

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

Charakterisierung der onkolytischen Parvovirus H-1 induzierten  
Immunzellaktivierung in immunogenen und mesenchymal aktiven  
Subgruppen des kolorektalen Karzinoms CMS-1 und CMS-4

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

Vorgelegt von

Wiebke Dickfeld  
aus Wiesbaden

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 05.08.2024

Für meine Eltern

und für meine Großmutter.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER HINTERGRUND .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Kolorektales Karzinom (KRK).....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Epidemiologie .....	2
2.1.2	Risikofaktoren, Symptome und Prävention .....	2
2.1.3	Pathogenese, Diagnostik und Staging.....	3
2.1.4	CMS-Klassifizierung.....	3
2.1.5	Therapie des KRK .....	4
<b>2.2</b>	<b>Humanes Immunsystem.....</b>	<b>5</b>
2.2.1	Überblick.....	5
2.2.2	Zellen und Mediatoren des Immunsystems.....	6
2.2.3	Tumor Escape Mechanismen .....	8
<b>2.3</b>	<b>Onkolytische Viren.....</b>	<b>9</b>
2.3.1	Onkolytische Viren in Historie und Gegenwart.....	9
2.3.2	Parvovirus H-1 im Überblick.....	10
2.3.3	H-1PV – Therapieoptionen beim KRK.....	11
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.2.1	Zellkultivierung.....	19
3.2.2	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	19
3.2.3	Passage der Zellen.....	19
3.2.4	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung .....	20
3.2.5	Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay .....	20
3.2.6	Gewinnung der PBMCs .....	21
<b>3.3</b>	<b>Infektion von Zellen mit H-1PV.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Kokultivierung mit PBMCs.....</b>	<b>22</b>
3.4.1	Grundlagen .....	22
3.4.2	Durchführung der Kokultivierung .....	22
<b>3.5</b>	<b>Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Analyse.....</b>	<b>25</b>
3.5.1	Grundlagen .....	25
3.5.2	Durchführung der FACS-Analyse.....	25
<b>3.6</b>	<b>Analyse der Zytokin-Produktion mittels ELISA .....</b>	<b>26</b>

3.6.1	Grundlagen .....	26
3.6.2	Durchführung des ELISA.....	26
<b>3.7</b>	<b>Statistische Verfahren .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellviabilität der CMS-1- und CMS-4-Zelllinien (MTT-Assay).....</b>	<b>28</b>
4.1.1	DLD-1 (KRK-CMS-1) .....	28
4.1.2	HCT-15 (KRK-CMS-1) .....	29
4.1.3	SW-480 (KRK-CMS-4) .....	29
4.1.4	CL-11 (KRK-CMS-4).....	30
4.1.5	Vergleich der CMS-1- und CMS-4-Zelllinien .....	31
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der PBMCs nach Kokultivierung mit H-1PV-infizierten KRK-Zellen</b>	<b>32</b>
4.2.1	Treg-Anteil an den PBMCs .....	33
4.2.2	Anteil aktivierter Tregs an den PBMCs.....	34
4.2.3	Anteil aktivierter T <sub>H</sub> -Zellen .....	35
4.2.4	Anteil der aktivierten CTLs (CD8+-T-Zellen) .....	36
4.2.5	Anteil der NK-Zellen .....	37
4.2.6	Anteil der ausgereiften NK-Zellen .....	38
4.2.7	Anteil der NK-T-Zellen .....	39
4.2.8	Anteil ausgereifter NK-T-Zellen .....	40
4.2.9	Übersicht der FACS-Ergebnisse nach H-1PV-Infektion .....	41
<b>4.3</b>	<b>Produktion von Zytokinen und Granzym in Kokulturen aus KRK-Zellen mit und ohne H-1PV-Infektion und PBMCs .....</b>	<b>42</b>
4.3.1	TNF- $\alpha$ .....	43
4.3.1	IL-10 .....	44
4.3.2	IL-2 .....	45
4.3.3	IFN- $\gamma$ .....	46
4.3.4	Granzym B.....	47
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Effekt der H-1PV-Infektion auf die Zellviabilität von KRK-CMS-1- und -4-Zelllinien ...</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Effekt der KRK-Zellen auf die Entwicklung von Immunzell-Subpopulationen (Kokultur-Versuche) .....</b>	<b>51</b>
5.2.1	Einfluss von KRK-Zellen auf die Immunzell-Ausreifung (FACS-Analyse).....	51
5.2.2	Einfluss einer H-1PV-Infektion der KRK-Zellen auf die Ausreifung von Immunzellen	57
<b>5.3</b>	<b>Zytokin-Produktion in den Kokultur-Versuchen.....</b>	<b>59</b>
5.3.1	Zytokin-Produktion ohne H-1PV-Infektion.....	59

5.3.2	Zytokin-Produktion nach H-1PV-Infektion .....	61
<b>5.4</b>	<b>Limitationen .....</b>	<b>63</b>
<b>5.5</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>63</b>
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>81</b>

# 1 EINLEITUNG

Das kolorektale Karzinom (KRK) geht für viele Patienten mit einer schweren Einschränkung der Gesundheit einher (1). Trotz umfangreicher Präventionsmaßnahmen gehört das KRK zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland (1, 2). Verbesserte Therapieoptionen des KRK könnten die Lebensqualität Betroffener erhöhen, die Sterblichkeit verringern und das Gesundheitssystem entlasten. Neben etablierten Behandlungsmethoden stellen individuelle Verfahren neue Optionen dar. Die Gliederung des KRK in vier Consensus molecular subtypes (CMS) erlaubt eine Einschätzung der Pathologie des individuellen Tumors und möglicherweise eine differenzierte Prognose und Therapie (3, 4).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Analyse der Rolle des Immunsystems beim KRK. Durch Tumor Escape Mechanismen gelingt es den Tumorzellen, der Immunabwehr zu entgehen (5, 6). Onkolytische Viren und speziell das H-1 Parvovirus (H-1PV) besitzen daher therapeutisches Potenzial (7). Das kleine Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Virus eignet sich aufgrund der üblicherweise klinisch stummen Infektion für eine Therapie mit geringem Nebenwirkungsspektrum (8). Durch die H-1PV-Tumorselektivität werden vorzugsweise KRK-Zellen infiziert und somit für das körpereigene Immunsystem sichtbar (9). Neben dem direkten onkolytischen Effekt ist auch die Immunzellaktivierung durch das H-1PV für die Therapie des KRK von Interesse (7, