dem Patientenoutcome, d.h. je weniger T-Lymphozyten sich im TME befinden, desto erfolgreicher ist der Tumor in seinem Immun-Escape und somit seiner Proliferation (80). Die Mikroumgebung vieler Tumore zeichnet sich durch eine hohe Anzahl an CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen aus, die die CTL-Funktion hemmen (81). Sie sezernieren unter anderem die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β in erhöhter Konzentration (81). IL-10 blockiert das kostimulatorische CD28, wodurch zytotoxische T-Zellen nicht mehr aktiviert werden (82). TGF- β inhibiert die T-Zell-vermittelte zytotoxische Onkolyse (83) und es konnte gezeigt werden, dass es für die Herunterregulierung der DC-Ausreifungsmarker CD80/83/86 und MHC-II verantwortlich ist (84). Zudem hemmt es die Produktion der ausreifenden Zytokine TNF- α , IL-12 und IFN- α , während es seine eigene Sekretion verstärkt (84). Beide Zytokine verstärken die Aktivität von T_{regs} (85).

Zusätzlich ist das TME charakterisiert durch eine schlechte Blutversorgung mit dadurch bedingtem niedrigem pH und einer Hypoxie (86). Hierdurch wird die Tumorzellapoptose verhindert, Tumor-Wachstumsfaktoren hochreguliert, die Angiogenese gefördert und der Tumor therapieresistent (86). Durch den Sauerstoffmangel kommt es zur Dimerisierung von HIF-1 α und HIF-1 β , welche zusammen als aktiver Hypoxie-induzierter Faktor (HIF), einem Transkriptionsfaktor, die Gefäßneubildung und -permeabilität fördern (85). Für die Angiogenese ist unter anderem ein erhöhter VEGF-Spiegel (*Vascular Endothelial Growth Factor*) verantwortlich. Gabrilovich *et al.* zeigten, dass VEGF als vom Tumor produzierter Faktor die Differenzierung und Ausreifung dendritischer Zellen hemmt und so die Antigenpräsentation reduziert (77).

Auf molekularer Ebene haben Tumore die Fähigkeit, immunsuppressive Signalwege zu aktivieren, die in gesunden Zellen eine Überreaktion des Immunsystems verhindern (87). Hierdurch werden vorhandene CD8⁺ T-Zellen in ihrer Aktivität gehemmt. Der CTLA-4/CD80/86-Weg hemmt die CTL-Aktivierung durch Hemmung der Interaktion von APCs und T-Zellen (81). CTLA-4 findet sich auf der Oberfläche von aktivierten CTLs und konstitutiv auf T_{reg}S. Es hat eine hohe Affinität für CD80/86 und kann durch dessen Bindung die T-Zell-vermittelte Tumorabwehr verhindern (81).

Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 reduziert die Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegen den Tumor (81). PD-1 auf Immuneffektorzellen wie T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen bindet seine Liganden PD-L1 und PD-L2 auf der Tumoroberfläche. Diese Bindung führt zur Hemmung der T-Zell-Proliferation und -Funktion sowie zur Induktion der T-Zell-Apoptose. Diese als Immuncheckpoints bezeichneten Moleküle sind die Angriffspunkte von in der Krebstherapie eingesetzten Immuncheckpoint-Inhibitoren (81).

2.4 Onkolytische Viren

Onkolytische Viren (OV) sind natürliche oder genetisch modifizierte Viren, die replikationskompetent sind und eine nachgewiesene antitumoröse Aktivität besitzen, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen (88). Sie replizieren sich möglichst selektiv in maligne entarteten Zellen und führen entweder durch direkte Lyse oder durch die Induktion einer spezifischen Antitumorimmunreaktion zu deren Untergang. Da Tumorzellen häufig über keine effektive antivirale Aktivität verfügen, sind sie anfälliger für die Infektion (3). Onkolytische Viren stellen einen modernen und vielversprechenden Zweig innerhalb der Tumorimmuntherapie dar.

2.4.1 Historie

Die Erkenntnis, dass eine Virusinfektion einen positiven Einfluss auf den Verlauf eines Tumorleidens haben kann, ist nicht neu. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts gab es Fallberichte von Patienten, deren Tumor nach einer natürlich erworbenen systemischen Virusinfektion in die Remission ging (89). So beschrieb Dr. George Dock schon 1904, dass die Leukozyten einer Leukämiepatientin nach einer überstandenen Influenza-Infektion um das 70-fache gesunken waren und die Patientin eine partielle Remission erfahren habe, wenn auch nicht anhaltend (89, 90).

In den 1940er Jahren führte George T. Pack die erste klinische Studie an Melanompatienten mit einem attenuierten Rabiesvirus durch, nachdem er bei einer Patientin eine klinische Remission beobachtet hatte, die zuvor nach einem Hundebiss eine Rabiesvirusimmunisation erhalten hatte (91). In den darauf folgenden Jahren wurden erste präklinische Studien zum Thema durchgeführt, wie beispielsweise von Alice E. Moore (92). Sie zeigte 1949, dass das *Russian Far East Virus* in der Lage ist, das Wachstum von Sarkomen in Mäusen zu hemmen und teilweise den Tumor komplett zu lysieren. Der Aspekt, dass virale Onkolyse über die Produktion von tumorgerichteten Antikörpern eine langanhaltende Immunität induziert, wurde erstmals 1965 von Lindenmann und Klein aufgezeigt (93). In den 1970er bis 1980er Jahren zeigten mehrere Studien und Fallbeschreibungen mögliche Assoziationen von viralen Infektionen und Tumorremission (94). So wurden beispielsweise bei Patienten mit Hodgkin Lymphom (95) und Burkitt Lymphom (96) als Folge einer Maserninfektion ein Rückgang der Tumorlast beobachtet.

Es wurde schon seit den 1960er Jahren angenommen, dass onkolytische Viren durch Modifizierungen im Genom attenuiert, ihr Onkotropismus erhöht und somit ein verbesserter therapeutischer Effekt erreicht werden könnte (89). Durch die im Laufe der Zeit gewonnenen Erkenntnisse über das virale Genom und den Replikationszyklus wurden spezifischere Forschungen ermöglicht. Das erste gentechnisch modifizierte Virus, ein Vorläufer des heutigen T-VECs, wurde 1991 von Martuza *et al.* hergestellt (97). Von dort an wurde die Suche nach einem therapeutisch einsetzbaren onkolytischen Virus verstärkt betrieben, sodass bis zum Jahr 2018 neun verschiedene Virusfamilien in klinischen Studien zum Einsatz kamen (94). Mit der Zulassung des rekombinanten Adenovirus H101 2005 in China (98) und von T-VEC in der westlichen Welt 2015 (36) wurde der Weg in die klinische Praxis geebnet.

2.4.2 Wirkmechanismus von onkolytischen Viren

Onkolytische Viren zeichnen sich durch einen multimodalen Wirkmechanismus aus, der zur Lyse der Tumorzellen führt. Die drei Hauptmechanismen der Wirkung sind die direkte Tumorzelllyse, die Generierung einer spezifischen tumorgerichteten Immunantwort und die Induktion der Tumorzellnekrose über die Beeinflussung der Blutversorgung (siehe Abbildung 5).

Onkolytische Viren zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, selektiv Tumorzellen zu infizieren und in diesen zu replizieren, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen (99). Als Folge der viralen Infektion kommt es zur Lyse der Zelle, wobei die direkte

Tumorzelllyse dosisabhängig ist (100). Der Onkotropismus kann entweder als natürliche Eigenschaft eines Virus vorliegen oder durch gentechnische Modifikationen erreicht werden (99). Hierbei werden entweder virale Oberflächenproteine so modifiziert, dass der Zelleintritt in normalen Zellen verhindert wird oder es wird die Replikation beeinflusst. Die Replikation kann dabei entweder im Tumor gefördert (*positive targeting*) oder in gesunden Zellen inhibiert werden (*negative targeting*) (101).

Der zweite Mechanismus, durch den onkolytische Viren zum Tumorzelluntergang führen, ist die Beeinflussung der Gefäße und somit der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors (98). Die Viren infizieren spezifisch Endothelzellen der tumorversorgenden Gefäße, wodurch diese zugrunde gehen und auch nicht infizierte Zellen in der Nachbarschaft nekrotisch werden (102).

Durch freiwerdende TAAs und Dangersignale wird das spezifische Immunsystem aktiviert und ist in der Lage, als Folge der OV-Infektion eine tumorgerichtete Immunantwort zu generieren (98). Hierfür sind die Ausreifung von DCs und die Aktivierung von CTLs sowie die Produktion inflammatorischer Zytokine entscheidend. Der Einfluss von onkolytischen Viren auf das Immunsystem wird im nächsten Kapitel detaillierter beschrieben.

Der therapeutische Effekt onkolytischer Viren kann durch gentechnische Modifikationen verstärkt werden. Hierfür können Transgene, die für Immunstimulatoren oder Prodrugs kodieren, ins Virusgenom eingebracht werden (101).

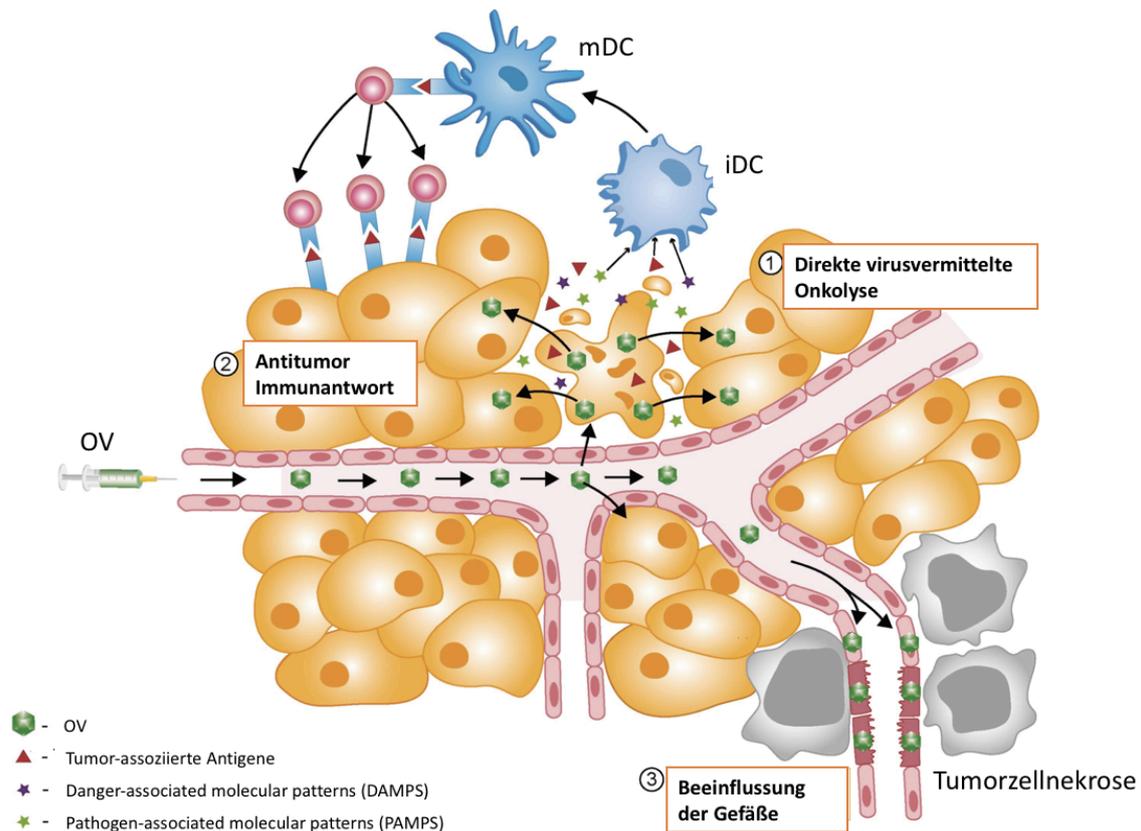


Abbildung 5: Wirkmechanismus von onkolytischen Viren, verändert nach (97)

Nach intravenöser Applikation verteilt sich das OV im Tumor und vermittelt seine Wirkung über verschiedene Mechanismen: 1) Direkte Onkolyse. 2) Die durch die Onkolyse frei gewordenen DAMPs, PAMPs und TAAs stimulieren eine spezifische Immunantwort. 3) Durch Virusreplikation im Endothel kommt es zur Beeinflussung der Gefäßversorgung und zur Tumorzellnekrose.

2.4.3 Der Effekt onkolytischer Viren auf das Immunsystem

In den letzten Jahren hat sich der Forschungsschwerpunkt vom direkt onkolytischen Effekt der untersuchten Viren hin zu ihren immunmodulatorischen Effekten verschoben.

Es wurde gezeigt, dass onkolytische Viren in der Lage sind, eine effektive und anhaltende Immunantwort zu induzieren und das TME so zu verändern, dass es weniger immunsuppressiv ist (87). Eine Virusinfektion bewirkt eine TH1-Antwort, induziert also die Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α (52, S.14). Hierdurch kommt es zur Entzündung und der vermehrten Expression der MHC-Moleküle im TME (52, S.330).

Onkolytische Viren induzieren mehrere Formen des immunogenen Zelltods der Tumorzelle wie die Nekrose, Nekroptose, Pyroptose, den autophagischen Zelltod und die immunogene Apoptose (87). Dadurch werden DAMPs freigesetzt, darunter Adenosintriphosphat (ATP) und das *High Mobility Group Box 1* Protein (HMGB1) (103). Präklinisch konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Melanomzellen

mit dem onkolytischen Parvovirus H1 *in vitro* die Freisetzung des *heat-shock* Proteins HSP72 induziert, ohne kokultivierte Immunzellen zu beeinflussen und somit die Immunantwort verstärkt (104). Zusätzlich kommt es als Folge der Infektion zur Freisetzung von PAMPs, hochkonservierten Molekülen wie viraler DNA und Kapsidbestandteilen (103).

PAMPs und DAMPs werden von PRRs auf DCs und NK-Zellen erkannt und fungieren als Phagozytosesignal, wodurch vermehrt DCs zur Ausreifung gebracht werden (103). Konsekutiv erfolgt eine erhöhte Produktion immunstimulatorischer Zytokine, wodurch zytotoxische T-Zellen und APCs ins TME gelockt werden. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass bei der Inkubation von iDCs mit H-1PV-induzierten Melanomzelllysaten Virusbestandteile durch TLRs erkannt wurden und dadurch die Zytokinproduktion angeregt wurde (105). Errington *et al.* zeigten in präklinischen Versuchen, dass Reoviren die DC-Ausreifung aktivieren, die Sekretion von IL-6 und TNF- α steigern und durch Kreuzpräsentation CTLs aktivieren können (4). Dies geschieht unabhängig von der Replikationskompetenz der Viren, sodass die direkte Erkennung der dsRNA als PAMP als entscheidendes Signal gewertet wurde.

Durch die virusvermittelte Lyse der Tumorzellen werden TAAs frei, welche von DCs im Tumorumfeld erkannt, prozessiert und an MHC-I gebunden präsentiert werden. Die Phagozytose infizierter Zellen durch DCs resultiert in deren Ausreifung und Kreuzpräsentation von TAAs an naive T-Zellen. Die CTLs sind dann in der Lage, spezifisch Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, zu lysieren (79). Versuche, in denen Melanomzellen mit H-1PV infiziert und mit Immunzellen kokultiviert wurden zeigten, dass DCs durch Phagozytose H-1PV-induzierter Melanomzelllysate zur Ausreifung gebracht wurden (106). Es kam zur verstärkten IL-6- und TNF- α -Produktion und durch Kreuzpräsentation zur Aktivierung von CTLs, was durch eine erhöhte Konzentration von IFN- γ gezeigt wurde. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Versuche mit Masernvirus-infizierten Tumorzellen, welche pDCs zur Ausreifung und TAA-Kreuzpräsentation brachten (5).

Regulatorische T-Zellen sind im TME häufig in hoher Zahl vorhanden und hemmen die T-Zell-Antwort, indem sie IL-10 und TGF- β sezernieren (81). Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Glioblastomzellen mit H-1PV zur Reduktion von T_{reg}S führt und somit eine effektivere Antitumorantwort ermöglicht wird (107).

Im Mausmodell konnte die Generierung von T-Gedächtniszellen nach Infektion mit rekombinantem Vesicular Stomatitis Virus gezeigt werden (108). Hierdurch entsteht ein Schutz vor neuen Tumorerkrankungen, da die T-Zellen durch das Erkennen bekannter Tumorantigene aktiviert und die Tumorzellen lysiert würden.

2.4.4 Onkolytische Viren in der Krebstherapie

Da onkolytische Viren ein relativ neues Therapieverfahren darstellen und bisher weltweit nur zwei Viren zugelassen sind, ist ihr Einsatz überwiegend auf klinische Studien beschränkt.

Im Vergleich zu herkömmlichen Tumorthérapien wie der Strahlentherapie und Polychemotherapie weisen onkolytische Viren eine bessere Verträglichkeit und Sicherheit durch erhöhte Tumorspezifität auf (103). Sie befallen nicht nur sich replizierende Tumorzellen, wodurch auch weniger stark proliferierende Tumore angegriffen werden. Im Gegensatz zur *Targeted Therapy* sind sie nicht auf spezielle Rezeptoren und Antigene angewiesen, wodurch Resistenzen reduziert werden können (109).

Eine Monotherapie mit onkolytischen Viren erwies sich jedoch bisher aus verschiedenen Gründen klinisch nicht als erfolgreich (87). Durch vorherigen Kontakt mit den Viren fanden sich im Blut der Patienten präformierte Antikörper, welche die onkolytischen Viren neutralisierten, bevor sie den Tumor erreichten (88). Dazu kommen physikalische Barrieren, eine antivirale Immunantwort und reduzierte virale Fitness durch die gentechnische Modifikation der Viren (87). Die Monotherapie war zwar in der Lage, das Überleben der Patienten zu verlängern, eine Tumoreradikation wurde jedoch nicht erreicht (99).

Aktuelle Studien verfolgen deshalb das Prinzip einer Kombinationstherapie mit verschiedenen Ansätzen. Auch die Wirksamkeit in Kombination mit Standardtherapieoptionen sollte bei neuen Behandlungen stets geprüft werden. Für OV's konnte bereits ein erhöhtes Ansprechen durch Kombination mit Radiatio *in vitro* (21) und Valproinsäure *in vivo* und *in vitro* (110) gezeigt werden.

Chemotherapeutika wie Doxorubicin (111), Oxaliplatin (112) und Cyclophosphamid (113) zeigten eine Induktion des immunogenen Zelltods, welcher ebenfalls durch OV's induziert wird. Eine synergistische Kombination könnte eine Dosisreduktion der Zytostatika mit konsekutiv geringeren Nebenwirkungen ermöglichen. Nachgewiesen wurde dieser Synergismus bereits für die Kombination aus Gemcitabin und H-1PV

(114), Cisplatin und dem Vacciniavirus GLV-1h68 (115) sowie Doxorubicin und dem Adenovirus SG511-BECN (116). Auch die Kombinationsbehandlung von Melanomzellen mit Cisplatin bzw. Vincristin und H-1PV zeigte eine verstärkte Ausreifung von dendritischen Zellen mit vermehrter Zytokinausschüttung im Vergleich zu alleiniger Zytostatikatherapie (7). T-VEC wurde in einer Kombination mit Cisplatin-basierter Radiochemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf und Hals in einer Phase I/II Studie getestet (117). Es zeigte neben guter Verträglichkeit eine lokoregionale Tumorkontrolle, womit gezeigt wurde, dass eine Kombination von OV's und Chemotherapie klinisch keine Nachteile hat.

In dieser Arbeit wurden die drei Chemotherapeutika Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Effekte alleine und in Kombination mit T-VEC und JS1 im Melanommodell untersucht. Für Cisplatin und Doxorubicin wurde beschrieben, dass sie den Tumor gegenüber den CTLs sensibilisieren (118). Über eine Hochregulierung der Glucose-6-Phosphat-Rezeptoren auf der Tumoroberfläche erhöhen sie die Permeabilität für Granzym B, dem Effektorenzym der CTLs.

Vincristin ist ein Mitosehemmer aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide (119). Es blockiert den Aufbau der Mitosespindel durch spezifische Bindung an β -Tubulin, wodurch dieses nicht mit α -Tubulin polymerisieren kann. Hierdurch wird der Zellzyklus unterbrochen und die Zelle geht in die Apoptose ein. Es zeichnet sich durch eine zum Teil dosislimitierende Neurotoxizität mit peripheren Neuropathien durch eine Störung des Mikrotubuli-vermittelten axonalen Transports aus. Vincristin wird unter anderem bei Leukämien, Lymphomen, Mammakarzinomen und Melanomen eingesetzt (32, 119).

Cisplatin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien (119). Es ist ein Komplex mit zentralem Platinatom, woran zwei Chlorliganden und zwei NH_3 -Gruppen gebunden sind. Cisplatin bindet kovalent an Gruppen der DNA und führt zu Inter- und Intrastrangquervernetzungen, dem sogenannten *Cross-Linking*. Zusätzlich induziert es Punktmutationen und hemmt die DNA-Reparatur sowie die Telomeraseaktivität. Cisplatin wird i.v. verabreicht und renal eliminiert, wobei es eine hohe Nephrotoxizität aufweist. Zusätzlich ist Cisplatin stark emetogen, neurotoxisch und ototoxisch. Sein Einsatz erfolgt überwiegend bei Tumoren des Urogenitaltraktes (Hoden, Harnblase, Ovar), aber auch bei Kopf-Hals-Tumoren, Bronchialkarzinomen und Melanomen (32, 119).

Doxorubicin ist ein zytostatisch wirkendes Antibiotikum, welches seine Wirkung zellzyklusunabhängig durch Interkalation in die DNA entfaltet (119). Es ist tetrazyklisch aufgebaut und lagert sich zwischen zwei Basenpaaren in die DNA-Stränge, wodurch die DNA- und RNA-Synthese gehemmt wird. Außerdem induziert es durch reaktive Sauerstoffspezies DNA-Strangbrüche und hemmt die Topoisomerase II. Doxorubicin wird bei der Therapie solider Tumore wie dem Bronchial-, dem Mamma- und dem Ovarialkarzinom eingesetzt und weist als dosislimitierende Nebenwirkung eine irreversible Kardiotoxizität auf (119).

Der derzeit aussichtsreichste und am meisten untersuchte Ansatz ist jedoch die Kombination von onkolytischen Viren mit Immuncheckpointinhibitoren. Aktuell (07/2020) sind 10 klinische Studien zu verschiedenen Kombinationen aus ICIs und OV registriert (120). ICIs blockieren immunsupprimierende Zellkontakte, wodurch die endogene antitumoröse Immunantwort verstärkt wird. Durch die Kombination mit OVs, welche Immunzellen ins TME locken und eine Entzündung induzieren können, wird ein synergistischer Effekt erreicht, da die Zielstrukturen der ICIs hochreguliert werden (109). Die klinische Wirksamkeit konnte bereits für die Kombination von T-VEC und Ipilimumab gezeigt werden, welche der jeweiligen Monotherapie überlegen war (121). T-VEC und Pembrolizumab hingegen zeigten in Kombination keinen über den der Pembrolizumab-Monotherapie hinausgehenden Effekt (122).

Zusätzlich entwickeln viele Patienten im Laufe einer Immuntherapie Resistenzen und viele, überwiegend niedrig immunogene Tumore sprechen primär nicht auf diese an (123). OVs sind in der Lage, die Immunogenität eines Tumors zu erhöhen und Resistenzen zu reduzieren (87, 106).

Der bevorzugte Applikationsweg für OVs ist die intratumorale Injektion, da hierdurch der Wirkverlust durch Verdünnung im Blut und neutralisierende Antikörper, Probleme bei der intravenösen Gabe, am geringsten gehalten werden können (11). Für schlecht zugängliche viszerale und knöcherne Metastasen ist dies ein Hindernis, welches die Verwendung von onkolytischen Viren in ihrer Therapie limitiert.

2.4.5 Das genetisch modifizierte HSV-1 Virus Talimogen Laherparepvec

Das in dieser Arbeit verwendete Virus Talimogen Laherparepvec (T-VEC) ist ein genetisch modifizierter Strang des HSV-1. Als Grundgerüst für seine Herstellung diente das ebenfalls in dieser Arbeit verwendete HSV-1-Isolat JS1, welches per se schon eine verstärkte onkolytische Aktivität im Vergleich zu klinischen HSV-1-Isolaten

aufweist (12). Die an T-VEC durchgeführten Modifikationen sind in Abbildung 6 dargestellt.

Um das Virus zu attenuieren und seine Tumorselektivität zu erhöhen, wurden die beiden Kopien des RL1-Gens deletiert, die für den Neurovirulenzfaktor ICP34.5 kodieren (12). Diese Veränderung entspricht einem *negative targeting*, da durch das Fehlen von ICP34.5 die Virusreplikation in gesunden Zellen durch die Proteinkinase R (PKR) verhindert wird. Die PKR induziert die Phosphorylierung von eIF-2 α , was zur Inaktivierung der viralen Proteinsynthese führt (124). Normalerweise induziert ICP34.5 über Bindung an die zelluläre Proteinphosphatase 1 α die Dephosphorylierung von eIF-2 α , sodass die virale Translation reinduziert wird und das Virus sich replizieren kann. Durch das Fehlen von ICP34.5 kann T-VEC in gesunden Zellen nur schwach replizieren, wohingegen es sich in malignen Tumorzellen gut vermehren kann, da diese in der Regel keine PKR-Aktivität haben (124).

Zusätzlich wurde die Gensequenz für ICP47 deletiert (124). ICP47 blockiert die Antigenpräsentation in HSV-1-infizierten Zellen (125), sodass diese Veränderung die Immunantwort auf die Virusinfektion durch gesteigerte Antigenpräsentation verstärken soll. Eine vermehrte MHC-I-Expression durch die Deletion konnte *in vitro* durch Liu *et al.* nachgewiesen werden (12).

Durch die Inaktivierung von ICP47 wird US11 unter die Regulation von dessen Promotor gestellt und von einem γ (L)- zu einem α (IE)-Gen. Die Expression von US11 als IE-Gen hemmt frühzeitig die Aktivität der PKR (124). Durch die Blockade der PKR, bevor diese durch die Virusinfektion induziert werden kann, wird eine vorschnelle Virusbekämpfung verhindert und somit ein wirksamerer zytolytischer Effekt ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Deletion von ICP47 einen verlängerten und verstärkten antitumorösen Effekt ermöglicht (12).

Zusätzlich zur Gendeletion wurde JS1 so verändert, dass es zu einer systemischen tumorgerichteten T-Zell-Immunantwort kommt. Hierfür wurde an die beiden Loci des gelöschten RL1 eine Gensequenz inseriert, welche für das humane Zytokin GM-CSF kodiert (12). Die vermehrte GM-CSF-Produktion könnte die Proliferation und Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen begünstigen. In einer Versuchsreihe an wenig immunogenen Prostatakarzinomzellen konnte jedoch kein zusätzlicher Effekt von GM-CSF nachgewiesen werden (126). Im Mausmodell zeigten Tumore eine vergleichbare Remission nach Injektion des Virus mit und ohne GM-CSF, jedoch

wurde eine vermehrte Tumorschrumpfung von nichtinjizierten Ferntumoren durch die zusätzliche Expression von GM-CSF berichtet (12). Auch wurden erhöhte IFN- γ -Konzentrationen durch Injektion von JS1/34.5-/47-/mGM-CSF im Vergleich zu JS1/34.5-/47- in Lymphome im Mausversuch im ELISA nachgewiesen, was eine verstärkte CTL-Aktivierung impliziert. In derselben Versuchsreihe wurde von der Induktion einer protektiven Antitumorimmunität durch Behandlung von Mäusen mit JS1/34.5-/47-/mGM-CSF berichtet.

Durch die gentechnischen Modifikationen ist T-VEC somit in der Lage, speziell hochproliferative, maligne Zellen zu infizieren, ohne gesunde Zellen zu befallen, einen verstärkten zytopathischen Effekt zu generieren und eine tumorgerichtete Immunantwort zu verstärken.

Kaufman *et al.* zeigten, dass durch die Behandlung von Melanompatienten mit dem onkolytischen Virus Oncovex^{GM-CSF}, welches T-VEC entspricht, die Anzahl an immunsuppressiven T_{reg}s und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) gesenkt und die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im TME erhöht werden kann (127). Im Umfeld nicht injizierter Metastasen wurden diese Veränderungen ebenfalls gefunden, was die Induktion einer systemischen Immunantwort durch lokale Injektion von Oncovex^{GM-CSF} demonstriert.

T-VEC wurde am 27.10.2015 durch die US Food and Drug Administration als Imlygic® zur Verwendung bei Patienten mit nicht resezierbaren Melanommetastasen in Haut und Lymphknoten zugelassen (36). Zwei Monate später erfolgte auch die Zulassung durch die European Medicines Agency für die selbe Indikation (10).

In der randomisierten kontrollierten OPTiM-Studie, die der Zulassung vorausging, zeigte T-VEC eine gute klinische Wirksamkeit und überzeugte mit einer geringen Rate an unerwünschten Nebenwirkungen (14). Es wurden 436 Patienten mit malignem Melanom im Stadium IIIb bis IV randomisiert. Die Kontrollgruppe erhielt subkutan GM-CSF, während der Verumgruppe intraläsional T-VEC appliziert wurde. Der primäre Endpunkt, objektives Ansprechen für mindestens 6 Monate, wurde zu 16,3 % im Vergleich zu 2,1 % in der Kontrollgruppe signifikant erreicht. Auch das Gesamtansprechen (26,4 % vs. 5,7 %) und das Gesamtüberleben (23,3 Monate vs. 18,9 Monate) zeigten einen positiven Effekt von T-VEC. Zusätzlich zur klinischen Wirksamkeit wurde in der Studie von einem guten Sicherheitsprofil berichtet. Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen waren grippeartige Symptome und Müdigkeit. Zudem ist T-VEC auch nach seiner gentechnischen Modifikation wegen des intakten

Tyrosinkinasegens empfindlich gegen den antiviralen Wirkstoff Aciclovir (12), was sein Sicherheitsprofil weiter begünstigt. Heilung durch die Gabe von T-VEC alleine wurde nicht berichtet, sodass die Frage nach einer potenten Kombinationstherapie gestellt werden kann.

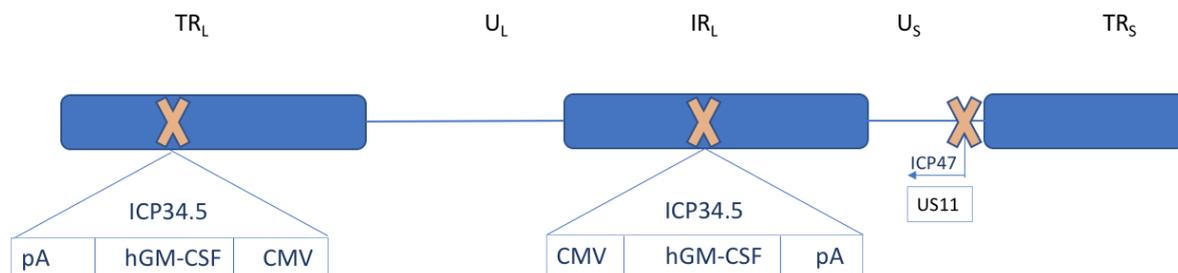


Abbildung 6: Genetische Modifikationen von JS1 zu T-VEC, nach (124)
 Durch die Deletion von ICP34.5 in den R-Sequenzen wird die Neurovirulenz des Virus reduziert. An dieser Stelle wurde das Gen des humanen GM-CSF inseriert, um die Immunantwort zu verstärken. Die Deletion von ICP47 verstärkt die Antigenpräsentation und hierdurch wird US11 früher exprimiert.

3 Material

3.1 Lösungsmittel und Chemikalien

3.1.1 Lösungsmittel p.a.

DMSO	Roth, Karlsruhe
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
2-Propanol	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Chemikalien

Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, München
DMEM + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
FCS (Fetales Kälberserum)	PAN Biotech, Aidenbach

Material	
HCl	Merck, Darmstadt
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich Chemie, München
Humanserum	Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PBS/EDTA	Lonza, Verviers, Belgien
PFA	Sigma-Aldrich Chemie, München
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
TMB	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	ICN, Eschwege
Tween 20 %	Sigma-Aldrich Chemie, München
X-VIVO 15	Lonza, Verviers, Belgien

3.2 Zytokine und Zytostatika

3.2.1 Zytokine

Die Zytokine wurden, falls nicht anders vermerkt, bei -20 °C gelagert und vor Benutzung aufgetaut.

CD3 (Lagerung bei 4 °C)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8 (Lagerung bei 4 °C)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

GM-CSF (Lagerung bei 4 °C)	Sandoz, Nürnberg
IL-1 β	Sigma-Aldrich Chemie, München
IL-4	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
IL-6	Strathmann, Hannover
PGE ₂	Sigma-Aldrich Chemie, München
Proleukin 2	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
TNF- α	Strathmann, Hannover

3.2.2 Zytostatika

Die Zytostatika Doxorubicin und Vincristin wurden bei 4 °C gelagert. Cisplatin wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Cisplatin	1 mg/ml	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Doxorubicin	2 mg/ml	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
Vincristin	1 mg/ml	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz

3.3 Antikörper

Alle Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

3.3.1 Primärantikörper

Anti-Human GM-CSF Capture Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human GM-CSF Detection Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IFN- γ Capture Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IFN- γ Detection Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IL-2 Capture Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IL-2 Detection Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IL-6 Capture Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human IL-6 Detection Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human TNF- α Capture Antibody	Invitrogen, Karlsruhe

Material

Anti-Human TNF- α Detection Antibody	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-CD80, FITC-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD83, APC-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD86, PE-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Human CD8a, FITC-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human CD4, PE-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Human CD69, APC-konjugiert	eBioscience, San Diego, USA

3.3.2 Sekundärantikörper

Avidin-HRP	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-HRP Streptavidin	Invitrogen, Karlsruhe

3.4 Zelllinien und Viren

3.4.1 Zelllinien

3.4.1.1 SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22

Die verwendeten Tumorzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer feuchten Atmosphäre kultiviert und alle 3 bis 4 Tage passagiert.

Die Melanomzelllinie SK29-MEL-1 wurde 1975 aus der Metastase eines männlichen kaukasischen Patienten (A.V.) mit metastasiertem Melanom etabliert. Die Zelllinie ist durch einen positiven HLA-A2-Status (humanes Leukozyten-Antigen-A2) charakterisiert (128).

Die Zelllinie SK29-MEL-1.22 wurde durch Bestrahlung und Immunselektion mit CTLs aus SK-MEL-1 selektiert und ist HLA-A2⁻ (128). Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. T. Wölfel aus der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt (7).

Das Vorhandensein von HLA-A2-Antigenen auf der Oberfläche von SK29-MEL-1 ermöglicht die direkte Erkennung durch CTLs, wohingegen bei SK29-MEL-1.22 die Kreuzpräsentation von Antigenen via DCs nötig ist (8).

Material

PBMC-Medium

RPMI 1640

1 % Humanplasma

Einfriermedium für Zellen, verwendet bei 4 °C

FCS

10 % DMSO

3.5.2 Puffer und Lösungen

Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf jeweils 1 l deionisiertes Wasser.

PBS-Puffer (pH 7,2)

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,3 g Na₂HPO₄

0,2 g KH₂PO₄

ACK Lyse Puffer (pH 7,3)

0,15 M NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0,1 mM EDTA

1 N HCl

in 500ml Wasser

Coating-Puffer (ELISA)

1x PBS

Blockpuffer (ELISA)

1 % BSA

in 1x PBS

Waschpuffer (ELISA)

0,05 % Tween 20

in 1x PBS

Pufferlösung (MACS)

0,5 % Humanserum

2 mM EDTA

in 1× PBS

Pufferlösung (FACS)

5 % FCS

in 1× PBS

3.6 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser

Thermo Fisher Scientific, Massachusetts,
USA

COSTAR 6-, 96-well-Platten

Corning, New York; USA

FACS-Röhrchen

Sarstedt AG, Nürnberg

Glaspasteurpipetten

VWR, Darmstadt

Kryoröhrchen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Laborflaschen

Biochrom KG, Berlin

Schott, Mainz

Leucosep-Röhrchen

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Material	
MACS-Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nürnbergrecht
	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
SealPlate Film	Sigma-Aldrich Chemie, München
Sterile Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen (Falcons)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	SPL LIFE SCIENCES, Korea
6-, 12-, 24-, 96-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.7 Geräte

CO ₂ -Inkubator	Heraeus, München
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader X-Fluor	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Gefrier- und Kühlschränke 4/-20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
	Bauknecht, Stuttgart
	Siemens, München
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg
MACS-Separation System	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette 5-50 µl	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Mehrkanalpipette 20-200 µl	HTL, Warschau, Polen
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Socorex, Ecublens, Schweiz

Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten 0-1000 µl	Eppendorf Hamburg; VWR, Darmstadt; Gilson, Frankreich
Pipettierhilfen	Brand, Wertheim Hirschmann, Eberstadt
Rollschüttler	IDL, Nidderau
Sterilwerkbank	Clean Air, Deutschland
Stickstoffbehälter Arpego 40	Air Liquide, Marne-la-Vallée
Trinokulares Mikroskop	Motic, China
Vakuum-Absauganlage	KNF Neuberger, Freiburg
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wiegeschüttler	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge	Sigma 3-18K Fisher Bioblock Scientific, Heraeus, München

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Gearbeitet wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank.

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre in Zellkulturflaschen mit 75 bis 150 cm² Fläche kultiviert. Als Medium für die Melanomzelllinien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 diente DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS sowie 1 % Penicillin und Streptomycin. Die Hitzeinaktivierung des FCS wurde durch eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 56 °C erreicht. Vor Kontakt mit den Zellen wurden alle Flüssigkeiten im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Methoden

Um ein zu dichtes Wachstum und somit einen Wachstumsstopp zu verhindern, wurden die Zellen alle 3 bis 4 Tage passagiert und in neuem Medium aufgenommen.

4.1.2 Passagieren adhärenter Zellen

Die Melanomzellen wachsen adhärent und wurden bei konfluentem Wachstum in regelmäßigen Abständen passagiert.

Das Medium wurde entnommen und die Kulturflasche mit 5ml PBS gespült, um abgestorbene, nicht mehr adhärenente Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 5 ml PBS/EDTA gelöst, wofür eine Inkubationszeit von 5 Minuten notwendig war. Unterstützt wurde die Ablösung durch leichtes Beklopfen der Zellkulturflasche mit der Hand. Gelöste Zellen kugeln sich ab, was unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, bevor die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt wurde. Das gesamte Medium inklusive der gelösten Tumorzellen wurde in ein Falcon überführt und die Zellen durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten) sedimentiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in wenigen ml Medium gelöst und ein Teil der Zellen je nach Bedarf und Wachstumsgeschwindigkeit zurück in die mit Medium befüllte Zellkulturflasche gegeben. Die nicht zurück in Kultur gegeben Zellen wurden entweder verworfen, als Subkultur in einer neuen Flasche kultiviert oder zur späteren Verwendung eingefroren (siehe 4.1.3).

4.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Nicht verwendete Zellen wurden eingefroren und so langfristig gelagert. Hierfür wurden sie mittels PBS/EDTA gelöst, durch Zentrifugation vom Medium separiert und anschließend wie in 4.1.5 beschrieben gezählt. Die Zellen wurden im Einfriermedium (90 % DMSO und 10 % FCS) aufgenommen. Es wurden Fraktionen von 3 bis 5×10^6 Zellen pro 1 ml Einfriermedium in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zunächst für 24 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren, dann für 3 Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, bevor sie zur langfristigen Verwahrung in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

Die Zugabe von Dimethylsuloxid (DMSO) zum Medium stabilisiert die Zellmembran und verhindert während des Einfrierens eine intrazelluläre Kristallbildung, welche die Zelle schädigen würde. Ebenso reduziert das langsame Abkühlen die Kristallbildung.

4.1.4 Auftauen von Zellen

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu bringen ist es nötig, diese möglichst schonend aufzutauen. Hierfür wurden die Zellen in den Kryokonservierungsröhrchen kurz in der Hand angewärmt und mit dem entsprechenden auf 37 °C vorgewärmten Medium vermischt. Dieser Vorgang sollte möglichst zügig durchgeführt werden, da das DMSO bei Raumtemperatur einen zytotoxischen Effekt entwickelt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten, wodurch die Zellen vom toxischen Überstand getrennt wurden. Die sedimentierten Zellen wurden im 37 °C warmen Medium aufgenommen und ausgesät. Um das Anwachsen der Zellen zu erleichtern, wurde dem DMEM beim Auftauen von Melanomzellen bis zum ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden 20 % FCS statt der üblichen 10 % zugesetzt.

4.1.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung

Die durch EDTA gelösten und abzentrifugierten Zellen wurden in einer bestimmten Menge Medium aufgenommen und 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt abgestorbene und beschädigte Zellen durch Penetration der Zellwand blau an, sodass sie von vitalen Zellen unterschieden werden können.

Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden 10 µl der Lösung in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die Zählkammer besteht aus 4 Quadranten mit jeweils 16 kleineren Quadranten. Gezählt wurden die nicht angefärbten, vitalen Zellen pro Quadrant. Aus den Werten der vier Quadranten wurde ein Mittelwert n gebildet und die Verdünnung mit Trypanblau durch Multiplikation mit 10 ausgeglichen. Die Gesamtzahl der Zellen pro ml ist definitionsgemäß $n \times 10^4$

Die zugehörige Formel lautet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{gezählte Zellen } n \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Möchte man die Zahl aller sich in Lösung befindlichen Zellen errechnen, multipliziert man die Zellzahl pro ml mit dem Volumen der Lösung:

$$\text{Gesamtzahl} = \text{Zellzahl pro ml} \times \text{Volumen}$$

4.1.6 Separation peripherer mononukleärer Zellen aus humanem Blut

PBMCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Vollblut isoliert, wobei gelöste Makromoleküle nach ihren unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten aufgetrennt werden.

Methoden

In einem ersten Schritt wurden sechs Leucosep®-Röhrchen mit je 15 ml Ficoll-Hypaque als Separationslösung befüllt und eine Minute bei 100 rpm zentrifugiert, sodass sich das Ficoll unter der Trennscheibe geschichtet hat. Das heparinisierte Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt, gleichmäßig in die Leucosep®-Röhrchen verteilt und 20 Minuten bei 2200 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Hierdurch ergab sich eine charakteristische Schichtung der Blutbestandteile (siehe Abbildung 7). Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren aufgrund ihrer hohen Dichte im Pellet, das zellfreie Plasma sammelt sich als oberste Schicht. In der Interphase befinden sich Leukozyten, Monozyten und NK-Zellen, die als PBMCs zusammengefasst werden. Dieser Leukozytenfilm, auch Buffy Coat genannt, ist als heller Ring erkennbar und von den anderen Fraktionen gut zu unterscheiden. Die Plasmaphase wurde bis auf ca. 10 ml pro Röhrchen abgenommen und in einem separaten Falcon gesammelt. Es folgte eine Hitzeinaktivierung bei 57 °C über 30 Minuten im Wasserbad.

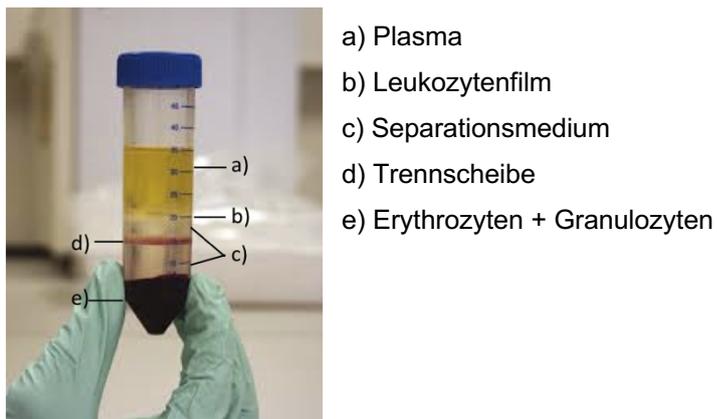


Abbildung 7: Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation, verändert nach (129)

Vorsichtig wurde der Leukozytenfilm mit einer Pipette abgenommen und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Die PBMC-Falcons wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 6 Minuten bei 1700 rpm mit Bremse zentrifugiert. Hierdurch sollten Verunreinigungen durch Zellbestandteile anderer Fraktionen (vor allem Thrombozyten) oder Ficollüberreste reduziert werden. Der entstandene Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet vorsichtig durch Antippen am Röhrchen gelockert. Durch die Zugabe von 5 ml ACK-Puffer wurden die verbliebenen Erythrozyten lysiert, sodass eine möglichst reine PBMC-Fraktion entstand. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde wieder mit PBS verdünnt und zentrifugiert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Überstand keine sichtbare Rotverfärbung mehr aufwies.

Die so separierten PBMCs konnten nun mit Trypanblau gefärbt und gezählt werden und zur Isolierung von Monozyten genutzt bzw. in Fraktionen von 5×10^7 /ml kryokonserviert werden. Als Einfriermedium diente humanes Serum mit 10 % DMSO und 25000 IE Heparin.

4.1.7 Adhärenzisolierung von Monozyten

Aus den mittels Dichtegradientenzentrifugation separierten PBMCs wurden Monozyten isoliert. Hierfür wurden 6-Well Costar®-Platten benutzt und pro Well 10×10^6 Zellen in 2,5 ml RPMI + 1,5 % hitzeinaktiviertem Plasma ausgesät. Die PBMCs wurden zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, sodass nur die am Boden adhärennten Monozyten verblieben. Diese wurden in X-VIVO + 1 % hitzeinaktiviertem Plasma kultiviert.

4.1.8 Ausreifung dendritischer Zellen aus Monozyten

Um unreife dendritische Zellen aus Monozyten zu differenzieren, wurden den ausgesäten Monozyten 500 U/ml IL-4 und 500 U/ml GM-CSF zugegeben.

Nach Inkubation von jeweils 48 Stunden im Brutschrank wurden zwei Mal 500 μ l Medium mit je 500 U/ml GM-CSF und IL-4 zugegeben.

Am sechsten Tag konnten die so isolierten iDCs im Überstand für die Kokultur verwendet werden.

DCs reifen *in vivo* durch Aufnahme von Fremdartigenen zu mDCs aus. *In vitro* kann diese Ausreifung durch die Zugabe eines Zytokincocktails induziert werden. Hierzu wurden ausplattierte iDCs mit 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-1 β , und 1 μ g/ml PGE₂ stimuliert.

4.1.9 Magnetassoziierte Zellseparation (MACS)

Zur Separierung von T-Zellen im MACS-System wurde das Pan-T-cell isolation kit human der Firma Miltenyi nach Herstellerangaben verwendet. Das System besteht aus einer Säule, die mit einer ferromagnetischen Matrix ausgekleidet und zur Zellseparation in einen Magnetblock eingespannt ist. Die Matrix verstärkt das magnetische Feld um den Faktor 10000 (130).

Die Zellsuspension wird mit einem *Micro Bead Cocktail* versetzt, wodurch die Trennung von Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene ermöglicht wird. *Micro Beads*

Methoden

sind 50 nm große superparamagnetische Partikel, die hochspezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene gebunden haben (130). Diese Antikörper binden passende Antigene auf der Oberfläche von Zellen. Durch die Markierung mit *Micro Beads* werden markierte Zellen im Magnetfeld um die Säule zurückgehalten, während unmarkierte am Ende der Säule aufgefangen werden können. Abbildung 8 verdeutlicht das Prinzip der magnetassoziierten Zellsortierung.

Für diese Arbeit wurde eine Negativselektion angewandt, die gewünschten Zellen also nicht markiert.

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Benutzt wurden die wie in 4.1.6 beschrieben isolierten PBMCs aus Buffy Coats gesunder Spender, die bis zur Separation kryokonserviert wurden. Für den Einsatz in der Kokultur wurden Monozyten und T-Zellen vom gleichen Spender verwendet, die somit HLA-identisch waren.

Die kryokonservierten PBMCs wurden in MACS-Puffer aufgetaut und gezählt. Anschließend wurde der Puffer durch Zentrifugation entfernt und die Zellen in 30 μl pro 10^7 Zellen Puffer resuspendiert. Nacheinander wurden sie mit 10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen *Pan-T-Zell-Biotin-Antibody Cocktail* und 30 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen *NK-Cell Micro Bead Cocktail* versetzt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 30 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen MACS-Puffer.

Somit wurden alle in der Suspension enthaltenen Zellen bis auf die zu separierenden T-Zellen mit Antikörpern beladen. Im nächsten Schritt folgte die Isolierung mittels LD-Säule, wozu die markierten PBMCs in die im Magnetfeld im MACS-Separator eingespannte Säule gegeben wurden. Die markierten Zellen wurden durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten. Am unteren Ende wurde die durchgelaufene Fraktion aufgefangen, welche die unmarkierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen enthielt. Diese T-Zellen konnten nun gezählt und für die Kokultur verwendet werden.

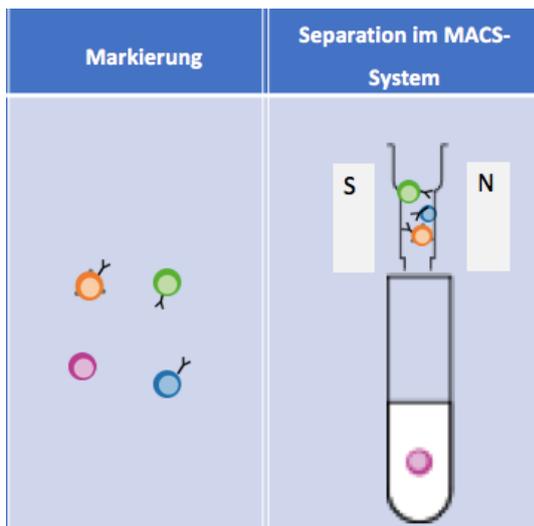


Abbildung 8: Prinzip der magnetassoziierten Zellsortierung, verändert nach (130)

Die Zellen in einer Suspension werden mit Antikörpern gegen ihre Oberflächenmerkmale markiert. Im Magnetfeld des MACS-Systems werden markierte Zellen zurückgehalten, während unmarkierte die Säule ungehindert passieren.

4.1.10 Kokultur

Um die Interaktion von unterschiedlich generierten Tumorzelllysaten mit Immunzellen *in vitro* darzustellen, wurden Kokulturen aus Tumorzelllysaten und HLA-korrespondierenden Immunzellen gebildet (siehe Abbildung 9). Hierfür wurden Melanomzellen der Linien SK-29MEL-1 und SK-29MEL-1.22 mittels PBS/EDTA gelöst (siehe 4.1.2), gezählt (siehe 4.1.5) und in ihrem Kulturmedium ausgesät.

In einem ersten Ansatz (DC-Versuch) wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen pro Well ausplattiert und nach 24 Stunden mit JS1 oder T-VEC infiziert (siehe 4.2.1). Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Tumorzellen mit den Chemotherapeutika Doxorubicin, Cisplatin und Vincristin behandelt (siehe 4.2.1).

Nach weiteren 24 Stunden waren die Tumorzellen durch die Viren bzw. die Chemotherapeutika größtenteils lysiert, was optisch kontrolliert wurde.

Da sich die Melanomzelllysate überwiegend in den Überständen befanden, wurden diese abgenommen, abzentrifugiert und die Pellets in X-VIVO in die Wells zurückgegeben. Zu den sich nun in X-VIVO befindenden Melanomzellen und ihren Lysaten wurden im Verhältnis 1:5 iDCs zugegeben. Durch Zentrifugation wurden die Zytokine und das Serum von den iDCs entfernt, die deren Ausreifung beeinflussen könnten. Als Zellkontrolle dienten nicht infizierte und nicht kokultivierte Zellen beider Zelllinien sowie eine kokultivierte Zellkontrolle ohne Infektion. Nicht kokultivierte iDCs wurden als Negativkontrolle ausgesät. Als Positivkontrolle wurden iDCs durch Zugabe

Methoden

des Zytokincocktails zur Ausreifung gebracht. Die Zellen wurden für 48 Stunden kokultiviert, bevor sie zur FACS-Analyse gefärbt wurden (siehe 4.3.1).

In einem zweiten Ansatz (CTL-Versuch) wurden je $0,01 \times 10^6$ Melanomzellen pro Well ausgesät, nach 24 Stunden infiziert und mit Zytostatika behandelt. Nach weiteren 48 Stunden wurden iDCs im Verhältnis 1:5 zugegeben und in X-VIVO kokultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurden T-Zellen im Verhältnis 1:1 zu den kokultivierten Melanomzelllysaten zugegeben und mit jeweils 100 IU/ml Proleukin 2 stimuliert. Diese T-Zellen wurden zuvor mittels MACS-Verfahren aus PBMCs isoliert (siehe 4.1.9). Als Positivkontrolle für die Aktivierung der CTLs dienten ausgesäte T-Zellen, die durch Zugabe von je $1 \mu\text{l/ml}$ CD3 und CD28 stimuliert wurden. Unstimulierte und nicht kokultivierte T-Zellen wurden als Negativkontrolle ausgesät.

Nach Ablauf von 48 Stunden wurden die Zellen gefärbt und ihre Aktivierung mittels FACS analysiert.

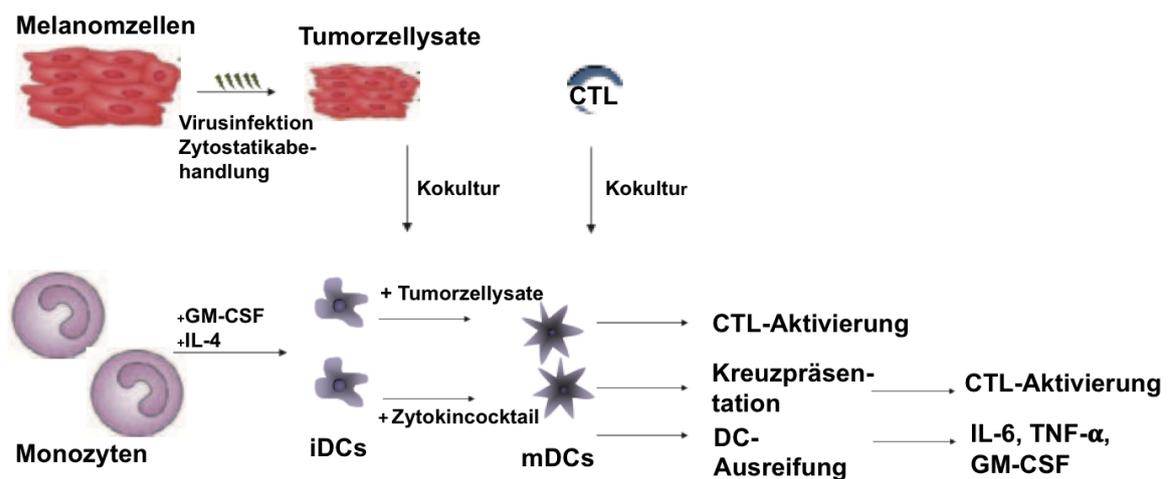


Abbildung 9: Humanes Melanommodell, verändert nach (106)

Die Melanomzellen wurden mit T-VEC oder JS1 infiziert bzw. mit Zytostatika behandelt und somit lysiert. Aus Monozyten mittels GM-CSF und IL-4 isolierte iDCs wurden mit den entstandenen Melanomzelllysaten kokultiviert bzw. durch Zugabe von Zytokinen zur Ausreifung gebracht und diese Ausreifung analysiert. CTLs wurden zur Kokultur gegeben und ihre Aktivierung analysiert.

4.2 Virologische Methoden

4.2.1 Infektion adhärenter Zellen

Die Melanomzellen der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 wurden einen Tag nach dem Aussäen mit Herpesviren vom Typ JS1 und T-VEC infiziert.

Die MOIs (*Multiplicity of Infection*) waren aus vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe bekannt als 0,1 pfu/Zelle für T-VEC und 0,01 pfu/Zelle für JS1. Für die Berechnung der Virusmenge wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{benötigte Virusmenge} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Viruskonzentration}}$$

In der vorliegenden Arbeit galt somit:

Für die DC-Kokultur-Versuche

$$\text{benötigte Virusmenge (T-VEC)} = \frac{0,1 \times 10^6 \times 0,1}{5 \times 10^6} = 2 \mu\text{l pro Well}$$

$$\text{benötigte Virusmenge (JS1)} = \frac{0,1 \times 10^6 \times 0,01}{3 \times 10^6} = 0,33 \mu\text{l pro Well}$$

Für die CTL-Kokultur-Versuche

$$\text{benötigte Virusmenge (T-VEC)} = \frac{0,01 \times 10^6 \times 0,1}{5 \times 10^6} = 0,2 \mu\text{l pro Well}$$

$$\text{benötigte Virusmenge (JS1)} = \frac{0,01 \times 10^6 \times 0,01}{3 \times 10^4} = 3,3 \mu\text{l pro Well}$$

Die errechnete Virusmenge wurde im Zellkulturmedium verdünnt. Das alte Medium wurde von den ausgesäten Zellen abgenommen und die Viren in je 500 μl (DC) bzw. 200 μl (CTL) Zellkulturmedium auf die Melanomzellen gegeben. Nicht infizierte Melanomzellen wurden mit der gleichen Menge Medium versetzt. Die Zellen wurden eine Stunde im Brutschrank inkubiert, um die Infektion zu ermöglichen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zusätzlich mit den drei Chemotherapeutika Cisplatin, Doxorubicin und Vincristin behandelt. Die Konzentrationen der Zytostatika waren ebenfalls aus vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe bekannt als:

Für SK29-MEL-1	Cisplatin	0,08 $\mu\text{l/ml}$
	Doxorubicin	0,07 $\mu\text{l/ml}$
	Vincristin	17,52 $\mu\text{l/ml}$
Für SK29-MEL-1.22	Cisplatin	2,50 $\mu\text{l/ml}$
	Doxorubicin	0,07 $\mu\text{l/ml}$
	Vincristin	22,76 $\mu\text{l/ml}$

Die Zytostatika wurden in je 2,5 ml (DC) bzw. 800 μl (CTL) Zellkulturmedium pro Well zu den infizierten Zellen gegeben und diese 24 Stunden inkubiert. Zu den nicht behandelten Zellen wurde die entsprechende Menge Medium gegeben.

Als Kontrollen dienten jeweils gänzlich unbehandelte Melanomzellen, nur mit je einem Virus infizierte Zellen und nur mit je einem Chemotherapeutikum behandelte Zellen. Alle übrigen Kombinationen wurden untersucht.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 FACS-Analyse

4.3.1.1 Grundlagen

Im FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), einer Version eines Durchflusszytometers, können Einzelzellen gemessen und anhand verschiedener Marker analysiert werden. Ein Durchflusszytometer ist aufgebaut aus einer Messzelle, einem Laser als Lichtquelle, mehreren Detektoren, vor die teilweise Filter geschaltet sind, und einem Computer zur Auswertung des Signals (siehe Abbildung 10).

In einer Lösung befindliche Zellen werden in die Messzelle, eine dünne Mikrokanalküvette, eingesogen. Durch hydrodynamische Fokussierung entstehen im Flüssigkeitsstrom Einzelzellen, die perlschnurartig aufgereiht an einer Lichtquelle vorbeigeleitet werden. Diese Lichtquelle, ein monochromatischer Laser, ist rechtwinklig zum Verlauf des Flüssigkeitsstroms geschaltet. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird dieser gebeugt und es entsteht Streulicht. Unterschieden werden zwei verschiedene Arten von Streulicht: Das Licht, das in der Ebene des Lasers gestreut wird und somit linear zum Lichtstrahl des Lasers auf einen Detektor trifft, wird als *Forward Scatter* (FSC) bezeichnet. Der auf die Zelle treffende Lichtstrahl wird auch seitlich abgelenkt. Der sogenannte *Side Scatter* (SSC) beschreibt das von einem im 90° Winkel zum Laserstrahl angebrachten Detektor gemessene Streulicht. Der Detektor wandelt die auftreffende Lichtintensität in elektrische Signale um, die mit dem Computer ausgewertet werden können.

Der FSC entsteht durch Beugung an der Zelloberfläche und ist proportional zum Volumen der Zelle. Der SSC hingegen ist abhängig von der Granularität im Inneren der Zelle, ihrem Zellkern und der Anzahl der Vesikel. Anhand von SSC und FSC lassen sich durchlaufende Zellen somit nach ihrer Granularität und Größe unterscheiden und in verschiedene Fraktionen sortieren.

Um die Zellen spezifischer zu analysieren, gibt es im FACS die Möglichkeit, Oberflächenmarker und intrazelluläre Antigene mithilfe von Fluoreszenz quantitativ zu messen. Hierzu werden Antikörper mit fluoreszierenden Molekülen versetzt und die

Zellen hiermit inkubiert. Exprimiert die Zelle das passende Antigen zum zugegebenen Antikörper, bindet dieser und die Zelle ist fluoreszenzmarkiert. Von den verschiedenen Fluorochromen wurden in dieser Arbeit Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) verwendet.

Der Laser regt die Fluorochrome an, sodass sie beim Durchlaufen der Messzelle Licht einer spezifischen Wellenlänge emittieren. Das emittierte Licht wird durch Photomultiplier verstärkt und trifft auf Detektoren. Da die Detektoren nicht spezifisch nur eine Wellenlänge messen können, werden vor sie Filter zur Auftrennung der Signale geschaltet. Jeder Filter lässt nur eine spezifische Wellenlänge passieren, wodurch die Detektoren spezifisch für ein Fluorochrom werden.

Die ermittelten Ergebnisse werden über eine spezielle Software am Computer ausgewertet. Die gemessene Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit der Menge des zu analysierenden Oberflächenmarkers. Durch Messung vieler Einzelzellen erhält man Aufschluss über die Zellpopulationen in der Lösung.

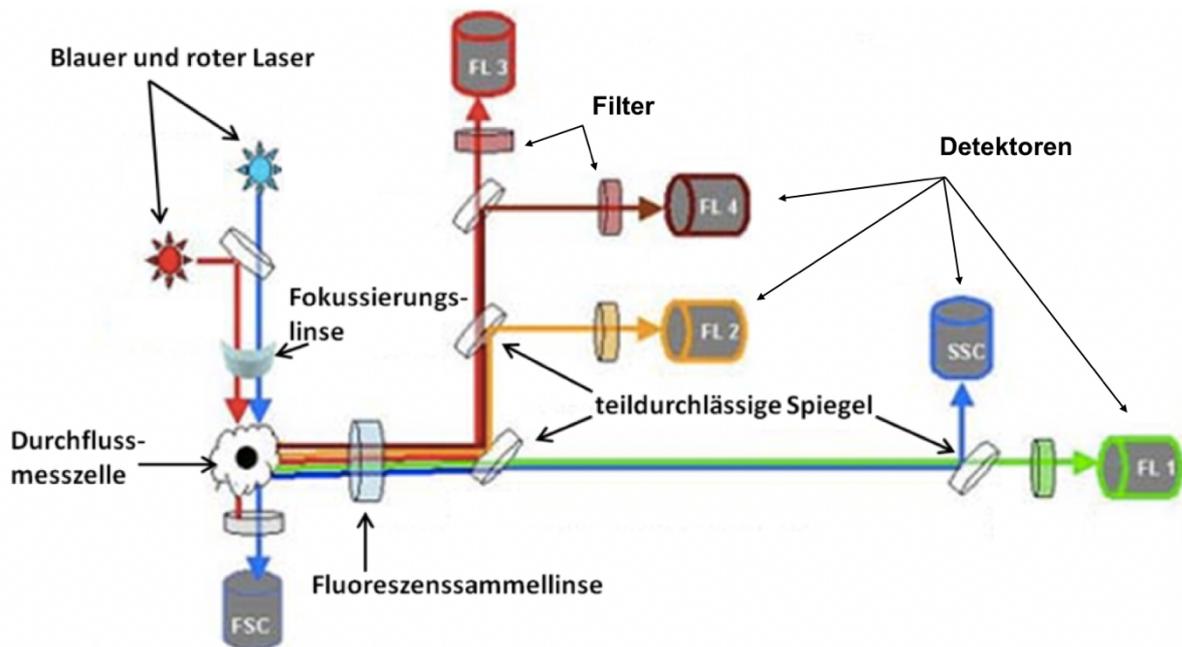


Abbildung 10: Aufbau des FACS, verändert nach (131)

Das an der Zelle gebeugte Licht wird als FSC und SSC an zwei rechtwinklig zueinander angeordneten Detektoren gemessen. Weitere Detektoren (FL1-4) detektieren Licht einer spezifischen Wellenlänge, das von den Fluorochromen auf der Oberfläche der Zelle emittiert wird. Vor die Detektoren FL1-4 geschaltete Filter sorgen für die wellenlängenspezifische Auftrennung des Lichts.

4.3.1.2 Färbeprotokoll

Alle Schritte wurden auf Eis mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Die kokultivierten Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet, in FACS-Tubes überführt und bei 4 °C und 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

Methoden

für spätere Analysen aufbewahrt und bei -20 °C eingefroren. Um eine möglichst reine Zellsuspension zu erhalten, wurde zwei Mal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen.

Im nächsten Schritt folgte die Färbung mit an Fluorochrome gebundenen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Zellen. Die Zellen wurden mit mehreren Antikörpern beladen, von den Positivkontrollen wurden Einzelfärbungen durchgeführt und eine Positivkontrolle blieb ungefärbt. Diese ungefärbte Probe wurde zur Kompensation benötigt, da auch nicht fluoreszierende Zellen in geringem Ausmaß Licht emittieren, welches die spätere Analyse beeinträchtigt und in der Auswertung subtrahiert werden muss.

Die Zellen wurden 45 Minuten mit den Antikörpern inkubiert und anschließend überschüssige, nicht gebundene Antikörper durch Zugabe und Abzentrifugieren von 1 ml FACS-Puffer entfernt. Die gefärbten beladenen Zellen wurden bis zur Messung im Durchflusszytometer in 1 % PFA-Lösung fixiert und bei 4 °C gelagert.

4.3.1.3 Bestimmung des Ausreifungsgrades von dendritischen Zellen

Nach 48 Stunden Kokultur von HSV1-infizierten Melanomzelllysaten und iDCs wurden diese geerntet und für die Analyse im Durchflusszytometer gefärbt.

Die Färbung erfolgte mit je 5 µl Anti-CD80-FITC, Anti-CD83-APC und Anti-CD86-PE. Einzelfärbungen von mDCs als Positivkontrolle wurden für alle drei Antikörper durchgeführt und eine mDC-Fraktion blieb ungefärbt.

CD80, CD83 und CD86 sind Moleküle auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, die bei deren Ausreifung hochreguliert werden. CD80 und 86 sind als kostimulatorische Moleküle an der Aktivierung von CTLs beteiligt. Sie binden CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, welche in der Aktivierung von CTLs und der Produktion von IL-2 resultiert (52, S.62).

CD83 gilt als Ausreifungsmarker von DCs. Es wird auf der Oberfläche von T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert und moduliert reziprok die Immunantwort, indem es sowohl die Ausreifung dendritischer Zellen als auch die Aktivierung von T-Lymphozyten stimuliert (132).

Eine vermehrte Expression der drei CD-Moleküle spräche somit für eine Ausreifung von iDCs durch die Kokultur mit HSV-1-infizierten Melanomzelllysaten.

4.3.1.4 Bestimmung des Aktivierungsgrades von zytotoxischen T-Zellen

48 Stunden nachdem die T-Zellen zur Kokultur aus Melanomzelllysaten und iDCs gegeben wurden, wurden diese geerntet und gefärbt.

Um den Aktivierungsgrad der CTLs zu analysieren, wurden die Antikörper Anti-CD4-PE, Anti-CD8-FITC und Anti-CD69-APC verwendet. Einzelfärbungen wurden an mit CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen durchgeführt und eine T-Zell-Kontrolle blieb ungefärbt.

CD4 ist das charakteristische Oberflächenmolekül von T-Helfer-Zellen. Es fungiert als Korezeptor für den $\alpha\beta$ TCR der T_H-Zelle, wodurch MHC-II auf dendritischen Zellen gebunden werden kann und so die Erkennung von präsentierten Antigenen ermöglicht wird (52, S.13).

Zytotoxische T-Zellen hingegen sind charakterisiert durch CD8 auf ihrer Oberfläche. CD8 vermittelt als Korezeptor für $\alpha\beta$ TCR die Interaktion zwischen der zytotoxischen T-Zelle und MHC-I auf der Oberfläche von somatischen Zellen (52, S.15). Diese Interaktion ist ein notwendiges Signal zur Aktivierung von CTLs.

CD69 ist ein Aktivierungsmarker von CTLs, der bereits in den ersten Stunden nach der Aktivierung exprimiert wird (133). Somit wird eine erhöhte CD69-Expression auf T-Zellen in dieser Arbeit als Zeichen ihrer Aktivierung gewertet.

4.3.2 Quantitative Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA

Mittels eines *Enzyme linked Immunosorbent Assays* (ELISA) können Zytokine quantitativ antikörperbasiert nachgewiesen werden. Das Prinzip ist Abbildung 11 dargestellt.

Beim sogenannten Sandwich-Elisa wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit einem spezifisch gegen das zu bestimmende Zytokin gerichteten Capture Antikörper beschichtet. Nach einer Nacht Inkubationszeit bei 4 °C wurden nicht gebundene Antikörper durch einmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,05 % Tween 20) entfernt und die leeren Bindungsstellen durch Zugabe von 200 μ l BSA-haltigem Blockpuffer gesättigt, da diese sonst unspezifisch Proteine binden würden. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die zu untersuchenden Proben in doppelter Ausführung zu je 100 μ l auf die Platte aufgetragen. Zur Konzentrationsermittlung wurde eine Standardverdünnungskurve des zu untersuchenden Antigens aufgetragen, aus der später eine Kalibrierungskurve errechnet wurde.

Methoden

Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die nicht gebundenen Partikel durch mehrmaliges Waschen entfernt und ein zweiter, ebenfalls gegen das Zielantigen gerichteter Biotin-gekoppelter Antikörper, der sogenannte Detection Antikörper, aufgetragen. Die beiden Antikörper bilden nun ein „Sandwich“ mit dem Antigen in der Mitte. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ungebundenen Antikörper abermals gewaschen und ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper (Avidin-HRP bzw. Streptavidin-HRP) zugegeben. Der Sekundärantikörper detektiert den Biotin-gekoppelten Detection Antikörper. Nach Zugabe von 100 µl TMB kam es durch eine enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag von farblos zu blau. Anhand dieses Farbumschlags, der in seiner Intensität proportional zur Antigenmenge ist, wird diese messbar. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂SO₄ abgestoppt und die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm fotometrisch gemessen. Die Konzentration des Analysats in den einzelnen Lösungen wurde mithilfe der Kalibrierungskurve errechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ELISA Kits der Firma Invitrogen benutzt und es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Als Lösung dienten die Überstände der Kokultur, die bei -20 °C gelagert wurden. In den Überständen befanden sich die von den Immunzellen durch Aktivierung produzierten Zytokine.

Zur Analyse der Ausreifung dendritischer Zellen wurden die Konzentrationen an IL-6, TNF- α und GM-CSF untersucht.

Zur Analyse der CTL-Aktivierung wurde die Konzentration von IL-2 untersucht.

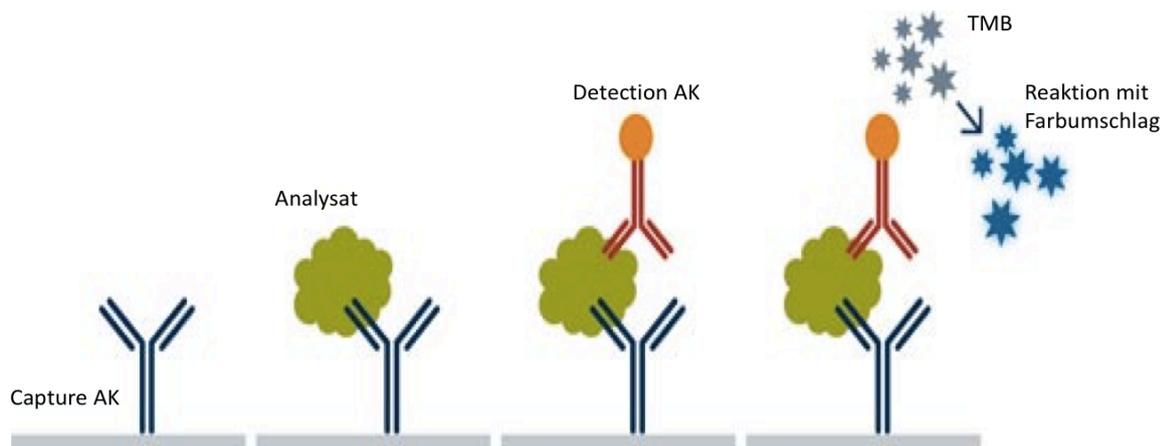


Abbildung 11: Prinzip des Sandwich ELISAs, verändert nach (134)

Die Platte wird mit einem Capture Antikörper gegen das Analysats beschichtet, welches bei Zugabe daran bindet. Der Detection Antikörper gegen das Analysat bindet mit diesem und dem Capture Antikörper ein „Sandwich“. Nach Zugabe des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers und des TMBs kommt es zum Farbumschlag.

5 Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche werden im folgenden Kapitel dargestellt. Es sollte die tumorspezifische Immunantwort durch HSV-1-induzierte Melanomzelllysate charakterisiert und der Einfluss des im T-VEC-Genom verankerten humanen GM-CSF auf diese untersucht werden. In zwei getrennten Versuchsreihen wurde zuerst der Einfluss der Virusinfektion auf die Ausreifung von dendritischen Zellen und im Anschluss auf die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten untersucht. Es sollten zudem Aussagen über die Kombination der Viren mit einer Zytostatikabehandlung gewonnen werden, weshalb diese in beiden Versuchsreihen zusätzlich untersucht wurde.

5.1 Analyse der Ausreifung dendritischer Zellen nach Kokultur mit HSV-1 induzierten Tumorzelllysaten und Zytostatikabehandlung

Melanomzellen der Zellreihen SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 wurden mit den HSV-1-Abkömmlingen T-VEC oder JS1 infiziert und zusätzlich mit den Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin oder Vincristin behandelt. Die hierdurch entstandenen Tumorzelllysate wurden mit aus humanem Vollblut separierten iDCs kokultiviert und nach 48 Stunden geerntet. Die Generierung von iDCs aus PBMCs wurde wie im Kapitel Methoden beschrieben durchgeführt. Es wurden Kombinationen von Zytostatika- und Virusbehandlung sowie die jeweilige Monotherapie als Vergleich untersucht.

Als Positivkontrolle dienten durch einen Zytokincocktail zur Ausreifung gebrachte DCs (mDC) und als Negativkontrolle wurden nicht kokultivierte iDCs ohne Ausreifungsstimulus ausgesät und gemessen.

5.1.1 Expression der Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86

Zur Analyse des immunmodulatorischen Potentials der Viren wurde die Ausreifung der DCs durchflusszytometrisch anhand der Marker CD80, CD83 und CD86 untersucht. Diese Proteine werden nach Ausreifung vermehrt auf der Oberfläche der DCs exprimiert und lassen so Rückschlüsse auf deren Reifegrad zu (62). CD80 und CD86 dienen als Koliganden der Interaktion mit T-Lymphozyten, CD83 ist ein direkter Marker der DC-Ausreifung und auf unreifen dendritischen Zellen kaum vorhanden. Die aus der Kokultur geernteten Lysate wurden mit spezifischen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und mit einem FACS-Gerät analysiert.

5.1.1.1 CD80 und CD86

Abbildung 12 zeigt den Anteil der CD80- und CD86-positiven Zellen an allen sich in der Kokultur befindenden Zellen. Dieser Anteil entspricht somit den ausgereiften DCs, die diese Koliganden vermehrt exprimieren. Es zeigt sich, dass die Ausreifung mittels Zytokincocktail zu einer Expression beider Marker von 43,0 % führte. Die ohne Ausreifungsstimulus kultivierten iDCs waren nur zu 6,7 % CD80⁺/CD86⁺, was gegen eine Ausreifung dieser spricht.

Für die im linken Teil der Abbildung dargestellten SK29-MEL-1 zeigte sich keine verstärkte DC-Ausreifung durch reine Infektion mit JS1 oder T-VEC. Im Vergleich zu nicht behandelten Melanomzellen (8,0 % CD80⁺/CD86⁺) erreichte die Kokultur mit JS1-infizierten Zellen mit 5,3 % und mit T-VEC mit 4,9 % sogar geringere Ausreifungswerte.

Die Behandlung der Melanomzellen mit Vincristin führte zu einer vermehrten Expression der Koliganden, jedoch konnte der Wert von 20,5 % nach Monotherapie nicht durch die zusätzliche Infektion mit JS1 oder T-VEC übertroffen werden. Cisplatin zeigte weder in Mono- noch in Kombinationstherapie einen von den unbehandelten Zellen verschiedenen Einfluss auf die Ausreifung. Doxorubicin alleine war in der Lage, die Expression der Reifemarker geringfügig zu erhöhen, zusätzlich konnte hier ein Einfluss der Virusinfektion festgestellt werden. Nach der Doxorubicinmonotherapie fand sich im FACS ein Anteil von 11,5 % CD80⁺/CD86⁺ Zellen, der durch JS1 auf 13,7 % und durch T-VEC auf 17,5 % gesteigert wurde.

Im rechten Teil der Abbildung 12 ist die Reaktion der mit SK29-MEL-1.22-Lysaten kokultivierten DCs dargestellt. Es zeigte sich eine insgesamt erhöhte Expression der untersuchten Marker. Auffällig ist der hohe Wert von 33,1 % bei mit unbehandelten SK29-MEL-1.22 kokultivierten iDCs. Die Infektion mit onkolytischen Viren alleine reduzierte die Ausreifung bis auf 10,1 % durch T-VEC. Vincristin und Cisplatin zeigten im Vergleich zu unbehandelten Melanomzellen keine verstärkte Induktion der DC-Ausreifung und auch deren Kombination mit JS1 oder T-VEC hatte darauf keinen positiven Einfluss. Die Doxorubicin-Monotherapie führte zu einer CD80/CD86-Expression von 36,3 %, welche durch zusätzliche Virusinfektion auf etwa 39 % erhöht wurde. Ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Virusstämmen ließ sich nicht erkennen.

Die durch Zytostatikabehandlung und Virusinfektion generierten Tumorzelllysate waren somit in der Lage, die DC-Ausreifung bezüglich der Expression von CD80 und

CD86 in unterschiedlichem Ausmaß zu induzieren. Als potenteste Stimuli erwiesen sich für beide Zelllinien die Kombination aus Doxorubicin und T-VEC und für SK29-MEL-1 zusätzlich die Monotherapie mit Vincristin.

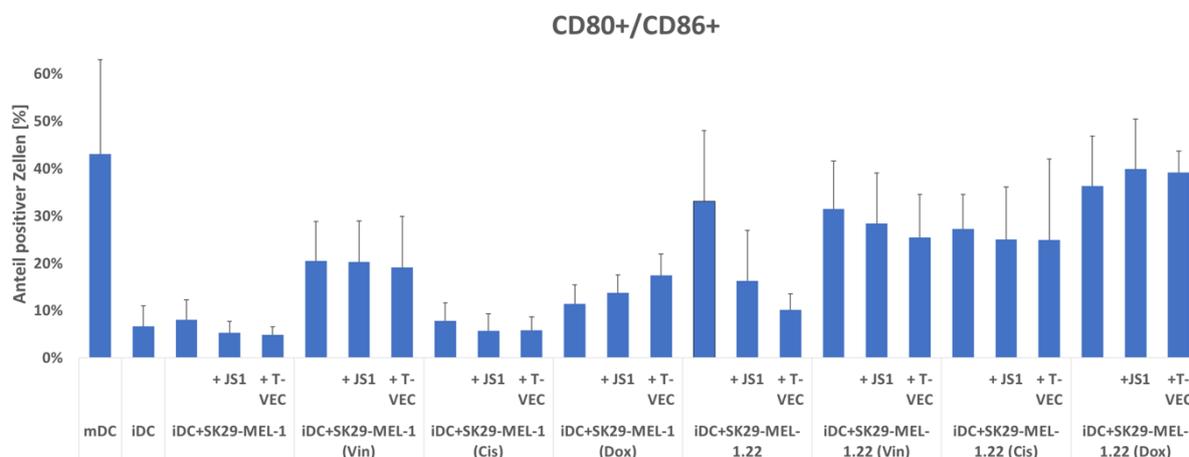


Abbildung 12: CD80/86-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der Expression von CD80 und CD86 auf iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und auf iDCs nach der Kokultivierung mit durch verschiedene Behandlungen generierten Melanomzelllysaten der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin (Vin), Cisplatin (Cis) und Doxorubicin (Dox) jeweils alleine und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine tendenziell gesteigerte Expression nach Behandlung mit Vincristin alleine und Doxorubicin, welche durch T-VEC verstärkt wird.

5.1.1.2 CD86 und CD83

Abbildung 13 stellt die Expression der Marker CD86 und CD83 im FACS dar. Es wird der Anteil der ausgereiften, somit CD83⁺ Zellen unter allen CD86⁺ Zellen abgebildet. Unter den durch Zytokincocktail zur Ausreifung induzierten DCs stellten sich durchschnittlich 27,5 % CD83⁺/CD86⁺ dar. Unstimulierte, nicht kokultivierte iDCs reiften wie erwartet nicht aus und erreichten eine Expressionsdichte der beiden Marker von 2,4 %.

Nach Kokultivierung von iDCs und unbehandelten SK29-MEL-1 zeigte sich ein CD83⁺/86⁺ Anteil von 5,2 % der Zellen, welcher durch die Infektion mit JS1 oder T-VEC nicht erhöht wurde. Hier scheint somit keine relevante Ausreifung stattgefunden zu haben. Die Behandlung mit Vincristin alleine zeigte die Tendenz, die Ausreifung zu steigern (9,4%), die Kombination mit onkolytischen Viren reduzierte sie jedoch. So erreichten iDCs, die mit durch Vincristin und T-VEC generierten SK29-MEL-1-Lysaten kokultiviert wurden, eine Ausreifung von 5,0 %. Cisplatin zeigte weder in Mono- noch in Kombinationsbehandlung einen Effekt, der sich von dem unbehandelten SK29-MEL-1 unterschied. Die Kombination aus Cisplatin und T-VEC reduzierte die Expression von CD83 und CD86 sogar auf 2,1 %, was im Bereich der unstimulierten

Ergebnisse

iDCs liegt. Auch die Doxorubicinbehandlung war nicht in der Lage, die Ausreifung stärker als unbehandelte Melanomzellen zu induzieren, jedoch zeigt sich hier eine minimale positive Tendenz durch die Kombination mit T-VEC, wonach 8,2 % der Zellen die beiden untersuchten Marker exprimierten.

Wie bei der Untersuchung von CD80 und CD86 bereits beobachtet, zeigt auch die Messung von CD83 und CD86 generell erhöhte Werte in der Kokultur von iDCs und den HLA-A2⁻ SK29-MEL-1.22. Nicht behandelte Melanomzellen dieser Linie induzierten die Ausreifung der DCs zu 11,8 %. Die einfache Infektion mit JS1 oder T-VEC reduzierte die Expressionsrate bei dieser Zellreihe jedoch in stärkerem Ausmaß, sodass sich nach T-VEC-Infektion nur noch 3,4 % CD83⁺/CD86⁺ darstellten. Vincristin und Cisplatin zeigten miteinander vergleichbare Effekte: Die Monotherapie war jeweils in der Lage, einen geringen positiven Einfluss auf die Ausreifung zu nehmen (16,1 % bzw. 13,0 %), die Kombination mit JS1 reduzierte diese jedoch auf niedrigere Werte als bei unbehandelten SK29-MEL-1.22 (9,2 % bzw. 8,2 %) und in Kombination mit T-VEC zeigten sich noch geringere Ausreifungsraten (6,6 % bzw. 4,1 %). Doxorubicin induzierte in Mono- und Kombinationstherapie leicht verstärkt die Ausreifung und zeigte als einziges Zytostatikum eine tendenzielle Verbesserung durch Kombination mit T-VEC auf 17,4 %.

Die Tumorzelllysate zeigten sich somit auch in Bezug auf die CD83/86-Expression in der Lage, die DC-Ausreifung in unterschiedlichem Ausmaß zu induzieren. Wie bereits für CD80/86 beobachtet, zeigten sich auch in dieser Untersuchung die Kombination aus Doxorubicin und T-VEC und für SK29-MEL-1 zusätzlich Vincristin als potenteste Stimuli. Cisplatin induzierte keine verstärkte Ausreifung und wurde durch Kombination mit onkolytischen Viren in seinem immunmodulatorischen Effekt tendenziell gehemmt.

CD86+/83+

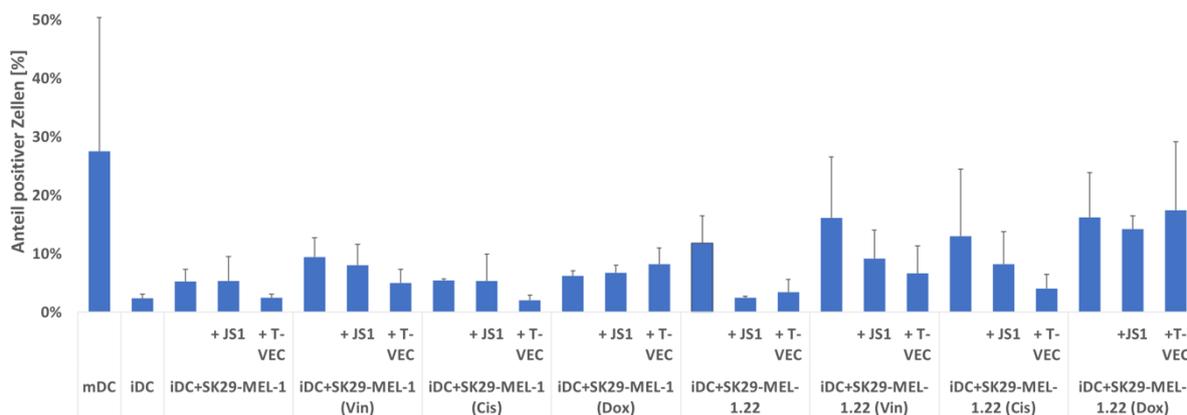


Abbildung 13: CD86/83-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der Expression von CD86 und CD83 auf iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und auf iDCs nach der Kokultur mit durch verschiedene Behandlungen generierten Melanomzelllysaten der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils alleine und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine verstärkte DC-Ausreifung durch Vincristin und Doxorubicin, die im Fall von Vincristin durch T-VEC gehemmt und im Fall von Doxorubicin verstärkt wird.

5.1.2 Produktion proinflammatorischer Zytokine

Zusätzlich zur Untersuchung der Oberflächenmarker wurde die Abgabe immunstimulierender Zytokine untersucht, welche durch reife dendritische Zellen vermehrt produziert werden. Als Zeichen der DC-Ausreifung gelten unter anderem erhöhte Mengen von IL-6 und TNF- α (62) und einem Entzündungsstimulus folgt eine vermehrte GM-CSF-Produktion (135). Die Zytokinproduktion durch mDCs hat den Zweck, eine T-Zell-Proliferation und die Differenzierung von T_H-Zellen zu bewirken. Der Zellkulturüberstand wurde nach Zentrifugation mittels Sandwich-ELISA quantitativ auf deren Gehalt hin untersucht.

5.1.2.1 IL-6

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen die gemessene IL-6-Konzentration in pg/ml in den Überständen der Kokultur aus Melanomzelllysaten und iDCs. Die Ergebnisse für SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 werden getrennt dargestellt. Es zeigt sich, dass die durch den Zytokincocktail stimulierten DCs (mDCs) eine auf 731 pg/ml erhöhte IL-6-Produktion aufwiesen und somit eine erfolgte Ausreifung angenommen werden kann. Unstimulierte und nicht kokultivierte iDCs hingegen produzierten wie erwartet nahezu kein IL-6.

Für SK29-MEL-1 zeigte sich keine verstärkte IL-6-Produktion durch eine reine Virusbehandlung. Im Gegenteil fiel diese mit 38,5 pg/ml (JS1) und 22,2 pg/ml (T-VEC)

Ergebnisse

sogar tendenziell geringer als die der mit unbehandelten SK29-MEL-1 kokultivierten iDCs (56,7 pg/ml). Auch die Behandlung mit Cisplatin alleine oder in Kombination mit JS1 bzw. T-VEC zeigte wie schon im FACS keinen über die unbehandelten Melanomzellen hinausgehenden Effekt. Die Behandlung mit Vincristin erhöhte die IL-6-Produktion der DCs auf 94,6 pg/ml, wobei durch die Kombination mit onkolytischen Viren kein zusätzlicher Effekt beobachtet wurde. Doxorubicin führte schon alleine zu einer doppelt so hohen IL-6-Produktion im Vergleich zu nicht behandelten Melanomzelllysaten (115 pg/ml vs. 56 pg/ml) und sein Effekt konnte durch die Infektion mit JS1 (166,9 pg/ml) und T-VEC (170,0 pg/ml) verstärkt werden. Zwischen den beiden Viren zeigte sich kein relevanter Unterschied. Die durch Kombination aus Doxorubicin und T-VEC generierten SK29-MEL-1-Lysate waren die potentesten Stimulatoren der IL-6-Produktion.

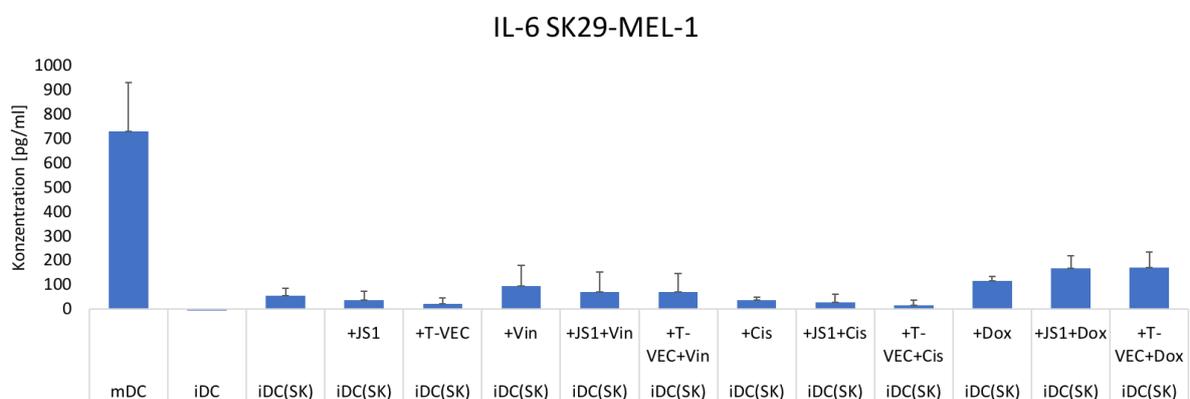


Abbildung 14: IL-6-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1
Analyse der IL-6-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschiedenen behandelten SK29-MEL-1. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine leicht verstärkte Produktion durch Behandlung mit Vincristin und Doxorubicin, wobei Vincristin durch Kombination mit den Viren abgeschwächt und Doxorubicin verstärkt wird.

In der Kokultur aus SK29-MEL-1.22-Lysaten und iDCs zeigte sich eine im Vergleich zu SK29-MEL-1 konstant erhöhte IL-6-Konzentration. Die mit unbehandelten SK29-MEL-1.22 kokultivierten iDCs sezernierten 646,9 pg/ml, was durch JS1 erhöht (828,8 pg/ml) und durch T-VEC nicht relevant (664,7 pg/ml) beeinflusst wurde. Alle drei Zytostatika verstärkten die IL-6-Produktion um etwa ein Drittel, ein positiver Einfluss der Kombination mit onkolytischen Viren konnte nicht beobachtet werden. Die höchste IL-6-Produktion wiesen mit Melanomzelllysaten aus Doxorubicinbehandlung kokultivierte iDCs auf.

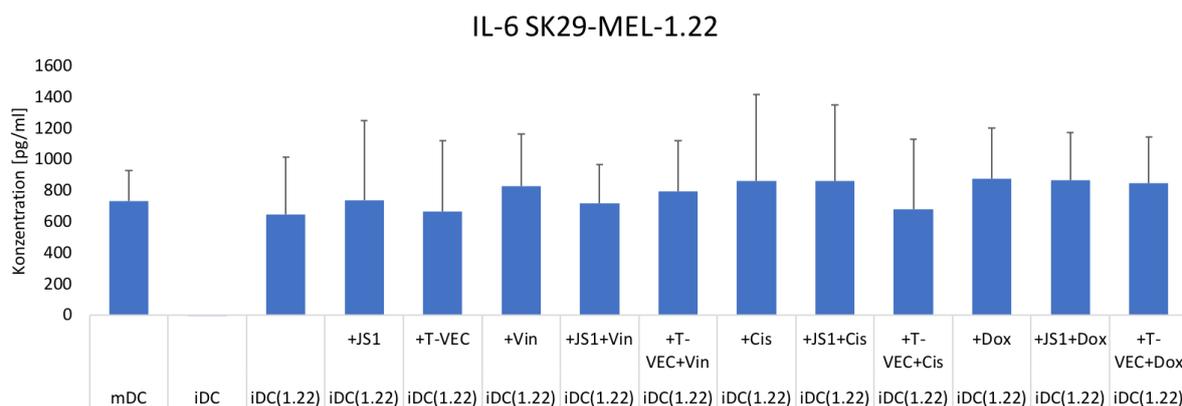


Abbildung 15: IL-6-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22. Analyse der IL-6-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschieden behandelten SK29-MEL-1.22. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine verstärkte IL-6-Produktion durch die Kokultur mit SK29-MEL-1.22-Lysaten, welche durch die Behandlung mit den Zytostatika weiter gefördert wird.

Die Ergebnisse der IL-6-ELISAs ähneln denen der FACS-Untersuchungen. Doxorubicin zeigte sich bei beiden Zelllinien als potenter Stimulator der DC-Ausreifung, sowohl alleine als auch in Kombination mit onkolytischen Viren. Auch die durch Behandlung von SK29-MEL-1 mit Vincristin induzierte DC-Ausreifung und die insgesamt erhöhte Ausreifungsrate durch die SK29-MEL-1.22-Lysate können in beiden Analysen beobachtet werden.

5.1.2.2 GM-CSF

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die Konzentration von GM-CSF im Überstand der Kokulturen aus Melanomzelllysaten beider Zelllinien und iDCs nach Behandlung mit JS1 bzw. T-VEC und den drei Zytostatika. Es zeigt sich eine erhöhte Produktion durch die mit dem Zytokincocktail ausgereiften mDCs (9645 pg/ml). Nicht kokultivierte iDCs produzierten nur sehr geringe Mengen an GM-CSF (55 pg/ml (iDC)), was auf eine nicht stattgefundenen Ausreifung hindeutet. Es zeigt sich in allen Ansätzen eine wie erwartet hohe GM-CSF-Produktion nach Infektion mit dem GM-CSF-kodierenden T-VEC.

Mit unbehandelten SK29-MEL-1 kokultivierte iDCs produzierten mit 359 pg/ml eine geringe Menge an GM-CSF. Auch die Infektion mit JS1 führte zu keiner Steigerung derselben. Durch T-VEC-Infektion generierte Melanomzelllysate induzierten die Ausreifung der DCs, was an der Erhöhung der GM-CSF-Konzentration auf 9962 pg/ml gesehen werden kann. Die Behandlung mit Zytostatika alleine oder in Kombination mit JS1 sorgte in keinem Fall für die Erhöhung der GM-CSF-Produktion. T-VEC in Kombination mit Cisplatin erreichte eine mit der reinen T-VEC-Behandlung

Ergebnisse

vergleichbare Menge von 10136 pg/ml. Durch Kombination von T-VEC mit Vincristin (4191 pg/ml) und besonders mit Doxorubicin (519 pg/ml) wurde die Sekretion von GM-CSF im Vergleich zur T-VEC-Monotherapie gesenkt, was einen hemmenden Einfluss dieser Chemotherapeutika auf die virusvermittelte DC-Ausreifung andeutet.

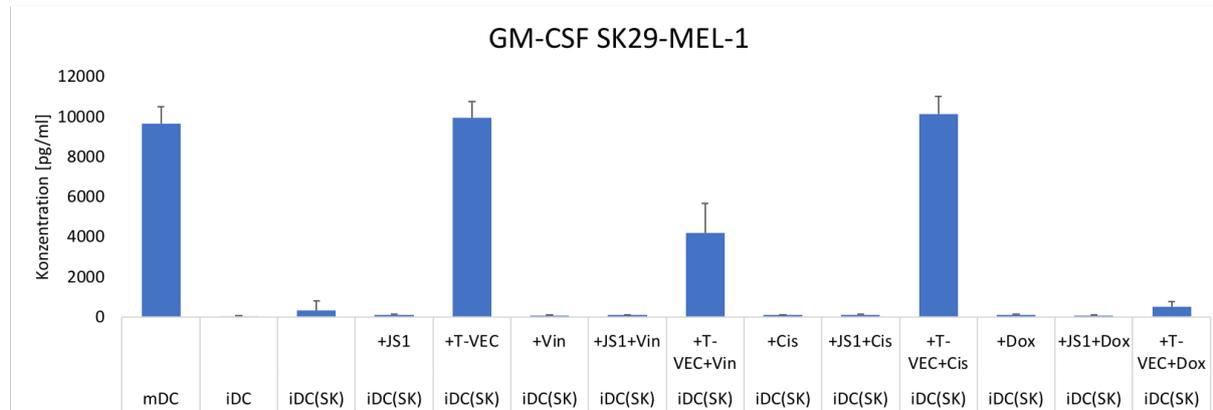


Abbildung 16: GM-CSF-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1
Analyse der GM-CSF-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschiedenen behandelten SK29-MEL-1. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Zu sehen ist eine stark vermehrte GM-CSF-Produktion durch iDCs in Kokultur mit T-VEC infizierten Melanomzelllysaten, die in Kombination mit Vincristin und Doxorubicin geringer ausfällt.

In der Kokultur der HLA-A2⁻ SK29-MEL-1.22 mit iDCs zeigte sich ein ähnliches Bild: Den stärksten Anstieg der GM-CSF-Produktion induzierte in vergleichbarem Ausmaß die reine T-VEC-Behandlung (9583 pg/ml) und deren Kombination mit Cisplatin (9569 pg/ml). Die Kombination aller drei Zytostatika mit T-VEC zeigte jeweils erhöhte Konzentrationen an GM-CSF im Vergleich zur alleinigen Zytostatikabehandlung. Die Kombination von T-VEC und Doxorubicin zeigte jedoch eine deutlich geringere GM-CSF-Produktion als die Einzelbehandlung mit T-VEC (2519 pg/ml vs. 9583 pg/ml). JS1 zeigte weder in Monotherapie noch in Kombination mit Zytostatika einen relevanten Effekt auf die GM-CSF-Konzentration im Vergleich zu mit unbehandelten Zellen kokultivierten iDCs.

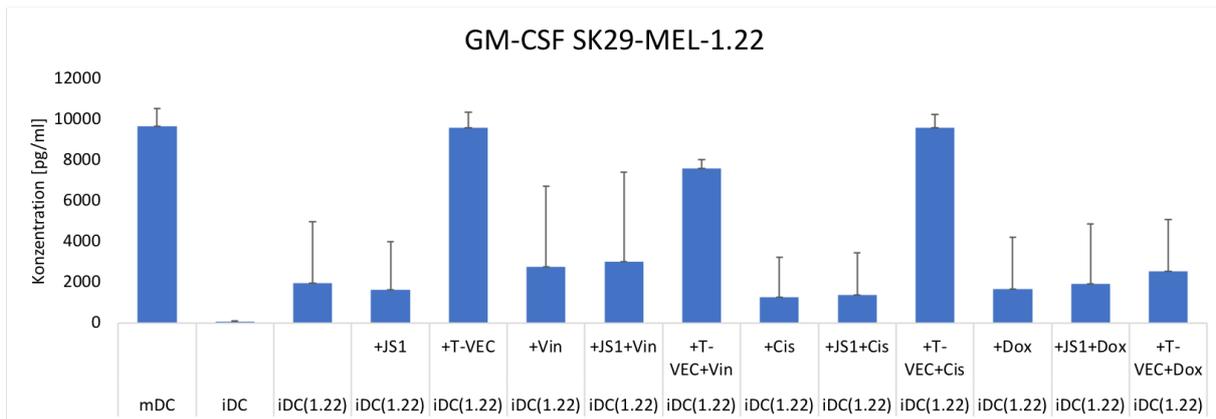


Abbildung 17: GM-CSF-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22
Analyse der GM-CSF-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschiedenen behandelten SK29-MEL-1.22. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine stark erhöhte GM-CSF-Produktion nach Kokultur mit T-VEC infizierten Melanomzelllysaten, welche in Kombination mit Doxorubicin weniger stark ausfällt.

Die erhöhte GM-CSF-Produktion in allen Kokulturen, die T-VEC-induzierte Lysate enthielten, lässt sich durch die gentechnischen Modifikationen von T-VEC erklären. Die inhibitorischen Effekte der Kombination aus T-VEC und Doxorubicin stehen jedoch im Widerspruch zu den im FACS und IL-6-ELISA gewonnenen Erkenntnissen, wonach Doxorubicin ein potenter Induktor der DC-Ausreifung ist.

5.1.2.3 TNF- α

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die TNF- α -Konzentration im Überstand der Kokultur aus durch Virusinfektion und Zytostatikabehandlung generierten Melanomzelllysaten beider Zelllinien und iDCs. Die Ausreifung der DCs durch den Zytokincocktail führte zu einer TNF- α -Konzentration von 176 pg/ml. Dieser niedrige Wert im Vergleich zu durch SK29-MEL-1.22-Lysate induzierter TNF- α -Produktion deutet an, dass eine deutliche Ausreifung durch die Stimulation mit dem Zytokincocktail nicht erfolgt ist. Besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass TNF- α mit einer Konzentration von 10 ng/ml Teil des Zytokincocktails war, scheint eine relevante zusätzliche TNF- α -Produktion durch die DCs ausgeblieben zu sein.

Die Kokultur von iDCs mit unbehandelten SK29-MEL-1 bewirkte bereits eine mit den mDCs vergleichbare TNF- α -Produktion von 149 pg/ml. Die Infektion mit T-VEC und JS1 hatte auf diese einen geringen hemmenden Einfluss. Alleinige Zytostatikabehandlung erhöhte bei keinem der drei Wirkstoffe die TNF- α -Konzentration. Die Kombinationen aus T-VEC und jedem der drei Zytostatika zeigten größere TNF- α Mengen als die jeweilige Monotherapie, jedoch wurde der Wert der

Ergebnisse

unbehandelten Melanomzellen nur durch Vincristin mit T-VEC übertroffen (184 pg/ml). Doxorubicin alleine blockierte die TNF- α -Produktion, was auf einen hemmenden Einfluss in Bezug auf die DC-Ausreifung hindeutet. Diese Beobachtung wurde bereits im GM-CSF-ELISA gemacht, jedoch zeigte sich in Bezug auf die CD80/86-Expression und IL-6-Konzentration eine Ausreifungsinduktion durch Doxorubicin.

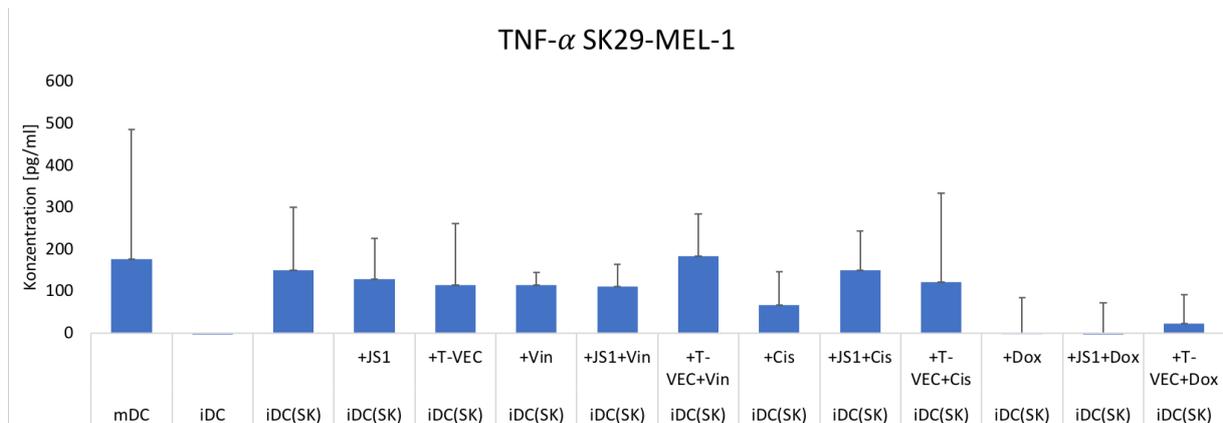


Abbildung 18: TNF- α -Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1

Analyse der TNF- α -Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschieden behandelten SK29-MEL-1. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine vermehrte TNF- α -Produktion durch Behandlung der Melanomzellen mit Vincristin und T-VEC.

Die Kokultur aus iDCs und Lysaten der Zelllinie SK29-MEL-1.22 zeigte durchweg erhöhte TNF- α -Konzentrationen im Vergleich zu SK29-MEL-1. Ein Unterschied zwischen den Behandlungen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Alle Ansätze zeigten eine um das 17- bis 20fache größere TNF- α -Produktion als die durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs.

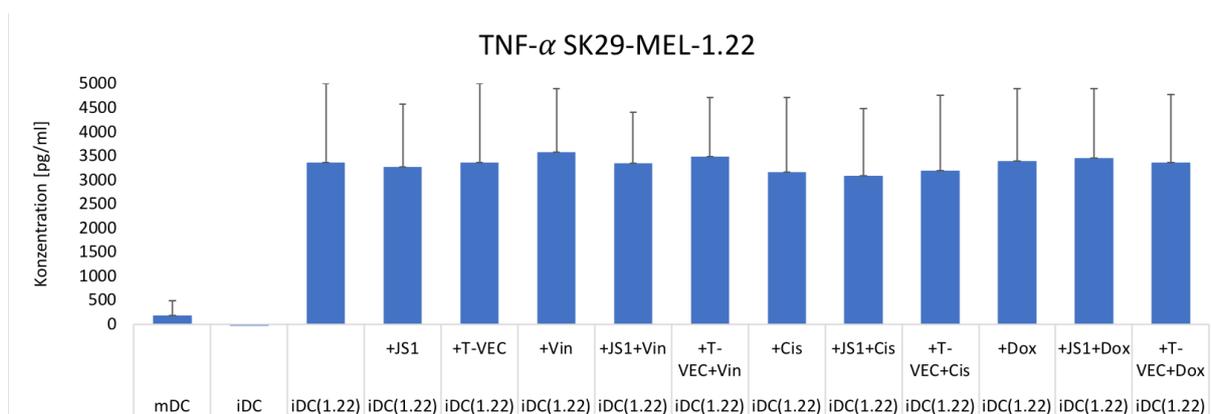


Abbildung 19: TNF- α -Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22

Analyse der TNF- α -Produktion mittels Sandwich-ELISA durch iDCs, durch Zytokincocktail ausgereiften mDCs und iDCs nach Kokultur mit verschieden behandelten SK29-MEL-1.22. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine durch die Kokultur stark erhöhte TNF- α -Produktion ohne Differenz zwischen den verschiedenen Behandlungen.

5.2 Analyse der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen nach Kokultur mit HSV-1 induzierten Tumorzelllysaten und iDCs und Zytostatikabehandlung

Für die Untersuchung der T-Zell-Reaktion wurden die Melanomzellen der Reihen SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 mit JS1 oder T-VEC infiziert und zusätzlich mit den drei Zytostatika behandelt. Es wurden Kombinationen aus Zytostatika und Virus bzw. die jeweilige Monotherapie untersucht. Die entstandenen Tumorzelllysate wurden im Abstand von je 24 Stunden mit aus humanen PBMCs separierten iDCs und HLA-identischen T-Zellen kokultiviert und nach 48 Stunden geerntet. iDCs und T-Zellen wurden wie im Kapitel Methoden beschrieben isoliert. Den T-Lymphozyten wurden unabhängig von ihrer Kokultur 100 IU/ml Proleukin 2 zugesetzt, um die Aktivierung der CTL zu initiieren. Als Positivkontrolle dienten mit je 1 μ l/ml CD3 und CD28 stimulierte und dadurch aktivierte T-Zellen (T-Zellen*), nicht kokultivierte T-Zellen ohne zusätzlichen Aktivierungsstimulus dienten als Negativkontrolle.

5.2.1 Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD69

Der Aktivierungsgrad der T-Lymphozyten wurde im FACS anhand der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD69 untersucht. CD4 und CD8 charakterisieren den Subtyp der T-Lymphozyten (CD4⁺ T_H oder CD8⁺ CTL) und CD69 gilt als früher T-Zell-Aktivierungsmarker (133). Er wird bei deren Aktivierung innerhalb von 30 Minuten hochreguliert und bleibt bis zu 72 Stunden messbar (133).

5.2.1.1 CD4 und CD69

Abbildung 20 stellt die Aktivierung der T_H-Zellen dar, welche durch die gleichzeitige Expression von CD4 und CD69 auf deren Oberfläche charakterisiert ist. Dargestellt ist der Anteil an Zellen in der Kokultur in Prozent, welche beide Oberflächenmoleküle exprimieren. Die durch Zugabe von CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen zeigten eine CD4- und CD69-Expression, also eine T_H-Aktivierung, von 36 %. Im Gegensatz dazu exprimierten nicht stimulierte und nicht kokultivierte T-Zellen nur zu 3 % beide Marker und waren somit – wie erwartet – nicht aktiviert.

Es zeigte sich eine ausgeprägte T_H-Aktivierungssteigerung auf 27 % durch Kokultur mit iDCs und unbehandelten Melanomzellen der Linie SK29-MEL-1. Die Infektion der Melanomzellen mit JS1 bzw. T-VEC induzierte eine Erhöhung der CD4/CD69-Expression auf 34 % bzw. 33 %. Die Behandlung mit Vincristin zeigte alleine (29 %) und in Kombination mit JS1 (27 %) keinen relevant über den

Ergebnisse

unbehandelter SK29-MEL-1 hinausgehenden Effekt, die Kombination aus Vincristin und T-VEC steigerte die T_H-Aktivierung hingegen auf 31 %. Durch Cisplatin allein generierte Melanomzelllysate erreichten eine vermehrte Expression von CD4 und CD69 auf den T-Zellen von 37 %. Durch die Kombination mit JS1 und vor allem durch T-VEC wurde diese jedoch auf bis zu 31 % reduziert, was einen inhibitorischen Effekt der Kombination vermuten lässt. Eine ähnliche Tendenz zeigte die Behandlung von SK29-MEL-1 mit Doxorubicin. Die Monotherapie induzierte die Aktivierung auf einen Anteil von 36 %, wurde durch JS1 sogar noch um 2% gesteigert und sank durch Kombination mit T-VEC auf 34 %.

Im rechten Teil der Abbildung ist die CD4/CD69-Expression nach Kokultur mit Lysaten der Zelllinie SK29-MEL-1.22 dargestellt. Die unbehandelten Melanomzellen induzierten die Aktivierung von T_H-Zellen zu 28%, wobei bei dieser Zelllinie die Infektion mit JS1 (19 %) und besonders mit T-VEC (12 %) zu einer Reduktion der Aktivierungsrate führte. Die Behandlungen der Melanomzellen mit Vincristin und Cisplatin führten alleine und in Kombination mit T-VEC nicht zu einer gesteigerten Expression von CD4 und CD69 im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen. Lediglich durch die Kombination mit JS1 konnte in beiden Fällen eine geringe Steigerung um jeweils 4 % erreicht werden. Die durch Doxorubicin generierten Melanomzelllysate induzierten eine 30 %ige Aktivierung von T_H-Zellen, welche jedoch durch zusätzliche Infektion mit JS1 oder T-VEC nicht gesteigert wurde.

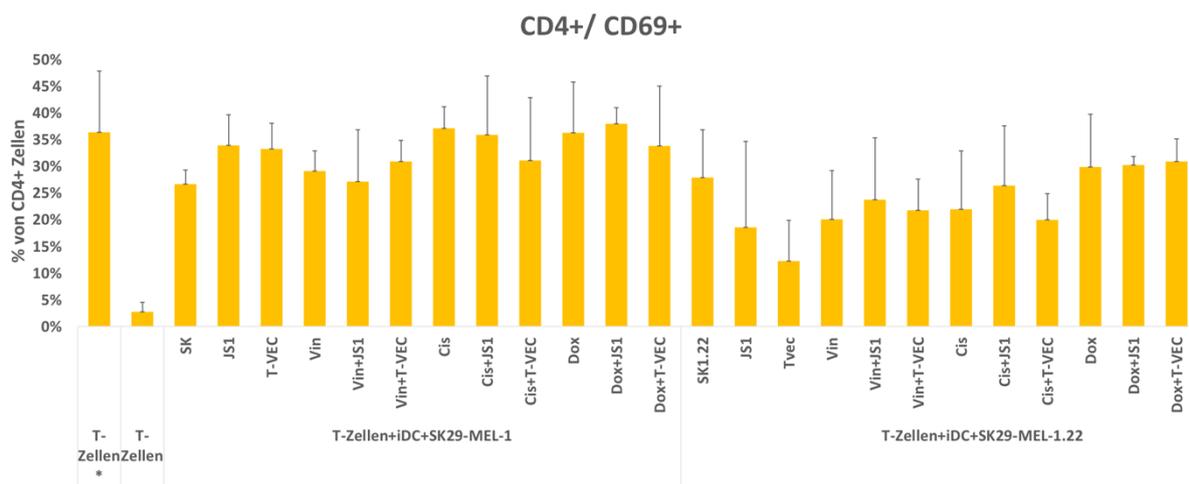


Abbildung 20: CD4/CD69-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der Expression von CD4 und CD69 auf T-Zellen, durch CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen (*) und auf T-Zellen nach der Kokultur mit durch verschiedene Behandlungen generierten Melanomzelllysaten der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 und iDCs. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils alleine und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine gesteigerte Expression nach Kokultur mit Tumorzelllysaten, wobei das Ausmaß zwischen den Zelllinien und Behandlungen variiert.

Die Melanomzelllysate zeigten somit ihr Potential, die Aktivierung der T_H-Zellen, gemessen anhand von CD4 und CD69, zu induzieren. Als potentester Stimulus zeigte sich in den Versuchen für SK29-MEL-1 die Kombinationsbehandlung aus Doxorubicin und JS1 und für SK29-MEL-1.22 Doxorubicin mit T-VEC.

5.2.1.2 CD8 und CD69

In Abbildung 21 sieht man den Anteil der Zellen in der Kokultur, welche CD8 und CD69 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Dieser Anteil entspricht den gegen die Tumorantigene aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten. Es zeigt sich, dass durch die Stimulation mit CD3 und CD28 38 % der T-Lymphozyten zu CTL aktiviert wurden, wohingegen T-Zellen ohne zusätzlichen Aktivierungsstimulus nur zu 6 % CD8⁺/CD69⁺ und somit nicht relevant aktiviert waren.

Die Kokultur der T-Zellen mit iDCs und unbehandelten Zellen der Linie SK29-MEL-1 induzierte eine 19 %ige CTL-Aktivierung, welche durch JS1 auf 24 % und durch T-VEC auf 23 % gesteigert wurde. Eine Vincristinbehandlung war alleine und in Kombination mit den onkolytischen Viren nicht in der Lage, die Aktivierung stärker als unbehandelte SK29-MEL-1 zu induzieren. Die durch Cisplatin und Doxorubicin generierten Tumorzelllysate führten zu einer vermehrten CTL-Aktivierung von jeweils 28 %. Durch die Kombination aus JS1 und Doxorubicin wurden 30 % der Zellen CD8⁺/CD69⁺, T-VEC senkte in Kombination mit beiden Zytostatika die Aktivierungsrate.

Für die im rechten Abbildungsteil dargestellten Kokulturen aus SK29-MEL-1.22-Lysaten, iDC und T-Zellen zeigt sich, dass keine der Behandlungen eine stärkere Induktion der CTL-Aktivierung bewirkte als die unbehandelten Melanomzellen. T-Zellen, die mit unbehandelten SK29-MEL-1.22 und iDCs kokultiviert wurden, exprimierten zu 23 % die beiden gemessenen Marker CD8 und CD69. Dieser Anteil wurde nur durch die Kombination aus Doxorubicin und T-VEC erreicht. Die einfache Infektion der Melanomzellen reduzierte die CTL-Aktivierung im Fall von JS1 auf 11 %, von T-VEC auf 8 %. Auch in Kombination mit Cisplatin zeigte sich tendenziell ein hemmender Effekt durch die Kombination aus Zytostatikum und Virus.

Ergebnisse

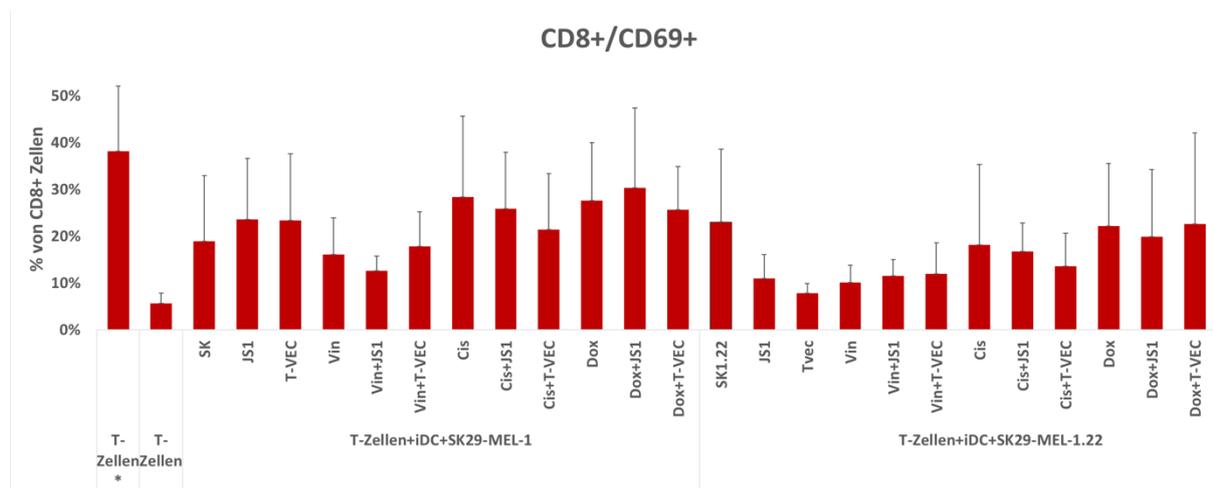


Abbildung 21: CD8/CD69-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der Expression von CD8 und CD69 auf T-Zellen, durch CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen (*) und auf T-Zellen nach der Kokultur mit durch verschiedene Behandlungen generierten Melanomzelllysaten der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 und iDCs. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils alleine und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es zeigt sich eine gesteigerte Expression nach Kokultur mit Tumorzelllysaten, wobei das Ausmaß zwischen den Zelllinien und Behandlungen variiert.

Die Aktivierung von CTLs kann somit durch Melanomzelllysate induziert werden. Für SK29-MEL-1 zeigte Doxorubicin mit JS1 und für SK29-MEL-1.22 die unbehandelten Melanomzellen gleichermaßen wie die Kombination aus Doxorubicin und T-VEC die stärkste CTL-Stimulation. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der T_H -Aktivierung überein. Insgesamt zeigt sich, wie in Abbildung 22 zu sehen ist, in allen Ansätzen eine stärkere CD4- als CD8-Antwort durch die Kokultur von Melanomzelllysaten, iDCs und T-Lymphozyten.

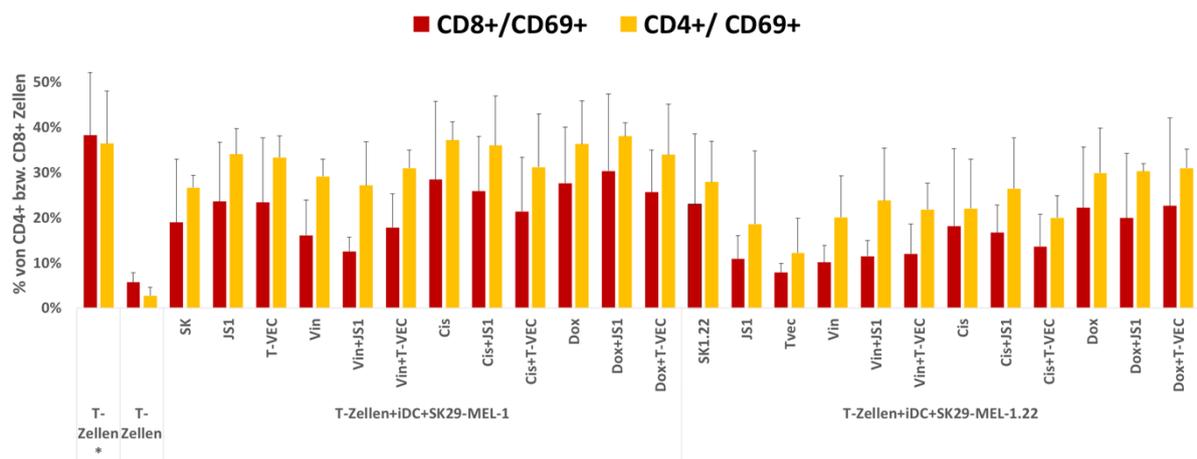


Abbildung 22: Vergleich der CD4- und CD8- Aktivierung nach Kokultur mit Melanomzelllysaten und iDCs. Es zeigt sich unabhängig von der Behandlung eine stärkere CD4- als CD8-Aktivierung.

5.2.2 Produktion proinflammatorischer Zytokine

Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten sezernieren vermehrt immunstimulatorische Zytokine und induzieren so ihre eigene Proliferation und Differenzierung (55). Ihre

Konzentration ist somit als zusätzliches Zeichen der CTL-Aktivierung zu untersuchen. IL-2 wurde hierfür aus den durch Zentrifugation gewonnenen Überständen der Kokultur quantitativ mittels ELISA bestimmt.

5.2.2.1 IL-2

Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen die IL-2 Konzentration im Überstand nach der Kokultur von Melanomzelllysaten, iDCs und T-Lymphozyten. Den T-Lymphozyten wurden je 100 IU/ml Proleukin 2 in Kultur zugegeben. Diese Menge Proleukin 2 wird, da bei allen Ansätzen gleich, nicht berücksichtigt. Die mit CD3 und CD28 stimulierten und somit aktivierten CTLs sezernierten 859 pg/ml IL-2. Nicht stimulierte T-Zellen hingegen zeigten erwartungsgemäß keine Aktivierung und produzierten nur 121 pg/ml.

Die Kokultur der T-Zellen und iDCs mit Melanomzellen sorgte bei beiden Zelllinien für eine Erhöhung der IL-2-Produktion im Vergleich zu nicht kokultivierten T-Zellen. Ein Unterschied der IL-2-Produktion zwischen nicht behandelten und infizierten bzw. mit Zytostatika behandelten Melanomzellen konnte jedoch in beiden Zelllinien nicht festgestellt werden. Die Konzentration von IL-2 bei mit unbehandelten SK29-MEL-1 kokultivierten T-Zellen lag bei 213 pg/ml und ließ sich maximal auf 223 pg/ml durch Behandlung mit Cisplatin steigern. Für mit unbehandelten SK29-MEL-1.22-Zellen kokultivierte T-Zellen lag sie bei 220 pg/ml. Dieser Wert wurde durch keine der getesteten Behandlungen übertroffen. Es konnte kein Effekt der Virus- und Zytostatikabehandlung auf die IL-2-Produktion und somit die CTL-Aktivierung nachgewiesen werden.

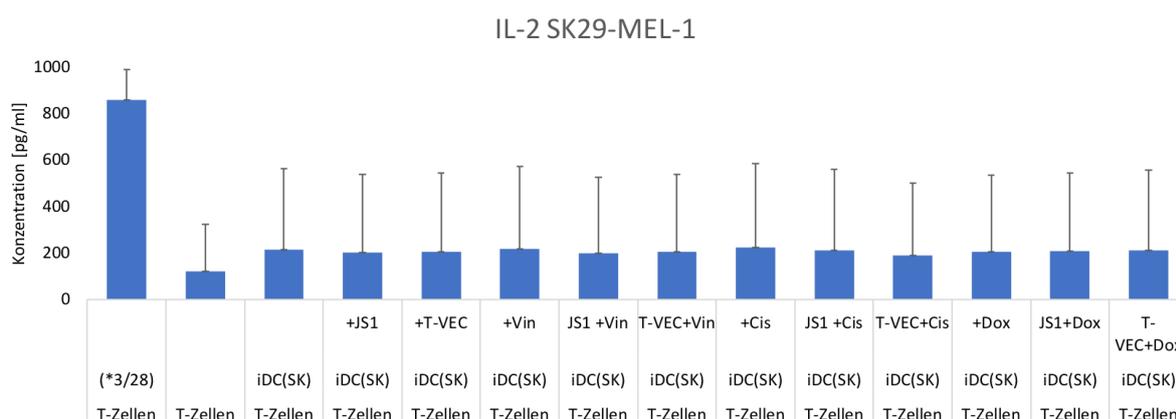


Abbildung 23: IL-2-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1 Analyse der IL-2-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch T-Zellen, durch mit CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen (*) T-Zellen nach Kokultur mit verschiedenen behandelten SK29-MEL-1 und iDCs. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es ist kein Effekt der Behandlung der Melanomzellen auf die IL-2-Produktion zu sehen.

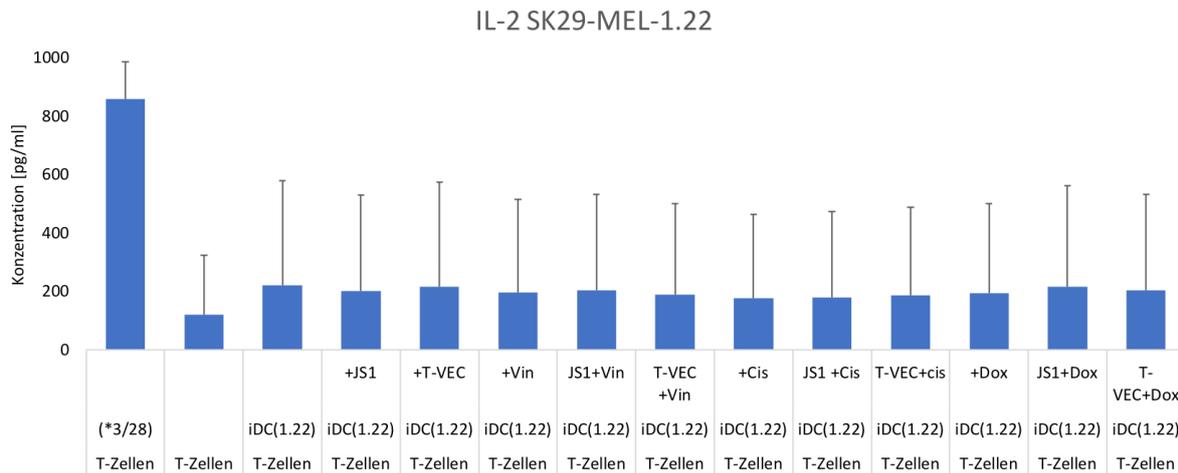


Abbildung 24: IL-2-Produktion von DCs nach Kokultur mit unterschiedlich behandelten SK29-MEL-1.22. Analyse der IL-2-Produktion mittels Sandwich-ELISA durch T-Zellen, durch mit CD3 und CD28 stimulierten T-Zellen (*) T-Zellen nach Kokultur mit verschiedenen behandelten SK29-MEL-1.22 und iDCs. Es wurde die Infektion mit JS1 oder T-VEC und die Behandlung mit Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin jeweils einzeln und in Kombination mit den onkolytischen Viren untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Es ist kein Effekt der Behandlung der Melanomzellen auf die IL-2-Produktion zu sehen.

6 Diskussion

Krebserkrankungen sind für einen Großteil der weltweiten Todesfälle verantwortlich (1). Trotz intensiver Forschung stellt ihre Behandlung die Medizin weiterhin vor große Probleme, die Heilungschancen in fortgeschrittenen Stadien sind für einen Großteil der Tumorarten immer noch gering. Onkolytische Viren, die selektiv maligne Zellen infizieren und lysieren, stellen einen neuen und vielversprechenden Ansatz zur Krebstherapie dar, da sie neben direkt onkolytischen Fähigkeiten auch einen immunstimulatorischen Effekt zeigen. Durch die Insertion Zytokin-kodierender Transgene soll dieser antitumorale Immuneffekt der OV's verstärkt werden. Für HSV-1 konnten immunstimulatorische Effekte gezeigt werden (136) und das in dieser Arbeit verwendete T-VEC erfüllt die Voraussetzung, selektiv maligne Zellen zu infizieren (12). Es enthält als immunaktivierendes Transgen eine GM-CSF-kodierende Sequenz. Es führte bei Patienten mit malignem Melanom zu einem erhöhten Therapieansprechen mit Lebenszeitverlängerung und zeigte ein gutes Sicherheitsprofil mit geringen unerwünschten Nebenwirkungen (13). Im Mausmodell induzierte T-VEC eine systemische T-Zell-Antwort und konnte ein anhaltendes Tumorgedächtnis generieren (137). Durch die Kombination von onkolytischen Viren mit anderen antitumorösen Wirkstoffen erhofft man sich eine Steigerung des Therapieerfolgs im Kampf gegen maligne Tumore und eine Reduktion der Nebenwirkungen durch Dosisreduktion der einzelnen Wirkstoffe.

Die positiven klinischen Beobachtungen wurden jedoch bisher nicht ausreichend auf ihre genauen Mechanismen *in vitro* untersucht. Im Fokus dieser Arbeit stand deshalb der immunstimulatorische Effekt von T-VEC im Vergleich zu dem ihm bis auf die GM-CSF-Insertion gleichen JS1 und die Kombination der beiden HSV-1-Stränge mit den Zytostatika Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin. Dieser Effekt wurde durch die Ausreifung von DCs und die Aktivierung von T-Lymphozyten anhand der Expression von Oberflächenmarkern und der vermehrten Ausschüttung der Zytokine IL-6, GM-CSF, TNF- α und IL-2 untersucht. Ein relevanter Immuneffekt durch die Virusinfektion konnte nicht bestätigt werden, aber in Hinblick auf die Kombinationsbehandlung wurden positive Effekte beobachtet.

6.1 Immunaktivierung durch Infektion der Melanomzellen mit HSV-1-Derivaten

6.1.1 DC-Ausreifung

Onkolytische Viren haben einen multimodalen Wirkmechanismus, der aus direkter Onkolyse, antivaskulären Eigenschaften und der Generierung einer tumorgerichteten Immunantwort besteht (98). Im Melanommodell wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern die Infektion der Zelllinien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 mit T-VEC und JS1 die Ausreifung von DCs beeinflusst. Hierfür wurden nach 48 Stunden Kokultur die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 im FACS und mithilfe von ELISAs die Zytokine IL-6, TNF- α und GM-CSF gemessen.

mDCs zeigen im Gegensatz zu iDCs eine höhere IL-6- und TNF- α -Sekretion (62), welche mit der Expression von CD83 als Reifemarker auf der DC-Oberfläche korreliert (138). Auch CD80 und CD86 als Koliganden werden nach der Ausreifung vermehrt exprimiert (138). Die Analyse dieser Marker und Zytokine erlaubt somit eine Aussage über die Ausreifung der DCs und folglich über den immunstimulatorischen Effekt der Behandlung.

Die durch den Zytokincocktail ausgereiften, als Positivkontrolle gemessenen DCs zeigten in dieser Arbeit eine hohe Expressionsrate von CD80, 83 und 86 und sezernierten, abgesehen von TNF- α , große Mengen der untersuchten Zytokine. Es kann somit von einer Sensitivität der isolierten DCs gegenüber der Stimulation ausgegangen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits unbehandelte Melanomzelllysate der Linien SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 die Reifung von DCs und vor allem die

darauf folgende Aktivierung der CTLs stimulieren können. Dies entspricht den Ergebnissen von Remmel *et al.*, die für andere Melanomzelllinien zeigten, dass diese die phänotypische Ausreifung von DCs *in vitro* induzieren (139). Durch die Infektion der Melanomzellen mit den HSV-1-Derivaten JS1 und T-VEC sollte diese Ausreifung weiter verstärkt werden.

Eine verstärkte Ausreifung von dendritischen Zellen mit erhöhter Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen nach Virusinfektion konnte für verschiedene onkolytische Viren bereits nachgewiesen werden (4-9, 106, 140). Der Effekt einer Infektion mit nicht veränderten Viren auf DCs zeigt eine Abhängigkeit von der Virusgruppe: Reoviren stimulieren DCs direkt (4), während beispielsweise Masernviren die DC-Funktion hemmen (141) und Adenoviren sich neutral gegenüber DCs verhalten (142). Auch die Immunogenität des Tumors und seine Zellart haben einen Einfluss auf die Folgen der Infektion (143, 144). Für ein Parvovirus konnten Möhler *et al.* im Melanommodell zeigen, dass die Infektion der Zellen die Expression von CD80, 83 und 86 sowie die Sekretion von TNF- α und IL-6 steigerte (7, 8). Gleiches konnte auch an Kolonkarzinomzellen beobachtet werden (9). T-VEC induziert im Melanommodell einen immunogenen Zelltod mit zeitabhängiger Freisetzung von DAMPS und Zytokinproduktion (145), welche als Reifestimulus für DCs dienen können.

Nach Infektion der Melanomzellen mit den onkolytischen Herpesviren T-VEC und JS1 in dieser Arbeit reiften DCs jedoch nicht stärker aus als wenn sie mit unbehandelten Melanomzellen kokultiviert wurden. Ein klarer immunstimulatorischer Effekt der untersuchten Viren alleine wurde somit entgegen der Erwartungen nicht gezeigt. Ähnliches wurde bereits für Adenovirus-infizierte Melanomzellen (146) beobachtet und auch ein Vacciniavirus induzierte *in vitro* keine vermehrte Zytokinsekretion trotz nachgewiesener DAMP-Freisetzung (147).

Schierer *et al.* beschrieben, dass humane iDCs *in vitro* Adenovirus-generierte Melanomzelllysate phagozytierten, eine darauffolgende Ausreifung jedoch nicht stattfand (146). Hierfür war ein zusätzlicher Stimulus notwendig, welcher in Form eines Zytokinmixes oder durch CD40L-Kodierung im Virusgenom geliefert wurde. Dass die infizierten Melanomzelllysate alleine keinen ausreichenden Stimulus für die DC-Reifung darstellen, konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Vom Einbringen der GM-CSF-Gensequenz ins Virusgenom wurde ein zusätzlicher Stimulus erwartet, welcher jedoch nicht bewiesen werden konnte (siehe 6.2). Möglich ist, dass

die GM-CSF-Expression nicht hoch genug war, sodass den DCs *in vitro* durch beide Virusstränge kein ausreichender Stimulus geboten wurde oder es fehlte eine bisher unbekannte, aktivierende Komponente im Modell. Dies hätte gegebenenfalls durch die Zugabe von geringen Mengen von Zytokinen in der DC-Kokultur, wie Proleukin 2 in der T-Zell-Kokultur zugegeben wurde, verbessert werden können. Dies gilt es in nachfolgenden Versuchen zu untersuchen. Auch die Kombination mit Zytostatika lieferte einen zusätzlichen Stimulus, wie in 6.3 diskutiert wird.

TNF- α wurde in dieser Arbeit untersucht und eine vermehrte Sekretion nach Kokultur von DCs mit durch OV-Infektion generierten Melanomzelllysaten erwartet, wie es zuvor für ein Newcastle Disease Virus (NDV) beobachtet wurde (140). Das Zytokin weist antivaskuläre Eigenschaften auf (148), welche zusammen mit der direkt antivaskulären Kapazität von HSV-1 (149) einen synergistischen pronekrotischen Effekt auf Tumorzellen entwickeln könnten. Zudem ist bekannt, dass TNF- α die Ausreifung von DCs stimuliert (150). Die erwartete Steigerung der TNF- α -Sekretion nach alleiniger Virusinfektion blieb in dieser Arbeit für SK29-MEL-1-Lysate aus. Da jedoch auch die durch den Zytokincocktail, welcher TNF- α enthält, ausgereiften DCs keine vermehrte Sekretion des Zytokins im ELISA zeigten, ist die Analyse dieses Zytokins erschwert und es stellt sich die Frage nach der Bewertbarkeit dieser Beobachtung. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um den genauen Beitrag von TNF- α zur DC-Reifung nach OV-Infektion zu definieren und mögliche positive Effekte der Infektion auf die Sekretion zu klären.

IL-6 weist neben den TNF- α synergistischen antitumorösen und DC-stimulierenden Eigenschaften (151) zusätzlich die Fähigkeit auf, T_{reg} zu hemmen, welche die Tumorummunabwehr supprimieren (152). Es fördert das Überleben naiver T-Zellen (153) und induziert eine CD8-Antwort (154). In der vorliegenden Arbeit konnte eine geringe Steigerung der IL-6-Sekretion durch die unbehandelten SK29-MEL-1-Lysate beobachtet werden, jedoch nicht zusätzlich durch die Virusinfektion der Zelllinie. Dass die Infektion von Tumorzellen mit OVs in der DC-Kokultur keine Steigerung dieser beiden Zytokine bewirkt, wurde bereits für ein Vacciniavirus berichtet und auf virale, den Transkriptionsfaktor NF κ B-inhibierende Proteine zurückgeführt (147, 155). Solche Proteine wurden für HSV-1 nicht beschrieben, sodass die fehlende Steigerung auf die generell fehlende Ausreifung der DCs nach Virusinfektion in dieser Arbeit

zurückzuführen ist und mit der nicht beobachteten Expressionssteigerung der CD-Moleküle im Einklang steht.

6.1.2 T-Zell-Aktivierung

Ausgereifte DCs aktivieren T-Zellen, welche für die effektive Tumorabwehr essenziell sind. Durch Kokultur von isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten mit iDCs und den infizierten Melanomzelllysaten beider Linien wurde in dieser Arbeit ein möglicher T-Zell-aktivierender Effekt der HSV-1-Derivate untersucht. Nach 48 Stunden Kokultur wurden im FACS die CD69-Expression und im ELISA die IL-2-Konzentration gemessen. Da die DC-Ausreifung für die Aktivierung der T-Zell-Antwort und Kreuzpräsentation von grundlegender Bedeutung ist (151), konnte als Folge der geringen beobachteten DC-Ausreifungsrate nach Virusinfektion auch hinsichtlich der CTL-Aktivierung keine starke Induktion erwartet werden. Die Stärke der T-Zell-Antwort ist abhängig von der Menge des präsentierten Antigens, der Dauer des Zellkontaktes und dem DC-Reifestimulus (151, 156). Es zeigte sich in den durchgeführten Versuchen jedoch eine verstärkte Aktivierung der T-Lymphozyten nach Kokultur mit den Melanomzellen beider Linien und nach Infektion mit beiden HSV-1-Stränge im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen, was bereits für H-1PV berichtet wurde (8). Nur für die infizierten Lysate von SK29-MEL-1 zeigte sich hingegen auch im Vergleich zu nicht infizierten Melanomzellen ein Vorteil durch die Virusinfektion. Wie schon zuvor im selben Melanommodell (6) konnte in dieser Arbeit keine relevante Induktion der T-Zell-Antwort durch Virusinfektion der SK29-MEL-1.22 im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen gezeigt werden.

SK29-MEL-1 und SK29-MEL-1.22 unterscheiden sich durch die Expression von HLA-A2. Die Lysate von SK29-MEL-1.22 als HLA-A2⁻ Zelllinie können durch die kokultivierten HLA-A2⁺ CTLs nicht erkannt werden, sondern ihre Antigene müssen von mDCs über MHC-I präsentiert werden, um CTLs zu aktivieren. Dass diese Kreuzpräsentation nach Infektion mit OVs stattfindet, konnte bereits im Melanommodell beobachtet werden (7, 8). Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen nach Kokultur mit SK29-MEL-1.22 Lysaten, DCs und T-Zellen. Die T-Zell-Aktivierung fiel jedoch durch Lysate der HLA-A2⁻ Linie geringer aus, obwohl die DC-Ausreifung im Vergleich zu HLA-A2⁺ SK29-MEL-1 stärker war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Kreuzpräsentation über mDCs weniger effektiv war als die direkte Stimulation der T-Zellen. Ähnliches beobachteten schon Heinrich *et al.*, als

die Kreuzpräsentation der SK29-MEL-1.22-Antigene über mDCs keine gesteigerte Aktivierung von T-Lymphozyten induzierte (6).

Als Zeichen einer T-Zell-Antwort wurden im FACS die Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD69 untersucht. Die vermehrte Expression von CD69 nach 48 Stunden wurde als Aktivierungszeichen interpretiert und CD8 für CTLs und CD4 für T_H gemessen. Die Untersuchung von $CD4^+$ Zellen ist jedoch nicht spezifisch, da sowohl T_H als auch T_{reg} diesen Oberflächenmarker exprimieren. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} werden durch Zell-Zell-Kontakt mit Antigenerkennung zur Proliferation aktiviert und exprimieren in der Folge vermehrt den frühen Aktivierungsmarker CD69 (157, 158). Infolgedessen wird ihre Zytokinproduktion aktiviert, sodass vermehrt TGF- β (159) und vor allem IL-10 sezerniert werden (160). Wie auch für die CTL-Differenzierung (161) ist für die T_{reg} -Aktivierung *in vitro* die Zugabe des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 nötig (162), was in dieser Arbeit mit 100 IU/ml Proleukin 2 erfolgt ist. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen T_H und induzierten T_{reg} wäre durch Untersuchung von FOXP3 als T_{reg} -Molekül möglich (163) und die Konzentration von TGF- β im ELISA gäbe Auskunft über eine eventuell vermehrte T_{reg} -Aktivierung. Dies sollte in kommenden Versuchen untersucht werden, da Mostafa *et al.* bereits über die Infiltration des Tumors mit T_{reg} nach Reovirusinfektion im Mausmodell berichteten (164) und sich auch in einer klinischen Studie eine erhöhte Anzahl von T_{reg} nach Reovirustherapie zeigte (165).

Nach stimulierter DC-Reifung und Adenovirusinfektion konnte von Schierer *et al.* durch die Tumorzelllysate im Melanommodell eine gerichtete T-Zell-Antwort mit IFN- γ -Sekretion generiert werden (146). Kaufman *et al.* zeigten in einer klinischen Studie an Melanompatienten eine positive Korrelation zwischen Tumorregression und IFN- γ -Transkription sowie dem Auftreten von antigenspezifischen T-Zellen (166). Die vermehrte IFN- γ -Transkription nach OV-Therapie deutet auf eine tumorgerichtete spezifische T_{H1} -Immunantwort hin, welche zur Regression des Tumors beiträgt. IFN- γ wird vorwiegend von aktivierten T_{H1} und CTL sezerniert (167) und induziert die Verstärkung der TLR-Expression (168), der MHC-gebundenen Antigenpräsentation (169) und der Phagozytose (170). Wie auch Ma *et al.* für das Vacciniavirus berichteten (147), konnten Heinrich *et al.* keine erhöhte IFN- γ -Sekretion nach Infektion von Melanomzellen mit JX-GFP oder TG6002 detektieren, obwohl die Ausreifung der DCs durch die Viren nachgewiesen worden war und eine Steigerung der CD69-Expression

stattgefunden hatte (6). Sie beobachteten jedoch, dass die Konzentration nach längerem Kontakt der Zellen miteinander höher war.

In dieser Arbeit wurde statt IFN- γ IL-2 als T-Zell-Zytokin untersucht. Ein positiver Einfluss nach Virusinfektion konnte wie bei Heinrich *et al.* trotz erhöhter CD69-Expression nicht beobachtet werden. Zwar steigerte die Kokultur mit Melanomzelllysaten die Sekretion im Vergleich zu nicht kokultivierten T-Zellen, ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Melanomzellen konnte allerdings nicht gezeigt werden. Ob eine längere Inkubationszeit von 72 Stunden wie bei Heinrich *et al.* (6) hierauf einen positiven Einfluss hätte, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Hirooka *et al.* beobachteten bei Patienten eine vermehrte Infiltration des Tumorgebiets mit CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten nach Behandlung mit dem Herpesvirus HF10 (171). T-VEC wurde bei Melanompatienten angewandt und führte neben der Rekrutierung von antigenspezifischen T-Zellen zur Reduktion der T_{reg} und der MDSCs im TME (127). Die Patienten entwickelten eine lokale und systemische spezifische Antitumor-T-Zell-Antwort mit Steigerung der IFN- γ -Sekretion (127). Zusammen mit der Beobachtung von Liu *et al.*, dass im Mausmodell auch nicht injizierte Läsionen zurückgingen (12), zeigte sich somit, dass der Rückgang der Tumore nicht nur über den direkt onkolytischen Effekt der Viren, sondern auch über einen systemischen Immuneffekt zu erklären ist.

Den Beitrag der Immunantwort zum therapeutischen Effekt von HSV-1 konnten Miller *et al.* in einer Studie an immundefizienten Mäusen mit intrakraniell Melanom zeigen (172, 173). Im Gegensatz zu immunkompetenten Artgenossen konnte deren Überleben durch das Virus nicht signifikant verlängert werden, was auf die fehlende Immunreaktion zurückgeführt wurde. Ähnliches berichteten Moesta *et al.*, als durch Depletion von CD8⁺ Lymphozyten in Mäusen der lokale und systemische Effekt von T-VEC ausblieb und auch das Überleben nicht verlängert war (137). Bei immunkompetenten Mäusen hatten sich hierauf jeweils deutliche positive Effekte gezeigt.

Das menschliche (und murine) Immunsystem ist ein hochkomplexes, fein aufeinander abgestimmtes System, welches *in vitro* nicht im vollen Umfang simuliert werden kann. Mögliche komplexe Interaktionen innerhalb der verschiedenen Komponenten des Systems können nicht dargestellt werden und bisher nicht in ihrer Relevanz erkannte Einflussfaktoren auf die Immunantwort könnten im *in vitro* Modell gefehlt haben,

weshalb die T-Zell-Antwort schwächer ausfiel. Diese Faktoren gilt es in weiteren Versuchen zu identifizieren und gegebenenfalls zu berücksichtigen. Ein positiver Effekt auf die Immunantwort durch Infektion der Melanomzellen mit HSV-1-Derivaten könnte deshalb trotz der fehlenden Beweise in dieser Arbeit für die klinischen Erfolge des T-VEC relevant sein.

6.2 Einfluss des GM-CSFs im Genom des T-VECs auf die Immunantwort

GM-CSF lockt als immunstimulatorisches Zytokin Immuneffektorzellen ins TME, induziert die Differenzierung von dendritischen Zellen, verbessert so die Antigenpräsentation und fördert folglich die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort (135). Es ist somit relevant für die Generierung einer humoralen und zellulären Antitumorantwort. Die therapeutische Verwendung von GM-CSF beim malignen Melanom ist jedoch nicht unumstritten und es wurde in Deutschland nie für diese Indikation zugelassen (174). GM-CSF rekrutiert unter anderem neutrophile Granulozyten ins TME (175), welche die Tumorpherifation unterstützen und die Antitumorimmunität durch CTLs hemmen können (176). Trotzdem konnte die Kombination von GM-CSF mit Immuntherapeutika, Chemotherapeutika und als Adjuvans nach Operation beim Melanom das Überleben in mehreren Studien verlängern (177-180). Die Expression von murinem GM-CSF (mGM-CSF) in Melanomzellen induzierte eine anhaltende CD4- und CD8-Immunezellantwort, welche stärker ausfiel als für neun andere Zytokine, darunter IL-4 und IL-6 (76). Deshalb ist der Einsatz von GM-CSF in onkolytischen Viren zur Verstärkung ihrer Immuninduktion gerechtfertigt.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Herpesviren sind ein GM-CSF-kodierendes Vacciniavirus (181) und zwei GM-CSF-kodierende Adenoviren (182, 183) klinisch getestet worden. Präklinisch zeigte sich ein mGM-CSF-kodierender HSV-1-Abkömmling therapeutisch erfolgreicher als derselbe HSV-1-Strang ohne GM-CSF-Transfektion (184). Das Überleben im Mausmodell war verlängert und es zeigte sich eine verstärkte Immunezellinfiltration und Tumorregression. Die GM-CSF-Expression in T-VEC soll die DC-Ausreifung und dadurch die T-Zell-Antwort unterstützen, allerdings konnte dieser Effekt bisher präklinisch nicht bewiesen werden (88) und auch in dieser Arbeit zeigte sich hierfür kein Anhalt. Durch Vergleich der Immuneffekte von T-VEC und dem ihm bis auf das GM-CSF-Gen gleichen JS1 wurde hier der Einfluss des Transgens untersucht.

Dass durch T-VEC-Infektion der Melanomzellen eine vermehrte GM-CSF-Produktion stattfindet, konnte im ELISA in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Konzentration des Zytokins war nach Kokultur der T-VEC-induzierten SK29-MEL-1-Lysate mit iDCs um das 86fache höher als nach JS1-Infektion. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Liu *et al.*, die das Virus erstmals beschrieben (12). Kemp *et al.*, welche ein GM-CSF kodierendes Reovirus im Vergleich mit einem unveränderten Reovirus untersuchten, konnten ebenfalls eine vermehrte Produktion des Zytokins zeigen (185).

Burke *et al.* konnten für ein GM-CSF-kodierendes Newcastle Disease Virus keinen klaren Vorteil des Zytokingens auf die Immunzellaktivierung von PBMCs beobachten (140). Erst durch die Selektion von CD14⁺ Monozyten zeigte sich der Einfluss von GM-CSF. Kim *et al.* beobachteten zudem, dass die Insertion von GM-CSF ins Genom des Vacciniavirus JX-594 keinen Einfluss auf die Tumorzelllyse hatte (186). Gleiches beschrieben Varghese *et al.* an Pankreaskarzinomzellen für ein GM-CSF-kodierendes Herpesvirus (126). Auch in dieser Arbeit war die DC-Ausreifung – beurteilt anhand der Oberflächenmarker im FACS und IL-6 und TNF- α im ELISA – trotz der starken GM-CSF-Sekretion nach T-VEC-Infektion sogar tendenziell niedriger als nach JS1-Infektion, sodass ein Vorteil der GM-CSF-Geninsertion auf diese nicht gezeigt werden konnte.

Liu *et al.* konnten im Mausmodell keine Verbesserung des lokalen Tumorrückgangs durch das GM-CSF-Gen im T-VEC-Strang zeigen (12). Ein verstärkter Rückgang der nicht injizierten Fernmetastasen wurde jedoch beobachtet, welcher auf die systemische Tumorummunabwehr zurückgeführt wurde. Zudem wiesen die Autoren eine Steigerung der IFN- γ -Sekretion nach. IFN- γ wird von CD8⁺ T-Zellen sezerniert und weist somit auf eine vermehrte Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten hin. Ein solcher Effekt war auch in dieser Arbeit vermutet worden, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Der Lymphozytenaktivierungsmarker CD69 wurde nach T-VEC-Infektion auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten hochreguliert, die T-Zellen also aktiviert, jedoch fand sich keine vermehrte Expression von CD69 im Vergleich zur JS1-Infektion. Dass die Insertion von GM-CSF ins Virusgenom keinen Einfluss auf die Aktivierungsmarker der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten im lokalen Tumorumfeld hatte, berichteten bereits Kemp *et al.* und führten es auf die geringe Immunogenität des untersuchten Tumors zurück (185). Das in dieser Arbeit untersuchte Melanom ist jedoch ein hoch immunogener Tumor, sodass die genauen Ursachen für den nicht

erfolgten Anstieg des Aktivierungsmarkers CD69 durch die GM-CSF-Geninsertion in weiteren Untersuchungen zu definieren sind.

In vitro konnten Cerullo *et al.* beobachten, dass die Insertion des GM-CSF-Gens in ein Adenovirus zwar die onkolytische Kapazität nicht beeinflusste, aber die Ausbildung eines tumorspezifischen Gedächtnisses mit Immunität gegen neue Tumore derselben Art durch das zusätzliche GM-CSF verstärkt stattfand (187). Eine solche Tumormunität wurde im Mausmodell auch nach T-VEC beschrieben (12), der Einfluss von GM-CSF hierauf sollte in weiterführenden Versuchen noch untersucht werden.

6.3 Beurteilung des Immuneffekts der Kombination von onkolytischen Herpesviren mit Zytostatika

Die Therapie maligner Erkrankungen ist in der Regel eine Kombinationstherapie, welche unterschiedliche antitumoröse Wirkmechanismen vereint. Neue Therapieansätze werden in Kombination mit den aktuellen Standardverfahren getestet, um eine gegenseitige Inhibition auszuschließen und einen klinisch relevanten Vorteil aufzuzeigen.

Eine Chemotherapie hemmt unselektiv das Wachstum schnell proliferierender Zellen und ist mit zahlreichen und schwerwiegenden, zum Teil den Therapieerfolg limitierenden unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert (188, 189). Durch die Kombination verschiedener Zytostatika werden diese toxischen Nebenwirkungen zum Teil additiv verstärkt (189). Zusätzlich steigert jede Chemotherapie das Risiko eines Zweitmalignoms für den Patienten (189) und Tumore entwickeln Resistenzen gegen den spezifischen zytotoxischen Wirkmechanismus bestimmter Wirkstoffe (190). Das maligne Melanom spricht nur geringgradig auf Mono- und Polychemotherapie an und Kombinationsversuche mit IFN- α und IL-2 führten zu keiner signifikanten Lebenszeitverlängerung (37), sodass eine neue, potente Kombinationsbehandlung benötigt wird. Um die Dosis reduzieren zu können ohne den Therapieerfolg zu gefährden, wäre eine synergistische oder mindestens additive Kombinationsbehandlung mit anderen Wirkstoffen erstrebenswert.

Da onkolytische Viren einen grundlegend verschiedenen antitumorösen Wirkmechanismus im Vergleich zu klassischen Zytostatika aufweisen, wurde ein möglicher synergistischer Effekt dieser Kombination angenommen (167, 188). OVs infizieren spezifisch entartete Zellen, sind klinisch gut verträglich und zeigten bisher

aufgrund ihres Wirkmechanismus keine Resistenzinduktion, sodass eine Kombination dieser Therapeutika mit einer Chemotherapie vielversprechend ist und geringere Nebenwirkungsraten verspricht (167, 171).

Zudem wirken OV, wie auch einige Chemotherapeutika (87, 111-113, 191), über die Induktion eines immunogenen Zelltodes, welcher durch die Kombination der beiden Therapeutika verstärkt werden könnte.

Präklinisch und klinisch konnte ein solcher positiver Effekt auf das Tumorwachstum zwischen verschiedenen OV und Chemotherapeutika bereits mehrfach bei unterschiedlichen Tumorarten nachgewiesen werden (15-20, 192). Ein synergistischer Effekt in Form einer gesteigerten Apoptoserate konnte beispielsweise *in vitro* für die Kombination aus H-1PV mit 5FU, Cisplatin und Irinotecan beim p53-defizienten hepatozellulären Karzinom gezeigt werden (193) und NV1006 konnte mit 5FU oder Gemcitabin bei Pankreaskarzinomzellen *in vitro* die virale Replikation und Zytotoxizität potenzieren (194). Es ist allerdings auch bekannt, dass in manchen Kombinationen das Zytostatikum die virale Replikation hemmt, sodass dessen onkolytischer Effekt reduziert wird (195, 196). Die zellulären Reaktionen auf Zytostatika hemmen nach Kulu *et al.* die Replikation und somit die therapeutische Effizienz von HSV-1 (196). Viren benötigen für ihre Replikation intakte Wirtszellapparate. Zytostatika wirken jedoch zytotoxisch, sodass den Viren die Wirtszellen genommen werden und sie sich weniger effektiv replizieren können. Watanabe *et al.* stellten dennoch fest, dass trotz der reduzierten viralen Replikation bei der Kombination aus einem Herpesvirus und Gemcitabin der zytotoxische Effekt *in vitro* größer war als bei der Virusmonotherapie (197). Es scheint große Unterschiede zwischen den Effekten von Virus-Zytostatika-Kombinationen zu geben, welche vom Virusstrang, der Tumorart und dem verwendeten Zytostatikum abhängen (190, 196).

Bisher wurde vornehmlich der zytotoxische Effekt der Kombination aus OV und Chemotherapie betrachtet und weniger der immunmodulatorische wie in dieser Arbeit. Esaki *et al.* zeigten einen Synergismus zwischen einem Herpes simplex Virus und Gemcitabin, wodurch die Freisetzung von IFN- γ stimuliert wird (15). Heinrich *et al.* konnten im Melanommodell hingegen keine Verstärkung der DC-Ausreifung durch Kombination von Vacciniaviren mit 5FU beobachten, es zeigte sich hier eher die Tendenz zur Hemmung der Reifung im Vergleich zur Virusmonotherapie (6). Auch eine Steigerung der CTL-Aktivierung in Form einer vermehrten IFN- γ -Sekretion konnte trotz erhöhter CD69-Expression nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von T-VEC und JS1 in Kombination mit Doxorubicin, Cisplatin und Vincristin hinsichtlich einer Immunmodulation untersucht. Hierfür wurden Melanomzellen mit den beiden Viren infiziert, mit den drei Zytostatika behandelt und die DC-Ausreifung sowie die T-Zell-Aktivierung wie zuvor beschrieben gemessen.

Die Zytostatika alleine stellten bereits zum Teil einen Reifestimulus für die Immunzellen dar. Ein Synergismus zwischen den untersuchten Herpesviren und den Zytostatika konnte wie bei Heinrich *et al.* allerdings ebenfalls nicht explizit nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch Tendenzen, wonach spezifische Kombinationen eine Potenzierung der Immunzellaktivierung im Melanommodell bewirken konnten, auf die es in folgenden Untersuchungen aufzubauen gilt. Die Kombination von JS1 und T-VEC mit Zytostatika zeigte überwiegend stärkere immunmodulatorische Effekte als die reine Virusinfektion, wobei besonders die Kombination mit Doxorubicin einen positiven Effekt zeigte. Da Zytostatika die Integrität der Wirtszellen angreifen, stellt sich die Frage, ob bei geringerer Dosis derselben ein stärkerer Immuneffekt durch Kombination mit OV's hätte gesehen werden können. Diese Kombination von T-VEC und JS1 mit niedrigdosierten Zytostatika sollte Gegenstand von Folgeforschung sein.

6.3.1 Vincristin

Vincristin entfaltet seine zytostatische Wirkung durch die Hemmung des Aufbaus der Mitosespindel und wird als Teil des BOLD-Schemas in der Therapie des malignen Melanoms verwendet (32, 119).

Kaneno *et al.* zeigten einen immunstimulatorischen Effekt von niedrigdosiertem Vincristin *in vitro*, welches die Expression von CD83, CD86 und CD40 auf DCs und somit deren Ausreifung induzierte (198). Dieser Effekt konnte auch in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen gesehen werden. Die durch Vincristin generierten Tumorzelllysate der Linie SK29-MEL-1 induzierten mit 12,5 % die vergleichsweise stärkste Steigerung der Expression von CD80 und CD86. Im Gegensatz dazu blieb eine Steigerung der Reifemarker CD80 und CD86 durch Lysate der Zelllinie SK29-MEL-1.22 aus. Auch Shurin *et al.* konnten zuvor keine Erhöhung der Reifemarker auf DCs nach Behandlung mit Vincristin finden (199).

Die Behandlung von DCs mit niedrigdosiertem Vincristin alleine *in vitro* induzierte bei Shurin *et al.* eine 150 %ige Steigerung der IL-2-Produktion, was auf eine T-Zell-Aktivierung hinweist (199). Im Gegensatz dazu berichteten Kaneno *et al.*, dass

Vincristin zwar phänotypisch die Ausreifung der DCs induzierte, eine Verbesserung der Antigenpräsentation hierdurch jedoch nicht stattfand (198). Dieser T-Zell-aktivierende Effekt von Vincristin konnte in dieser Arbeit weder durch vermehrte IL-2-Sekretion noch durch vermehrte Expression von CD69 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestätigt werden. Zwar zeigte sich eine Ausreifung der DCs, diese induzierten jedoch wie bei Kaneno *et al.* keine verstärkte T-Zell-Antwort.

Die Kombination aus Vincristin und onkolytischen Viren wurde bisher nicht häufig untersucht. Da Vincristin die Mikrotubulipolymerisation inhibiert, auf welche HSV-1 für seinen Transport in den Zellkern angewiesen ist (49), wurde bereits eine mögliche negative Interaktion durch reduzierte virale Replikation vermutet (200). Cinatl *et al.* wiesen jedoch eine erhöhte Zytotoxizität von Vincristin mit dem onkolytischen Virus G207 nach und zeigten, dass die Kombination im Tiermodell zu einer kompletten Remission beim embryonalen Rhabdomyosarkom führen kann (200). Möhler *et al.* konnten eine additive Steigerung der Toxizität durch Vincristinkombination im Vergleich zur Monotherapie bei mit H-1PV infizierten Melanomzellen der Linie SK29-MEL-1 *in vitro* beobachten (7). Die Melanomzelllysate führten nach Kombinationsbehandlung zu einer verstärkten Immunaktivierung in Form einer DC-Ausreifung. Auch in dieser Arbeit induzierte die Kombination eine stärkere DC-Ausreifung als die jeweilige Virusmonotherapie. Eine Steigerung der DC-Ausreifung im Vergleich zur Vincristinmonotherapie durch zusätzliche Behandlung mit OVs konnte jedoch nur hinsichtlich der TNF- α - und GM-CSF-Sekretion bei Kombination mit T-VEC gezeigt werden. Es zeigte sich kein oder ein negativer Effekt durch die Viruskombination in Bezug auf die Expression von CD80, CD83 und CD86 sowie auf die Sekretion von IL-6.

Vincristin zeigt wie das ihm ähnliche Vinblastin antiangiogenetische Eigenschaften in Tumoren (201, 202). Auch onkolytische Viren entfalten einen antitumorösen Effekt durch Infektion der Endothelzellen der versorgenden Gefäße, wodurch sie die Versorgung des Tumors hemmen (98). Ein möglicher synergistischer Effekt einer Kombination dieser Therapeutika auf die Blutversorgung von Tumoren könnte in weiterführenden Versuchen untersucht werden, da er *in vivo* für einen gemeinsamen Einsatz der Wirkstoffe relevant sein könnte.

6.3.2 Cisplatin

Cisplatin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien, das durch *Cross-Linking* und Punktmutationen die zelluläre DNA schädigt (119) und als Teil des DVP-Schemas zur Therapie des malignen Melanoms eingesetzt wird (32).

Modulatorische Effekte von Cisplatin auf das TME und das Immunsystem wurden vielfach beschrieben (203). So berichteten Chen *et al.*, dass die Cisplatinbehandlung von Melanomen bei Mäusen den Anteil der immunsuppressiven MDSCs reduzierte und reaktive DCs ins TME lockte (204). Buttiglieri *et al.* untersuchten den Effekt von durch Cisplatin generierten Tumorzelllysaten auf die DC-Funktion und -Ausreifung und konnten keinen stimulatorischen Einfluss nachweisen (205). Die DCs nahmen nur geringe Mengen von Tumorzelllysaten auf und sezernierten nicht vermehrt IL-12, sodass es nicht zu einer relevanten T-Zell-Aktivierung kam. Dies wurde anhand der fehlenden Steigerung der Konzentration von IFN- γ im ELISA gezeigt. Auch war Cisplatin nicht in der Lage, *in vitro* eine Typ I IFN-Antwort zu induzieren, welche auf eine immunogene Wirkweise des Zytostatikums hinweisen würde (206). Nach Cisplatintherapie blieb außerdem die vermehrte Sekretion von IL-6 und TNF- α aus (207).

Diese fehlende Immunaktivierung durch Cisplatin kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Als Monotherapie induzierte es in der Zellkultur keine über die unbehandelten Melanomzellen hinausgehende Ausreifung von DCs, weder in Hinblick auf die CD80/83/86-Expression noch auf die Zytokinsekretion.

Cisplatin induzierte *in vitro* eine CD4-Antwort (207) und führte im Mausmodell in Kombination mit Doxorubicin zu einer Verstärkung der spezifischen Immunantwort mit verlängertem Gesamtüberleben, wobei die Autoren diesen Effekt auf eine CD4-getriggerte Immunreaktion zurückführten (208). Es zeigte sich zudem eine vermehrte Infiltration von Tumoren mit CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten nach Cisplatin- und 5FU-Behandlung (209). Die Behandlung mit Cisplatin und Paclitaxel induzierte synergistisch die vermehrte Sekretion von IL-2 und IFN- γ , den Hauptzytokinen der CTLs (210). Neben der Stimulation einer T-Zell-Antwort sensibilisiert Cisplatin den Tumor zusätzlich durch die Hochregulierung der Glucose-6-Phosphat-Rezeptoren auf der Tumoroberfläche gegenüber den CTLs (118).

Eine Steigerung der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten-Aktivierung konnte auch in dieser

Arbeit für Cisplatin-generierte Lysate der Linie SK29-MEL-1 gezeigt werden, welche vermehrt CD69 exprimierten.

Die Kombination von Cisplatin mit diversen onkolytischen Viren wurde bisher überwiegend in Hinblick auf die Zytotoxizität untersucht. Präklinisch *in vivo* und *in vitro* zeigten sich je nach Virus und Tumorausprung zum Teil synergistische oder mindestens additive (7, 115, 190, 211-216), zum Teil aber auch keine zusätzlichen zytotoxische Effekte (217). Herpesviren, wie sie auch für diese Arbeit verwendet wurden, zeigten in mehreren Studien einen durch Cisplatin potenzierten onkolytischen Effekt: Die Kombination aus verschiedenen modifizierten Herpesviren und Cisplatin erreichte bei Modellen des NSCLC (214), des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Halsbereich (215) und des Pankreaskarzinom (216) eine höhere Wirksamkeit. Der ICP34.5 deletierte HSV-1-Strang NV1066 zeigte *in vitro* in Kombination mit Cisplatin bei verschiedenen Tumorzellen synergistische oder additive zytotoxische Effekte wie eine verstärkte virale Replikation (213).

Der immunmodulatorische Effekt einer Kombinationsbehandlung, wie er in dieser Arbeit im Fokus stand, wurde bisher wenig untersucht. Möhler *et al.* konnten eine Verstärkung der DC-Ausreifung durch Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Zytostatikamonotherapie zeigen (7). Melanomzelllysate, die durch Cisplatin und H-1PV generiert wurden, induzierten eine verstärkte CD86-Expression und IL-6-Sekretion durch DCs. Pandha *et al.* beschrieben im Gegensatz dazu neben einer verstärkten Zytotoxizität einen hemmenden Effekt auf die Zytokinsekretion nach Behandlung von Melanomzellen mit Cisplatin und einem Reovirus *in vivo* und *in vitro* (218).

Die für H-1PV beobachteten Eigenschaften konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden: Die Expression von CD80, CD83 und CD86 war bei mit SK29-MEL-1- und SK29-MEL-1.22-Lysaten kokultivierten iDCs nach Cisplatinbehandlung weder alleine noch in Kombination mit den Viren höher als bei unbehandelten Melanomzellen. Im Gegenteil war die Ausreifung sogar niedriger nach Kombinationstherapie als bei reiner Cisplatinbehandlung, was sich mit den Beobachtungen von Pandha *et al.* deckt. Auch die T-Zell-Antwort fiel nach Kombination von Cisplatin mit JS1 oder T-VEC nicht stärker aus als nach Cisplatinmonotherapie. Eine auffällig hohe Sekretion von GM-CSF nach Kombinationsbehandlung der Melanomzellen mit Cisplatin und T-VEC ist überwiegend auf die gentechnische Modifizierung des T-VECs und weniger auf den Effekt des Cisplatins zurückzuführen.

6.3.3 Doxorubicin

Doxorubicin ist ein zellzyklusunabhängig wirkendes Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline, das durch Interkalation in die DNA wirkt und irreversibel kardiotoxische Nebenwirkungen haben kann (119).

Doxorubicin hat multiple nachgewiesene immunstimulatorische Effekte (203). Es induziert einen caspase-abhängigen immunogenen Zelltod, wodurch TAAs zur Generierung einer tumorspezifischen Immunantwort frei werden (111, 219). Zusätzlich induziert Doxorubicin *in vitro* die Freisetzung von HSP70, einem als Dangersignal fungierenden Protein, welches zur Ausreifung von DCs und dadurch zur Induktion einer T-Zell-Antwort führt (205). Außerdem wurde eine Typ I IFN-Antwort nach Doxorubicinbehandlung *in vitro* beobachtet, welche auch durch Virusinfektionen induziert wird (206). Shurin *et al.* zeigten die durch niedrigdosiertes Doxorubicin induzierte vermehrte DC-Antigenpräsentation mit Hochregulation von CD80, CD86, CD40, MHC-II und vermehrter IL-12-Sekretion (199). Hu *et al.* berichteten ebenfalls von einer vermehrten Expression von CD80 nach Doxorubicinbehandlung (207). Eine vermehrte Expression der Koliganden CD80 und CD86 nach alleiniger Doxorubicinbehandlung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Auch eine vermehrte Sekretion von IL-6 wurde gezeigt. Offen bleibt hingegen, warum Doxorubicin für SK29-MEL-1-Lysate entgegen der Erwartungen die Freisetzung von TNF- α und GM-CSF hemmte.

Doxorubicin-behandelte Tumorzellen werden von DCs phagozytiert, ihre Antigene präsentiert und so eine spezifische T-Zell-Reaktion induziert (111). Eine signifikant vermehrte IL-2-Produktion gilt als Zeichen der T-Zell-Aktivierung und konnte nach Doxorubicinbehandlung von Shurin *et al.* gezeigt werden (199). Wie Cisplatin sensibilisiert auch Doxorubicin den Tumor über die Hochregulierung der Glucose-6-Phosphat-Rezeptoren gegenüber den zytotoxischen Mechanismen der CTLs (118).

Eine vermehrte CTL-Aktivierung durch Doxorubicin-generierte Tumorzelllysate konnte in dieser Arbeit bestätigt werden: Doxorubicin zeigte sich als Stimulator der T-Zell-Antwort, der Anteil der CD69 positiven und damit aktivierten T-Zellen stieg sowohl für die CTLs als auch die T_H durch die Behandlung.

Eine Kombination aus Doxorubicin und verschiedenen onkolytischen Viren zeigte in mehreren Studien additive und zum Teil synergistische zytotoxische Effekte (116, 214, 220, 221). Bolyard *et al.* bewiesen einen Synergismus von Doxorubicin und einem

ICP34.5 deletierten Herpesvirus mit vermehrter Tumorapoptose und verlängertem Überleben im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie beim Ovarialkarzinom im Mausmodell (220).

Ein Immuneffekt der Kombination, wie er in dieser Arbeit untersucht wurde, konnte bisher jedoch nicht definiert werden (222). Es konnte hier insgesamt ein positiver Effekt der Kombination auf die Immunantwort beobachtet werden. Die DC-Ausreifung wurde durch Infektion mit HSV-1-Derivaten zusätzlich zur Doxorubicin-Behandlung verstärkt. Es zeigte sich jeweils eine gegenüber der Doxorubicinmonotherapie vermehrte Expression der Oberflächenmarker, eine erhöhte Sekretion von IL-6 und auch die T-Zell-Aktivierung konnte teilweise verstärkt werden.

Die Sekretion von GM-CSF wurde nach der Behandlung mit Doxorubicin nicht verstärkt und auch in Kombination mit dem potenten GM-CSF-Induktor T-VEC wurde nur eine sehr geringe Konzentration beobachtet. Dies deutet auf eine Inhibition der GM-CSF-Produktion durch Doxorubicin hin, was die gentechnische Modifikation im T-VEC neutralisieren würde. Bisher wurde diese Kombination aus T-VEC und Doxorubicin noch nicht weiter untersucht, was gezielt gemacht werden sollte, um gegebenenfalls klinische Schlüsse zu ziehen, falls sich die Hemmung bestätigen würde. Eine klinische Phase I/II Studie an Mammakarzinompatientinnen hierzu läuft bereits (223), deren Ergebnisse weitere Erkenntnisse liefern werden.

6.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse und Schlussfolgerung

Einige onkolytische Viren werden nach vielversprechenden präklinischen Ergebnissen aktuell in klinischen Studien untersucht (102, 224-226). Das in dieser Arbeit verwendete T-VEC konnte das Überleben bei Melanompatienten verlängern und es zeigte sich ein erhöhtes Ansprechen der lokalen und metastatischen Läsionen (14, 127). Gerade wegen seines geringen Grades an unerwünschten Nebenwirkungen (13) bei guter klinischer Wirksamkeit stellt es ein zukunftsfähiges Therapeutikum dar.

Neben dem bereits nachgewiesenen direkt onkolytischen Effekt (12) wurde in dieser Arbeit der Immuneffekt des Virus *in vitro* untersucht. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte die These, dass der GM-CSF-kodierende HSV-1-Strang T-VEC die Immuneffekte im humanen Melanommodell verbessert, nicht bestätigt werden. Es zeigte sich zwar eine Immunantwort als Folge der Infektion mit beiden Viren, jedoch war diese durch T-VEC nicht stärker als nach JS1 und sie fiel insgesamt schwächer aus als erwartet.

Auch die Kombination von OV's mit einer Chemotherapie wurde bereits klinisch getestet und zeigte positive Ergebnisse (20, 227, 228). Eine klinische Phase I/II Studie mit Einsatz von ONYX-015 in Kombination mit Cisplatin, Doxorubicin und Mitomycin bei Sarkompatienten lieferte überzeugende Ergebnisse (228, 229). Die Therapie wurde gut vertragen und es konnte gezeigt werden, dass sich das Virus und die Standardtherapie für den Tumor in diesem Stadium klinisch nicht gegenseitig ausschließen, was den zukünftigen Einsatz der Kombination erlaubt. Untersuchungen mit T-VEC suggerierten zuvor eine Überlegenheit einer Kombinationstherapie mit beispielsweise ICIs (121) oder MEK-Inhibitoren (230) auf den zytotoxischen und den immunmodulatorischen Effekt der Behandlung. In dieser Arbeit konnten die immunstimulatorischen Effekte der Viren durch Chemotherapie zum Teil verstärkt werden und somit empfiehlt es sich, diesen Ansatz in klinischen Studien zu verfolgen und T-VEC vorwiegend in Kombination einzusetzen. Drei klinische Studien zur Kombination von T-VEC und Chemotherapeutika laufen bereits (231). Die Kombination aus Doxorubicin und T-VEC zeigte in dieser Arbeit die eindeutigsten positiven Ergebnisse, sodass dieser Ansatz für weitere Untersuchungen und zur Reduktion der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität empfohlen werden kann.

Dass andere Kombinationen oder nur Teile der Untersuchungen keinen additiven Effekt zeigten, könnte auch auf fehlende komplexe Interaktionen zurückgeführt werden. Solche Interaktionen, die gegebenenfalls über die rein zellbiologische Interaktion hinausgehen und erst im Gesamtorganismus wirken, können in Zellkulturversuchen nur unzureichend dargestellt werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass die als günstig angesehene Kombination von OV's und Cyclophosphamid unter anderem über die Hemmung der angeborenen antiviralen Immunantwort durch das Zytostatikum bewirkt wird (188, 232), welche nur bei systemischer Therapie im Menschen zum Tragen kommt. Eine mögliche Synergie von T-VEC mit den untersuchten Zytostatika, insbesondere dem in dieser Arbeit als ineffektivster Kombinationswirkstoff gesehenen Cisplatin, könnte sich somit auch erst im komplexen System zeigen und kann nicht durch reine Zellkulturversuche ausgeschlossen werden. Zudem müssen die positiven Berichte über einen Synergismus bezüglich der Zytotoxizität berücksichtigt werden und es sollte bedacht werden, dass jeder Tumor sich biologisch anders verhält. Der Effekt durch kombinierte Behandlung anderer Zellkulturen könnte somit gegebenenfalls stärker ausfallen, was sich schon an der zum Teil abweichenden Tendenz zwischen den beiden hier untersuchten Zelllinien zeigte.

Das maligne Melanom ist ein hoch immunogener Tumor, der in den meisten Fällen gut injizierbar ist und somit die Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche OV-Therapie erfüllt (30). Besonders für Patienten im Stadium IIIB bis IVM1a stellen onkolytischen Viren in Form von T-VEC bereits heute eine aussichtsreiche Therapieoption dar (13), die durch Kombinationen möglichst umfassend optimiert werden kann (14).

Um T-VEC in Zukunft optimal einsetzen zu können, sollten weitere klinische, aber auch präklinische Studien erfolgen. Durch *in vitro* Untersuchungen könnte ein besseres Verständnis der genauen Wirkmechanismen generiert und darauf aufbauend patienten- und tumorbezogene Einflussfaktoren definiert werden, welche das Therapieansprechen beeinflussen. Zudem könnte der Effekt von T-VEC durch eine optimale Kombination mit anderen Therapien maximiert werden. Hierzu sollten, wie in dieser Arbeit, präklinisch die möglichen Effekte einer Kombination von T-VEC unter anderem mit Zytostatika und Immuntherapeutika untersucht und positive Ergebnisse im Anschluss in klinischen Studien verifiziert werden. Durch Untersuchungen an verschiedenen Tumorzellarten ließe sich die Indikation gegebenenfalls auf andere Diagnosen als das Melanom ausweiten und somit könnten mehr Patienten von diesem Therapeutikum profitieren.

7 Zusammenfassung

Die Behandlung von Tumoren in fortgeschrittenen Stadien stellt einen auch in Zukunft wichtigen Forschungsschwerpunkt dar. Onkolytische Viren mit ihrer direkten Tumorlysekapazität, aber vor allem ihren Immuneffekten stellen einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz in diesem Zusammenhang dar.

In dieser Arbeit wurde der immunstimulatorische Effekt des GM-CSF-kodierenden HSV-1-Abkömmlings T-VEC und die Folgen der Kombination dessen mit den drei Zytostatika Vincristin, Cisplatin und Doxorubicin auf den Immuneffekt in einem *in vitro* Melanommodell untersucht. Eine durch T-VEC induzierte spezifische Antitumor-Immunantwort mit Modulation der immunsuppressiven Tumormikroumgebung würde eine langfristige, erfolgreiche Tumorbehandlung ermöglichen. Dass onkolytische Viren zur Induktion einer solchen Immunantwort in der Lage sind, wurde bereits für verschiedene Viren und Tumore *in vivo* und *in vitro* beschrieben (4-9, 107, 127, 137, 171).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Virusinfektion der mit DCs und T-Zellen kokultivierten Melanomzellen zelllinienabhängig eine Verstärkung der T-Zell-Aktivierung in Form einer CD69-Expressionssteigerung induzieren kann. Ein

über den unbehandelter Melanomzellen hinausgehender Effekt der Virusinfektion auf die Ausreifung von dendritischen Zellen, gemessen anhand der Expression von CD80, 83 und 86 sowie der Sekretion von IL-6 und TNF- α , konnte im Gegensatz dazu nicht beobachtet werden.

Durch die Insertion einer GM-CSF kodierenden Gensequenz ins Genom von T-VEC soll der Immuneffekt des Virus verstärkt werden (12). Diese Verstärkung konnte im Vergleich von T-VEC mit dem ihm bis auf die Geninsertion identischen JS1 nicht beobachtet werden. Obwohl eine stark vermehrte GM-CSF-Produktion nach T-VEC-Infektion nachgewiesen wurde, konnte kein relevanter Vorteil der Modifikation auf DC-Ausreifung, T-Zell-Aktivierung und Zytokinsekretion im Melanommodell beobachtet werden.

Die Kombination von onkolytischen Viren mit Chemotherapeutika, aber auch mit Radiotherapie und Immuntherapeutika hatte in der Vergangenheit positive Effekte auf die Immunreaktion und Zytotoxizität von onkolytischen Viren (7, 15, 16, 21, 114, 121). Die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit bestätigen diesen Ansatz, wonach onkolytische Viren als Kombinationspartner geeignet sind und zukünftige Forschungen in diesem Feld vielversprechend sind. Die Zugabe von Vincristin konnte im Vergleich zur Virusmonotherapie die DC-Ausreifung verstärkt induzieren. Insbesondere die Kombination von T-VEC mit dem Zytostatikum Doxorubicin zeigte positive Effekte auf die DC-Ausreifung, wodurch zuvor bereits berichtete synergistische zytotoxische Effekte von Doxorubicin und onkolytischen Viren ergänzt wurden. Im Gegensatz dazu zeigte Cisplatin weder alleine noch in Kombination mit JS1 oder T-VEC positive Einflüsse auf die Immunantwort im Modell.

T-VEC stellt wegen guter klinischer Ergebnisse und seiner geringen Nebenwirkungsrate bei Melanompatienten (13, 14) ein zukunftsfähiges Therapeutikum dar, welches in seinem Einsatz weiter optimiert werden sollte. Es sind hierfür zusätzliche klinische, aber auch präklinische Studien nötig, um die optimalen Patienten- und Tumorkriterien sowie insbesondere geeignete Kombinationsschemata zu definieren. Durch ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen und Interaktionen kann so die maximale therapeutische Wirksamkeit des Virus erreicht werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Mattiuzzi C., Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-222.
2. Chan W. M., McFadden G. Oncolytic Poxviruses. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):119-141.
3. de Graaf J. F., de Vor L., Fouchier R. A. M., van den Hoogen B. G. Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;41:28-39.
4. Errington F., Steele L., Prestwich R., Harrington K. J., Pandha H. S., Vidal L., de Bono J., Selby P., Coffey M., Vile R., Melcher A. Reovirus Activates Human Dendritic Cells to Promote Innate Antitumor Immunity. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):6018-6026.
5. Guillerme J.-B., Boisgerault N., Roulois D., Ménager J., Combredet C., Tangy F., Fonteneau J.-F., Gregoire M. Measles Virus Vaccine–Infected Tumor Cells Induce Tumor Antigen Cross-Presentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(5):1147-1158.
6. Heinrich B., Klein J., Delic M., Goepfert K., Engel V., Geberzahn L., Lusky M., Erbs P., Preville X., Moehler M. Immunogenicity of oncolytic vaccinia viruses JX-GFP and TG6002 in a human melanoma in vitro model: studying immunogenic cell death, dendritic cell maturation and interaction with cytotoxic T lymphocytes. *Onco Targets Ther*. 2017;10:2389-2401.
7. Moehler M., Sieben M., Roth S., Springsguth F., Leuchs B., Zeidler M., Dinsart C., Rommelaere J., Galle P. R. Activation of the human immune system by chemotherapeutic or targeted agents combined with the oncolytic parvovirus H-1. *BMC Cancer*. 2011;11:464.
8. Moehler M. H., Zeidler M., Wilsberg V., Cornelis J. J., Woelfel T., Rommelaere J., Galle P. R., Heike M. Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther*. 2005;16(8):996-1005.
9. Heinrich B., Goepfert K., Delic M., Galle P. R., Moehler M. Influence of the oncolytic parvovirus H-1, CTLA-4 antibody tremelimumab and cytostatic drugs on the human immune system in a human in vitro model of colorectal cancer cells. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1119-1127.
10. European Medicines Agency. Imlygic-talimogene laherparepvec [Internet]. Letzte Aktualisierung: 30.08.2019. Zitiert am 28.07.2020. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic#authorisation-details-section2019>.
11. Harrington K., Freeman D. J., Kelly B., Harper J., Soria J. C. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(9):689-706.
12. 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., Coffin R. S. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*. 2003;10(4):292-303.

13. Andtbacka R. H. I., Collichio F., Harrington K. J., Middleton M. R., Downey G., Öhrling K., Kaufman H. L. Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III–IV melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019;7(1):145.
14. Andtbacka R. H., 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., Jr., Zager J. S., Ye Y., Yao B., Li A., Doleman S., VanderWalde A., Gansert J., Coffin R. S. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(25):2780-2788.
15. Esaki S., Goshima F., Kimura H., Murakami S., Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1592-1601.
16. Salzwedel A. O., Han J., LaRocca C. J., Shanley R., Yamamoto M., Davydova J. Combination of interferon-expressing oncolytic adenovirus with chemotherapy and radiation is highly synergistic in hamster model of pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2018;9(26):18041-18052.
17. Wennier S. T., Liu J., Li S., Rahman M. M., Mona M., McFadden G. Myxoma virus sensitizes cancer cells to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Mol Ther*. 2012;20(4):759-768.
18. Lun X., Alain T., Zemp F. J., Zhou H., Rahman M. M., Hamilton M. G., McFadden G., Bell J., Senger D. L., Forsyth P. A. Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer Res*. 2010;70(2):598-608.
19. Nakano K., Todo T., Zhao G., Yamaguchi K., Kuroki S., Cohen J. B., Glorioso J. C., Tanaka M. Enhanced efficacy of conditionally replicating herpes simplex virus (G207) combined with 5-fluorouracil and surgical resection in peritoneal cancer dissemination models. *J Gene Med*. 2005;7(5):638-648.
20. Comins C., Spicer J., Protheroe A., Roulstone V., Twigger K., White C. M., Vile R., Melcher A., Coffey M. C., Mettinger K. L., Nuovo G., Cohn D. E., Phelps M., Harrington K. J., Pandha H. S. REO-10: a phase I study of intravenous reovirus and docetaxel in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(22):5564-5572.
21. Geletneky K., Hartkopf A. D., Krempien R., Rommelaere J., Schlehofer J. R. Improved killing of human high-grade glioma cells by combining ionizing radiation with oncolytic parvovirus H-1 infection. *J Biomed Biotechnol*. 2010.
22. Garibyan L., Fisher D. E. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2010;12(5):319-326.
23. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2015/2016 [Internet]. Zitiert am: 06.10.2020. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?blob=publicationFile. Berlin; 2019.

24. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2011/2012 [Internet]. Zitiert am: 06.10.2020. URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs in Deutschland/vergangene ausgaben/downloads/krebs in deutschland 10.pdf? blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/vergangene_ausgaben/downloads/krebs_in_deutschland_10.pdf?blob=publicationFile). Berlin; 2015.
25. Rastrelli M., Tropea S., Rossi C. R., Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005-1011.
26. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S., Pasquini P., Zanetti R., Masini C., Boyle P., Melchi C. F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2040-2059.
27. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S., Pasquini P., Picconi O., Boyle P., Melchi C. F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):45-60.
28. Dulon M., Weichenthal M., Blettner M., Breitbart M., Hetzer M., Greinert R., Baumgardt-Elms C., Breitbart E. W. Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *J Clin Epidemiol*. 2002;55(11):1075-1081.
29. Holly E. A., Kelly J. W., Shpall S. N., Chiu S. H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(3):459-468.
30. Dharmadhikari N., Mehnert J. M., Kaufman H. L. Oncolytic Virus Immunotherapy for Melanoma. *Current Treatment Options in Oncology*. 2015;16(3):10.
31. Gershenwald J. E., Scolyer R. A., Hess K. R., Sondak V. K., Long G. V., Ross M. I., Lazar A. J., Faries M. B., Kirkwood J. M., McArthur G. A., Haydu L. E., Eggermont A. M. M., Flaherty K. T., Balch C. M., Thompson J. F. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):472-492.
32. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Deutsche Krebshilfe (DKH). Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms [Internet]. AWMF-Register-Nummer 032/024OL. Zitiert am 08.07.2020. URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/LL_Melanom_Langversion_3.3.pdf. Berlin; 2020.
33. Ives N. J., Suci S., Eggermont A. M. M., Kirkwood J., Lorigan P., Markovic S. N., Garbe C., Wheatley K. Adjuvant interferon- α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017;82:171-183.

34. Weber J., Mandala M., Del Vecchio M., Gogas H. J., Arance A. M., Cowey C. L., Dalle S., Schenker M., Chiarion-Sileni V., Marquez-Rodas I., Grob J. J., Butler M. O., Middleton M. R., Maio M., Atkinson V., Queirolo P., Gonzalez R., Kudchadkar R. R., Smylie M., Meyer N., Mortier L., Atkins M. B., Long G. V., Bhatia S., Lebbé C., Rutkowski P., Yokota K., Yamazaki N., Kim T. M., de Pril V., Sabater J., Qureshi A., Larkin J., Ascierto P. A. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1824-1835.
35. Forschner A., Eichner F., Amaral T., Keim U., Garbe C., Eigentler T. K. Improvement of overall survival in stage IV melanoma patients during 2011-2014: analysis of real-world data in 441 patients of the German Central Malignant Melanoma Registry (CMMR). *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(3):533-540.
36. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves first-of-its-kind product for the treatment of melanoma [Internet]. Letzte Aktualisierung: 27.10.2015. Zitiert am 06.10.2020. URL: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170111160804/http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm469571.htm>. 27.10.2015.
37. Eigentler T. K., Caroli U. M., Radny P., Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol.* 2003;4(12):748-759.
38. Leroy B., Gillet L., Vanderplasschen A., Wattiez R. Structural Proteomics of Herpesviruses. *Viruses.* 2016;8(2).
39. Weir J. P. Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes.* 1998;16(1):85-93.
40. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* 2013;5.
41. Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. *Molekulare Virologie.* 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum; 2010. pp. 545-585.
42. Kukhanova M. K., Korovina A. N., Kochetkov S. N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(13):1635-1652.
43. Deshmane S. L., Fraser N. W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol.* 1989;63(2):943-947.
44. Wilson A. C., Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol.* 2012;20(12):604-611.
45. Arduino P. G., Porter S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(2):107-121.
46. Rechenchoski D. Z., Faccin-Galhardi L. C., Linhares R. E. C., Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha).* 2017;62(2):151-156.
47. Jenkins F. J., Roizman B. Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J Virol.* 1986;59(2):494-499.

48. Herold B. C., Visalli R. J., Susmarski N., Brandt C. R., Spear P. G. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* 1994;75(6):1211-1222.
49. Sodeik B., Ebersold M. W., Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 1997;136(5):1007-1021.
50. Everett R. D. HSV-1 biology and life cycle. *Methods Mol Biol.* 2014;1144:1-17.
51. McComb S., Thiriot A., Akache B., Krishnan L., Stark F. Introduction to the Immune System. In: Fulton K. M., Twine S. M., editors. *Immunoproteomics: Methods and Protocols.* 2024. New York: Springer New York; 2019. pp. 1-24.
52. Williams A. E. *Immunology: mucosal and body surface defences.* Chichester: Wiley-Blackwell; 2012.
53. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-145.
54. Raphael I., Nalawade S., Eagar T. N., Forsthuber T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74(1):5-17.
55. Borish L. C., Steinke J. W. 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2003;111(2, Supplement 2):460-475.
56. Holtmann H., Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften.* 1995;82(4):178-187.
57. Shiomi A., Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
58. Steinman R. M., Cohn Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-1162.
59. Scheinecker C., McHugh R., Shevach E. M., Germain R. N. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med.* 2002;196(8):1079-1090.
60. Waisman A., Lukas D., Clausen B. E., Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol.* 2017;39(2):153-163.
61. Qian C., Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin Immunol.* 2018;35:3-11.
62. Delaunay T., Achard C., Grégoire M., Tangy F., Boisgerault N., Fonteneau J.-F. A Functional Assay to Determine the Capacity of Oncolytic Viruses to Induce Immunogenic Tumor Cell Death. In: Engeland C. E., editor. *Oncolytic Viruses.* New York: Springer New York; 2020. pp. 127-132.
63. Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V. S., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 1997;185(2):317-328.
64. Heath W. R., Carbone F. R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:47-64.
65. Durai V., Murphy Kenneth M. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity.* 2016;45(4):719-736.

66. Stuhler G., Walden P. Cancer immune therapy: current and future strategies. Weinheim: Wiley-VCH; 2002. pp. 181-234.
67. Zong J., Keskinov A. A., Shurin G. V., Shurin M. R. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(7):821-833.
68. Muñoz Wolf N., Lavelle E. A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity. *The FEBS Journal.* 2018;285:2377-2401.
69. Chen Daniel S., Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10.
70. Chan C. W., Housseau F. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):58-69.
71. Farhood B., Najafi M., Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8509-8521.
72. Bhattacharya P., Budnick I., Singh M., Thirupathi M., Alharshawi K., Elshabrawy H., Holterman M. J., Prabhakar B. S. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35(8):585-599.
73. Miller G., Pillarisetty V. G., Shah A. B., Lahrs S., Xing Z., DeMatteo R. P. Endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor overexpression in vivo results in the long-term recruitment of a distinct dendritic cell population with enhanced immunostimulatory function. *J Immunol.* 2002;169(6):2875-2885.
74. Mausberg A. K., Jander S., Reichmann G. Intracerebral granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces functionally competent dendritic cells in the mouse brain. *Glia.* 2009;57(12):1341-1350.
75. Armstrong C. A., Botella R., Galloway T. H., Murray N., Kramp J. M., Song I. S., Ansel J. C. Antitumor effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by melanoma cells. *Cancer Res.* 1996;56(9):2191-2198.
76. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R. C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993;90(8):3539-3543.
77. Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2(10):1096-1103.
78. van Mierlo G. J., Boonman Z. F., Dumortier H. M., den Boer A. T., Fransen M. F., Nouta J., van der Voort E. I., Offringa R., Toes R. E., Melief C. J. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol.* 2004;173(11):6753-6759.
79. Achard C., Surendran A., Wedge M. E., Ungerechts G., Bell J., Ilkow C. S. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine.* 2018;31:17-24.

80. Ascierto P. A., Capone M., Urba W. J., Bifulco C. B., Botti G., Lugli A., Marincola F. M., Ciliberto G., Galon J., Fox B. A. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*. 2013;11(1):54.
81. Sasidharan Nair V., Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(1):21-33.
82. Akdis C. A., Joss A., Akdis M., Faith A., Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *Faseb j*. 2000;14(12):1666-1668.
83. Thomas D. A., Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 2005;8(5):369-380.
84. Flavell R. A., Sanjabi S., Wrzesinski S. H., Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(8):554-567.
85. Belli C., Trapani D., Viale G., D'Amico P., Duso B. A., Della Vigna P., Orsi F., Curigliano G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018;65:22-32.
86. Zheng M., Huang J., Tong A., Yang H. Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Barriers and Recent Advances. *Mol Ther Oncolytics*. 2019;15:234-247.
87. Ylosmaki E., Cerullo V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;65:25-36.
88. Fukuhara H., Ino Y., Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci*. 2016;107(10):1373-1379.
89. Kelly E., Russell S. J. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. 2007;15(4):651-659.
90. Dock G. The influence of complicating diseases upon leukaemia. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*. 1904;127(4):563.
91. Pack G. T. Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *AMA Arch Derm Syphilol*. 1950;62(5):694-695.
92. Moore A. E. The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer*. 1949;2(3):525-534.
93. Lindenmann J., Klein P. A. Immunity to transplantable tumors following viral oncolysis. III. Antigenic similarities between three unspecific mouse tumors. *J Immunol*. 1965;94:461-466.
94. Eissa I. R., Bustos-Villalobos I., Ichinose T., Matsumura S., Naoe Y., Miyajima N., Morimoto D., Mukoyama N., Zhiwen W., Tanaka M., Hasegawa H., Sumigama S., Aleksic B., Koder Y., Kasuya H. The Current Status and Future Prospects of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic, and Breast Cancers. *Cancers (Basel)*. 2018;10(10).
95. Taqi A. M., Abdurrahman M. B., Yakubu A. M., Fleming A. F. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet*. 1981;317(8229):1112.
96. Bluming A. Z., Ziegler J. L. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet*. 1971;2(7715):105-106.

97. Martuza R. L., Malick A., Markert J. M., Ruffner K. L., Coen D. M. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*. 1991;252(5007):854-856.
98. Marchini A., Scott E. M., Rommelaere J. Overcoming Barriers in Oncolytic Virotherapy with HDAC Inhibitors and Immune Checkpoint Blockade. *Viruses*. 2016;8(1).
99. Bretscher C., Marchini A. H-1 Parvovirus as a Cancer-Killing Agent: Past, Present, and Future. *Viruses*. 2019;11(6).
100. Russell S. J., Peng K. W., Bell J. C. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):658-670.
101. Miest T. S., Cattaneo R. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(1):23-34.
102. Breitbach C. J., Arulanandam R., De Silva N., Thorne S. H., Patt R., Daneshmand M., Moon A., Ilkow C., Burke J., Hwang T. H., Heo J., Cho M., Chen H., Angarita F. A., Addison C., McCart J. A., Bell J. C., Kirn D. H. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res*. 2013;73(4):1265-1275.
103. Guo Z. S., Liu Z., Bartlett D. L. Oncolytic Immunotherapy: Dying the Right Way is a Key to Eliciting Potent Antitumor Immunity. *Front Oncol*. 2014;4:74.
104. Moehler M., Zeidler M., Schede J., Rommelaere J., Galle P. R., Cornelis J. J., Heike M. Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Ther*. 2003;10(6):477-480.
105. Sieben M., Schäfer P., Dinsart C., Galle P. R., Moehler M. Activation of the human immune system via toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1. *International Journal of Cancer*. 2013;132(11):2548-2556.
106. Moehler M., Goepfert K., Heinrich B., Breitbach C. J., Delic M., Galle P. R., Rommelaere J. Oncolytic virotherapy as emerging immunotherapeutic modality: potential of parvovirus h-1. *Front Oncol*. 2014;4:92.
107. Angelova A., Rommelaere J. Immune System Stimulation by Oncolytic Rodent Protoparvoviruses. *Viruses*. 2019;11(5).
108. Gao Y., Whitaker-Dowling P., Griffin J. A., Barmada M. A., Bergman I. Recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu combined with anti-CTLA4 antibody eliminates implanted mammary tumors. *Cancer Gene Therapy*. 2009;16(1):44-52.
109. Raja J., Ludwig J. M., Gettinger S. N., Schalper K. A., Kim H. S. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):140.
110. Li J., Bonifati S., Hristov G., Marttila T., Valmary-Degano S., Stanzel S., Schnölzer M., Mouglin C., Aprahamian M., Grekova S. P., Raykov Z., Rommelaere J., Marchini A. Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas. *EMBO Mol Med*. 2013;5(10):1537-1555.

111. Casares N., Pequignot M. O., Tesniere A., Ghiringhelli F., Roux S., Chaput N., Schmitt E., Hamai A., Hervas-Stubbs S., Obeid M., Coutant F., Métivier D., Pichard E., Aucouturier P., Pierron G., Garrido C., Zitvogel L., Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 2005;202(12):1691-1701.
112. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V., Kepp O., Martins I., Ghiringhelli F., Aymeric L., Michaud M., Apetoh L., Barault L., Mendiboure J., Pignon J. P., Jooste V., van Endert P., Ducreux M., Zitvogel L., Piard F., Kroemer G. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene.* 2010;29(4):482-491.
113. Schiavoni G., Sistigu A., Valentini M., Mattei F., Sestili P., Spadaro F., Sanchez M., Lorenzi S., D'Urso M. T., Belardelli F., Gabriele L., Proietti E., Bracci L. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res.* 2011;71(3):768-778.
114. Angelova A. L., Grekova S. P., Heller A., Kuhlmann O., Soyka E., Giese T., Aprahamian M., Bour G., Rüffer S., Cziepluch C., Daeffler L., Rommelaere J., Werner J., Raykov Z., Giese N. A. Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol.* 2014;88(10):5263-5276.
115. Yu Y. A., Galanis C., Woo Y., Chen N., Zhang Q., Fong Y., Szalay A. A. Regression of human pancreatic tumor xenografts in mice after a single systemic injection of recombinant vaccinia virus GLV-1h68. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(1):141-151.
116. Li L., You L. S., Mao L. P., Jin S. H., Chen X. H., Qian W. B. Combing oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 with chemotherapy agent doxorubicin synergistically enhances cytotoxicity in human CML cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(2):251-260.
117. Harrington K. J., Hingorani M., Tanay M. A., Hickey J., Bhide S. A., Clarke P. M., Renouf L. C., Thway K., Sibtain A., McNeish I. A., Newbold K. L., Goldsweig H., Coffin R., Nutting C. M. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2010;16(15):4005-4015.
118. Ramakrishnan R., Assudani D., Nagaraj S., Hunter T., Cho H. I., Antonia S., Altiook S., Celis E., Gabrilovich D. I. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1111-1124.
119. Graefe K.-H., Lutz W., Bönisch H. *Pharmakologie und Toxikologie. Duale Reihe.* 2. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. pp. 664-673.
120. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Suchbegriff: „Oncolytic Virus and Checkpoint Inhibitor“. Zitiert am 28.07.2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Oncolytic+Virus+and+Checkpoint+Inhibitor&cntry=&state=&city=&dist=2020>.
121. 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., Andtbacka R. H. Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB-IV Melanoma. *J Clin Oncol.* 2016;34(22):2619-2626.

122. Harrington K. J., Kong A., Mach N., Chesney J., Castelo Fernandez B., Rischin D., Cohen E. E. W., Radcliffe H.-S., Gumuscu B., Cheng J., Snyder W., Siu L. L. Talimogene Laherparepvec and Pembrolizumab in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (MASTERKEY-232): A Multicenter, Phase 1b Study. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(19).
123. Fares C. M., Van Allen E. M., Drake C. G., Allison J. P., Hu-Lieskovan S. Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:147-164.
124. Bommareddy P. K., Patel A., Hossain S., Kaufman H. L. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2017;18(1):1-15.
125. Hill A., Jugovic P., York I., Russ G., Bennink J., Yewdell J., Ploegh H., Johnson D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*. 1995;375(6530):411-415.
126. Varghese S., Rabkin S. D., Liu R., Nielsen P. G., Ipe T., Martuza R. L. Enhanced therapeutic efficacy of IL-12, but not GM-CSF, expressing oncolytic herpes simplex virus for transgenic mouse derived prostate cancers. *Cancer Gene Ther*. 2006;13(3):253-265.
127. Kaufman H. L., Kim D. W., DeRaffele G., Mitcham J., Coffin R. S., Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(3):718-730.
128. Wölfel T., Klehmann E., Müller C., Schütt K. H., Meyer zum Büschenfelde K. H., Knuth A. Lysis of human melanoma cells by autologous cytolytic T cell clones. Identification of human histocompatibility leukocyte antigen A2 as a restriction element for three different antigens. *J Exp Med*. 1989;170(3):797-810.
129. Greiner Bio-One. Gebrauchsanleitung Leucosep™ [Internet]. Letzte Aktualisierung: Februar 2019. Zitiert am 15.09.2020. URL: https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Product_Flyers/Product_Flyers_BioScience/F071043_Leucosep_Manual.pdf. Frickenhausen; 2019.
130. Miltenyi Biotec GmbH. MACS® Cell Separation: Select the best [Internet]. Zitiert am 23.06.2020. URL: <https://www.miltenyibiotec.com/Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf>. Bergisch Gladbach; 2017.
131. Bhargava S. Carbocyanin-markierte Derivate des Vasoaktiven Intestinalen Peptids für die Tumordiagnostik [PhD thesis]. Berlin: Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité; 2002.
132. Aerts-Toegaert C., Heirman C., Tuyaeerts S., Corthals J., Aerts J. L., Bonehill A., Thielemans K., Breckpot K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*. 2007;37(3):686-695.
133. Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999;21(3):565-582.
134. Dr. Mario Löwenstein, MEGACOR Diagnostik GmbH. Focused on Veterinary Diagnostics, Testverfahren, MegaELISA® / ELISA [Internet]. Zitiert am 07.07.2020. URL: https://www.megacor.at/veterinary/test_procedure.html.

135. Shi Y., Liu C. H., Roberts A. I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z. R., Tan H. S. W., Das G., Devadas S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*. 2006;16(2):126-133.
136. Lundberg P., Welander P., Han X., Cantin E. Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J Virol*. 2003;77(20):11158-11169.
137. Moesta A. K., Cooke K., Piasecki J., Mitchell P., Rottman J. B., Fitzgerald K., Zhan J., Yang B., Le T., Belmontes B., Ikotun O. F., Merriam K., Glaus C., Ganley K., Cordover D. H., Boden A. M., Ponce R., Beers C., Beltran P. J. Local Delivery of OncoVEX(mGM-CSF) Generates Systemic Antitumor Immune Responses Enhanced by Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein Blockade. *Clin Cancer Res*. 2017;23(20):6190-6202.
138. Elkord E., Williams P. E., Kynaston H., Rowbottom A. W. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 2005;114(2):204-212.
139. Rimmel E., Terracciano L., Noppen C., Zajac P., Heberer M., Spagnoli G. C., Padovan E. Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells in vitro. *Hum Immunol*. 2001;62(1):39-49.
140. Burke S., Shergold A., Elder M. J., Whitworth J., Cheng X., Jin H., Wilkinson R. W., Harper J., Carroll D. K. Oncolytic Newcastle disease virus activation of the innate immune response and priming of antitumor adaptive responses in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(6):1015-1027.
141. Grosjean I., Caux C., Bella C., Berger I., Wild F., Banchereau J., Kaiserlian D. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186(6):801-812.
142. Schierer S., Hesse A., Müller I., Kämpgen E., Curiel D. T., Schuler G., Steinkasserer A., Nettelbeck D. M. Modulation of viability and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by oncolytic adenoviruses. *Int J Cancer*. 2008;122(1):219-229.
143. Liu T., Zhang Y., Cao Y., Jiang S., Sun R., Yin J., Gao Z., Ren G., Wang Z., Yu Q., Sui G., Sun X., Sun W., Xiao W., Li D. Optimization of oncolytic effect of Newcastle disease virus Clone30 by selecting sensitive tumor host and constructing more oncolytic viruses. *Gene Ther*. 2020.
144. Reale A., Vitiello A., Conciatori V., Parolin C., Calistri A., Palu G. Perspectives on immunotherapy via oncolytic viruses. *Infect Agent Cancer*. 2019;14:5.
145. Bommareddy P. K., Zloza A., Rabkin S. D., Kaufman H. L. Oncolytic virus immunotherapy induces immunogenic cell death and overcomes STING deficiency in melanoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(7).
146. Schierer S., Hesse A., Knippertz I., Kaempgen E., Baur A. S., Schuler G., Steinkasserer A., Nettelbeck D. M. Human dendritic cells efficiently phagocytose adenoviral oncolysate but require additional stimulation to mature. *Int J Cancer*. 2012;130(7):1682-1694.
147. Ma J., Ramachandran M., Jin C., Quijano-Rubio C., Martikainen M., Yu D., Essand M. Characterization of virus-mediated immunogenic cancer cell death and the consequences for oncolytic virus-based immunotherapy of cancer. *Cell Death Dis*. 2020;11(1):48.

148. Lejeune F. J., Liénard D., Matter M., Rüegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun.* 2006;6:6.
149. Benencia F., Courreges M. C., Conejo-García J. R., Buckanovich R. J., Zhang L., Carroll R. H., Morgan M. A., Coukos G. Oncolytic HSV exerts direct antiangiogenic activity in ovarian carcinoma. *Hum Gene Ther.* 2005;16(6):765-778.
150. Brunner C., Seiderer J., Schlamp A., Bidlingmaier M., Eigler A., Haimerl W., Lehr H. A., Krieg A. M., Hartmann G., Endres S. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol.* 2000;165(11):6278-6286.
151. Adams S., O'Neill D. W., Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* 2005;25(3):177-188.
152. Pasare C., Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299(5609):1033-1036.
153. Teague T. K., Schaefer B. C., Hildeman D., Bender J., Mitchell T., Kappler J. W., Marrack P. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *J Exp Med.* 2000;191(6):915-926.
154. Gagnon J., Ramanathan S., Leblanc C., Cloutier A., McDonald P. P., Ilangumaran S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2008;180(12):7958-7968.
155. Di Pilato M., Mejías-Pérez E., Sorzano C. O. S., Esteban M. Distinct Roles of Vaccinia Virus NF-κB Inhibitor Proteins A52, B15, and K7 in the Immune Response. *J Virol.* 2017;91(13).
156. Gett A. V., Sallusto F., Lanzavecchia A., Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol.* 2003;4(4):355-360.
157. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47(6):946-953.
158. Saldanha-Araujo F., Haddad R., Farias K. C., Souza Ade P., Palma P. V., Araujo A. G., Orellana M. D., Voltarelli J. C., Covas D. T., Zago M. A., Panepucci R. A. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-κB signalling. *J Cell Mol Med.* 2012;16(6):1232-1244.
159. Sancho D., Gómez M., Viedma F., Esplugues E., Gordón-Alonso M., García-López M. A., de la Fuente H., Martínez A. C., Lauzurica P., Sánchez-Madrid F. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest.* 2003;112(6):872-882.
160. Yu L., Yang F., Zhang F., Guo D., Li L., Wang X., Liang T., Wang J., Cai Z., Jin H. CD69 enhances immunosuppressive function of regulatory T-cells and attenuates colitis by prompting IL-10 production. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):905.

161. Kern D. E., Gillis S., Okada M., Henney C. S. The role of interleukin-2 (IL-2) in the differentiation of cytotoxic T cells: the effect of monoclonal anti-IL-2 antibody and absorption with IL-2 dependent T cell lines. *J Immunol.* 1981;127(4):1323-1328.
162. Thornton A. M., Donovan E. E., Piccirillo C. A., Shevach E. M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172(11):6519-6523.
163. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology.* 2005;6(4):345-352.
164. Mostafa A. A., Meyers D. E., Thirukkumaran C. M., Liu P. J., Gratton K., Spurrell J., Shi Q., Thakur S., Morris D. G. Oncolytic Reovirus and Immune Checkpoint Inhibition as a Novel Immunotherapeutic Strategy for Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2018;10(6).
165. Noonan A. M., Farren M. R., Geyer S. M., Huang Y., Tahiri S., Ahn D., Mikhail S., Ciombor K. K., Pant S., Aparo S., Sexton J., Marshall J. L., Mace T. A., Wu C. S., El-Rayes B., Timmers C. D., Zwiebel J., Lesinski G. B., Villalona-Calero M. A., Bekaii-Saab T. S. Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Mol Ther.* 2016;24(6):1150-1158.
166. Kaufman H. L., Deraffe G., Mitcham J., Moroziewicz D., Cohen S. M., Hurst-Wicker K. S., Cheung K., Lee D. S., Divito J., Voulo M., Donovan J., Dolan K., Manson K., Panicali D., Wang E., Hörig H., Marincola F. M. Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1903-1912.
167. Braidwood L., Graham S. V., Graham A., Conner J. Oncolytic herpes viruses, chemotherapeutics, and other cancer drugs. *Oncolytic Virother.* 2013;2:57-74.
168. Bosisio D., Polentarutti N., Sironi M., Bernasconi S., Miyake K., Webb G. R., Martin M. U., Mantovani A., Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood.* 2002;99(9):3427-3431.
169. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-795.
170. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189.
171. Hirooka Y., Kasuya H., Ishikawa T., Kawashima H., Ohno E., Villalobos I. B., Naoe Y., Ichinose T., Koyama N., Tanaka M., Kodera Y., Goto H. A Phase I clinical trial of EUS-guided intratumoral injection of the oncolytic virus, HF10 for unresectable locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2018;18(1):596.
172. Miller C. G., Fraser N. W. Role of the immune response during neuro-attenuated herpes simplex virus-mediated tumor destruction in a murine intracranial melanoma model. *Cancer Res.* 2000;60(20):5714-5722.

173. Miller C. G., Fraser N. W. Requirement of an integrated immune response for successful neuroattenuated HSV-1 therapy in an intracranial metastatic melanoma model. *Mol Ther.* 2003;7(6):741-747.
174. Hoeller C., Michielin O., Ascierto P. A., Szabo Z., Blank C. U. Systematic review of the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(9):1015-1034.
175. Gomez-Cambronero J., Horn J., Paul C. C., Baumann M. A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol.* 2003;171(12):6846-6855.
176. Coffelt S. B., Kersten K., Doornebal C. W., Weiden J., Vrijland K., Hau C. S., Versteegen N. J. M., Ciampricotti M., Hawinkels L., Jonkers J., de Visser K. E. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522(7556):345-348.
177. Hodi F. S., Lee S., McDermott D. F., Rao U. N., Butterfield L. H., Tarhini A. A., Leming P., Puzanov I., Shin D., Kirkwood J. M. Ipilimumab plus sargramostim vs ipilimumab alone for treatment of metastatic melanoma: a randomized clinical trial. *Jama.* 2014;312(17):1744-1753.
178. O'Day S. J., Boasberg P. D., Piro L., Kristedja T. S., Wang H. J., Martin M., Deck R., Ames P., Shinn K., Kim H., Fournier P., Gammon G. Maintenance biotherapy for metastatic melanoma with interleukin-2 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves survival for patients responding to induction concurrent biochemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2002;8(9):2775-2781.
179. Eroglu Z., Kong K. M., Jakowatz J. G., Samlowski W., Fruehauf J. P. Phase II clinical trial evaluating docetaxel, vinorelbine and GM-CSF in stage IV melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(4):1081-1087.
180. Spitler L. E., Grossbard M. L., Ernstoff M. S., Silver G., Jacobs M., Hayes F. A., Soong S. J. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol.* 2000;18(8):1614-1621.
181. Hwang T. H., Moon A., Burke J., Ribas A., Stephenson J., Breitbach C. J., Daneshmand M., De Silva N., Parato K., Diallo J. S., Lee Y. S., Liu T. C., Bell J. C., Kirn D. H. A mechanistic proof-of-concept clinical trial with JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, in patients with metastatic melanoma. *Mol Ther.* 2011;19(10):1913-1922.
182. Burke J. M., Lamm D. L., Meng M. V., Nemunaitis J. J., Stephenson J. J., Arseneau J. C., Aimi J., Lerner S., Yeung A. W., Kazarian T., Maslyar D. J., McKiernan J. M. A first in human phase 1 study of CG0070, a GM-CSF expressing oncolytic adenovirus, for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 2012;188(6):2391-2397.
183. Bramante S., Kaufmann J. K., Veckman V., Liikanen I., Nettelbeck D. M., Hemminki O., Vassilev L., Cerullo V., Oksanen M., Heiskanen R., Joensuu T., Kanerva A., Pesonen S., Matikainen S., Vähä-Koskela M., Koski A., Hemminki A. Treatment of melanoma with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus coding for GM-CSF: Results in vitro, in rodents and in humans. *Int J Cancer.* 2015;137(7):1775-1783.

184. Kohno S. i., Luo C., Nawa A., Fujimoto Y., Watanabe D., Goshima F., Tsurumi T., Nishiyama Y. Oncolytic virotherapy with an HSV amplicon vector expressing granulocyte–macrophage colony-stimulating factor using the replication-competent HSV type 1 mutant HF10 as a helper virus. *Cancer Gene Therapy*. 2007;14(11):918-926.
185. Kemp V., van den Wollenberg D. J. M., Camps M. G. M., van Hall T., Kinderman P., Pronk-van Montfoort N., Hoeben R. C. Arming oncolytic reovirus with GM-CSF gene to enhance immunity. *Cancer Gene Ther*. 2019;26(9-10):268-281.
186. Kim M., Nitschké M., Sennino B., Murer P., Schriver B. J., Bell A., Subramanian A., McDonald C. E., Wang J., Cha H., Bourgeois-Daigneault M. C., Kirn D. H., Bell J. C., De Silva N., Breitbach C. J., McDonald D. M. Amplification of Oncolytic Vaccinia Virus Widespread Tumor Cell Killing by Sunitinib through Multiple Mechanisms. *Cancer Res*. 2018;78(4):922-937.
187. Cerullo V., Pesonen S., Diaconu I., Escutenaire S., Arstila P. T., Ugolini M., Nokisalmi P., Raki M., Laasonen L., Särkioja M., Rajecki M., Kangasniemi L., Guse K., Helminen A., Ahtiainen L., Ristimäki A., Räisänen-Sokolowski A., Haavisto E., Oksanen M., Karli E., Karioja-Kallio A., Holm S. L., Kouri M., Joensuu T., Kanerva A., Hemminki A. Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients. *Cancer Res*. 2010;70(11):4297-4309.
188. Ottolino-Perry K., Diallo J. S., Lichty B. D., Bell J. C., McCart J. A. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. *Mol Ther*. 2010;18(2):251-263.
189. Plenderleith I. H. Treating the treatment: toxicity of cancer chemotherapy. *Can Fam Physician*. 1990;36:1827-1830.
190. Wennier S. T., Liu J., McFadden G. Bugs and drugs: oncolytic virotherapy in combination with chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(9):1817-1833.
191. Bugaut H., Bruchard M., Berger H., Derangère V., Odoul L., Euvrard R., Ladoire S., Chalmin F., Végran F., Rébé C., Apetoh L., Ghiringhelli F., Mignot G. Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells. *PLoS One*. 2013;8(6).
192. Raki M., Särkioja M., Desmond R. A., Chen D.-T., Bützow R., Hemminki A., Kanerva A. Oncolytic adenovirus Ad5/3- Δ 24 and chemotherapy for treatment of orthotopic ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008;108(1):166-172.
193. Sieben M., Herzer K., Zeidler M., Heinrichs V., Leuchs B., Schuler M., Cornelis J. J., Galle P. R., Rommelaere J., Moehler M. Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein. *World J Gastroenterol*. 2008;14(24):3819-3828.
194. Eisenberg D. P., Adusumilli P. S., Hendershott K. J., Yu Z., Mullerad M., Chan M. K., Chou T. C., Fong Y. 5-fluorouracil and gemcitabine potentiate the efficacy of oncolytic herpes viral gene therapy in the treatment of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(8):1068-1079.
195. McCart J. A., Puhlmann M., Lee J., Hu Y., Libutti S. K., Alexander H. R., Bartlett D. L. Complex interactions between the replicating oncolytic effect and the enzyme/prodrug effect of vaccinia-mediated tumor regression. *Gene Ther*. 2000;7(14):1217-1223.

196. Kulu Y., Kawasaki H., Donahue J. M., Kasuya H., Cusack J. C., Choi E. W., Kuruppu D. K., Fuchs B. C., Tanabe K. K. Concurrent chemotherapy inhibits herpes simplex virus-1 replication and oncolysis. *Cancer Gene Ther.* 2013;20(2):133-140.
197. Watanabe I., Kasuya H., Nomura N., Shikano T., Shirota T., Kanazumi N., Takeda S., Nomoto S., Sugimoto H., Nakao A. Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61(5):875-882.
198. Kaneno R., Shurin G. V., Tourkova I. L., Shurin M. R. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med.* 2009;7:58.
199. Shurin G. V., Tourkova I. L., Kaneno R., Shurin M. R. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol.* 2009;183(1):137-144.
200. Cinatl J., Cinatl J., Michaelis M., Kabickova H., Kotchetkov R., Vogel J.-U., Doerr H. W., Klingebiel T., Driever P. H. Potent Oncolytic Activity of Multimutated Herpes Simplex Virus G207 in Combination with Vincristine against Human Rhabdomyosarcoma. *Cancer Research.* 2003;63(7):1508-1514.
201. Park K. J., Yu M. O., Park D. H., Park J. Y., Chung Y. G., Kang S. H. Role of vincristine in the inhibition of angiogenesis in glioblastoma. *Neurol Res.* 2016;38(10):871-879.
202. Albertsson P., Lennernäs B., Norrby K. Dose effects of continuous vinblastine chemotherapy on mammalian angiogenesis mediated by VEGF-A. *Acta Oncol.* 2008;47(2):293-300.
203. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A., Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):15-25.
204. Chen J., Huang X., Huang G., Chen Y., Chen L., Song H. Preconditioning chemotherapy with cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012;27(3):210-220.
205. Buttiglieri S., Galetto A., Forno S., De Andrea M., Matera L. Influence of drug-induced apoptotic death on processing and presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Int J Cancer.* 2003;106(4):516-520.
206. Sistigu A., Yamazaki T., Vacchelli E., Chaba K., Enot D. P., Adam J., Vitale I., Goubar A., Baracco E. E., Remédios C., Fend L., Hannani D., Aymeric L., Ma Y., Niso-Santano M., Kepp O., Schultze J. L., Tüting T., Belardelli F., Bracci L., La Sorsa V., Ziccheddu G., Sestili P., Urbani F., Delorenzi M., Lacroix-Triki M., Quidville V., Conforti R., Spano J. P., Puztai L., Poirier-Colame V., Delaloge S., Penault-Llorca F., Ladoire S., Arnould L., Cyrta J., Dessoliers M. C., Eggermont A., Bianchi M. E., Pittet M., Engblom C., Pfirschke C., Prévigne X., Uzé G., Schreiber R. D., Chow M. T., Smyth M. J., Proietti E., André F., Kroemer G., Zitvogel L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med.* 2014;20(11):1301-1309.

207. Hu J., Kinn J., Zirakzadeh A. A., Sherif A., Norstedt G., Wikström A. C., Winqvist O. The effects of chemotherapeutic drugs on human monocyte-derived dendritic cell differentiation and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(3):490-499.
208. Kim J. E., Jang M. J., Lee J. I., Chung Y. H., Jeong J. H., Hung C. F., Kim D. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4⁺ T cells in peritoneal space. *J Immunother.* 2012;35(1):1-13.
209. Tsuchikawa T., Miyamoto M., Yamamura Y., Shichinohe T., Hirano S., Kondo S. The immunological impact of neoadjuvant chemotherapy on the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(5):1713-1719.
210. Chang C. L., Hsu Y. T., Wu C. C., Lai Y. Z., Wang C., Yang Y. C., Wu T. C., Hung C. F. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res.* 2013;73(1):119-127.
211. Hingorani P., Zhang W., Lin J., Liu L., Guha C., Kolb E. A. Systemic administration of reovirus (Reolysin) inhibits growth of human sarcoma xenografts. *Cancer.* 2011;117(8):1764-1774.
212. Sei S., Mussio J. K., Yang Q. E., Nagashima K., Parchment R. E., Coffey M. C., Shoemaker R. H., Tomaszewski J. E. Synergistic antitumor activity of oncolytic reovirus and chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer.* 2009;8:47.
213. Adusumilli P. S., Chan M. K., Chun Y. S., Hezel M., Chou T. C., Rusch V. W., Fong Y. Cisplatin-induced GADD34 upregulation potentiates oncolytic viral therapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(1):48-53.
214. Toyozumi T., Mick R., Abbas A. E., Kang E. H., Kaiser L. R., Molnar-Kimber K. L. Combined therapy with chemotherapeutic agents and herpes simplex virus type 1 ICP34.5 mutant (HSV-1716) in human non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther.* 1999;10(18):3013-3029.
215. Chahlavi A., Todo T., Martuza R. L., Rabkin S. D. Replication-competent herpes simplex virus vector G207 and cisplatin combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia.* 1999;1(2):162-169.
216. Kasuya H., Nishiyama Y., Nomoto S., Goshima F., Takeda S., Watanabe I., Nomura N., Shikano T., Fujii T., Kanazumi N., Nakao A. Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic virus for pancreatic cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2007;14(6):533-542.
217. Passer B. J., Castelo-Branco P., Buhrman J. S., Varghese S., Rabkin S. D., Martuza R. L. Oncolytic herpes simplex virus vectors and taxanes synergize to promote killing of prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 2009;16(7):551-560.
218. Pandha H. S., Heinemann L., Simpson G. R., Melcher A., Prestwich R., Errington F., Coffey M., Harrington K. J., Morgan R. Synergistic Effects of Oncolytic Reovirus and Cisplatin Chemotherapy in Murine Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research.* 2009;15(19):6158-6166.

219. Zitvogel L., Kepp O., Senovilla L., Menger L., Chaput N., Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res.* 2010;16(12):3100-3104.
220. Bolyard C., Yoo J. Y., Wang P. Y., Saini U., Rath K. S., Cripe T. P., Zhang J., Selvendiran K., Kaur B. Doxorubicin synergizes with 34.5ENVE to enhance antitumor efficacy against metastatic ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(24):6479-6494.
221. Wang Y., Wang B., Liang J., Cui C., Ying C., Huang F., Ma B., Zhou X., Chu L. Oncolytic viro-chemotherapy exhibits antitumor effect in laryngeal squamous cell carcinoma cells and mouse xenografts. *Cancer Manag Res.* 2019;11:3285-3294.
222. Simpson G. R., Relph K., Harrington K., Melcher A., Pandha H. Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. *Oncolytic Virother.* 2016;5:1-13.
223. U.S. National Library of Medicine, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute. Talimogene Laherparepvec in Combination With Neoadjuvant Chemotherapy in Triple Negative Breast Cancer [Internet]. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT02779855. Letzte Aktualisierung: 22.05.2020. Zitiert am 22.09.2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02779855?term=Talimogene+laherparepvec>.
224. Heo J., Reid T., Ruo L., Breitbach C. J., Rose S., Bloomston M., Cho M., Lim H. Y., Chung H. C., Kim C. W., Burke J., Lencioni R., Hickman T., Moon A., Lee Y. S., Kim M. K., Daneshmand M., Dubois K., Longpre L., Ngo M., Rooney C., Bell J. C., Rhee B. G., Patt R., Hwang T. H., Kirn D. H. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med.* 2013;19(3):329-336.
225. Geletneky K., Hajda J., Angelova A. L., Leuchs B., Capper D., Bartsch A. J., Neumann J. O., Schöning T., Hüsing J., Beelte B., Kiprianova I., Roscher M., Bhat R., von Deimling A., Brück W., Just A., Frehtman V., Löbhard S., Terletskaia-Ladwig E., Fry J., Jochims K., Daniel V., Krebs O., Dahm M., Huber B., Unterberg A., Rommelaere J. Oncolytic H-1 Parvovirus Shows Safety and Signs of Immunogenic Activity in a First Phase I/IIa Glioblastoma Trial. *Mol Ther.* 2017;25(12):2620-2634.
226. Kiyohara E., Tanemura A., Nishioka M., Yamada M., Tanaka A., Yokomi A., Saito A., Sakura K., Nakajima T., Myoui A., Sakurai T., Kawakami Y., Kaneda Y., Katayama I. Intratumoral injection of hemagglutinating virus of Japan-envelope vector yielded an antitumor effect for advanced melanoma: a phase I/IIa clinical study. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(6):1131-1140.
227. Karapanagiotou E. M., Roulstone V., Twigger K., Ball M., Tanay M., Nutting C., Newbold K., Gore M. E., Larkin J., Syrigos K. N., Coffey M., Thompson B., Mettinger K., Vile R. G., Pandha H. S., Hall G. D., Melcher A. A., Chester J., Harrington K. J. Phase I/II trial of carboplatin and paclitaxel chemotherapy in combination with intravenous oncolytic reovirus in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 2012;18(7):2080-2089.

228. Galanis E., Okuno S. H., Nascimento A. G., Lewis B. D., Lee R. A., Oliveira A. M., Sloan J. A., Atherton P., Edmonson J. H., Erlichman C., Randlev B., Wang Q., Freeman S., Rubin J. Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Gene Ther.* 2005;12(5):437-445.
229. Opyrchal M., Aderca I., Galanis E. Phase I clinical trial of locoregional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in combination with mitomycin-C, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Methods Mol Biol.* 2009;542:705-717.
230. Bommareddy P. K., Aspromonte S., Zloza A., Rabkin S. D., Kaufman H. L. MEK inhibition enhances oncolytic virus immunotherapy through increased tumor cell killing and T cell activation. *Science Translational Medicine.* 2018;10(471).
231. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Suchbegriff: „T-VEC and Chemotherapy“. Zitiert am 25.09.2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=T-VEC+Chemotherapy&cntry=&state=&city=&dist=2020>.
232. Fulci G., Breyman L., Gianni D., Kurozumi K., Rhee S. S., Yu J., Kaur B., Louis D. N., Weissleder R., Caligiuri M. A., Chiocca E. A. Cyclophosphamide enhances glioma virotherapy by inhibiting innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(34):12873-12878.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Primär danke ich xxx für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die fachkundige Betreuung meiner Arbeit.

xxx danke ich für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit.

Mein ganz herzlicher Dank geht an xxx für ihre kompetente und geduldige Betreuung und die guten fachlichen und nicht fachlichen Gespräche. Vielen Dank für die Hilfe bei der praktischen Arbeit und beim Verfassen dieser Dissertation.

Auch xxx gilt mein großer Dank für die unermüdliche und liebe Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Danke für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche und die vielen guten Ratschläge.

Danke auch an Frau xxx für die fachkundige Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium und die Durchführung dieser Arbeit mit dem hierdurch bedingten Zeitaufwand ermöglicht haben. Auch beim Rest meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für das Korrekturlesen und die guten Ratschläge.

Lebenslauf

Name Veronika Elisabeth Böswald
Geburtsdatum 28. Januar 1996 in Erlangen
Nationalität Deutsch

Schulbildung

2002-2006 Grundschule Theresienschule Münster
2006-2014 Gymnasium Marienschule Münster
Abschluss: Abitur 06/2014 (Note 1,1)

Hochschulbildung

Ab 10/2014 Johannes-Gutenberg Universität Mainz,
Humanmedizin
09/2016 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
04/2020 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
11/2021 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
WS 2017/2018 Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Famulaturen

06.03. – 05.04.2017 Katholisches Klinikum Mainz, Innere Medizin
26.02. – 27.03.2018 Kinderarztpraxis Dr. XXX, Münster
15.08. – 14.09.2018 Akademie für Manuelle Medizin der WWU Münster
18.02. – 19.03.2019 Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der
Universitätsmedizin Mainz

Praktisches Jahr

16.11.2020 – 07.03.2021 Klinikum St. Marienwörth Bad Kreuznach, Innere
Medizin
08.03.2021 – 27.06.2021 DRK Klinikum Alzey, Chirurgie
28.06.2021 – 17.10.2021 Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen Trier,
Pädiatrie

Promotion

Seit 10/2018 I. Medizinische Klinik Universitätsmedizin Mainz,
„Charakterisierung der verbesserten menschlichen
Immunreaktionen durch GM-CSF-kodierende
HSV-1 induzierte Melanomzelllysate“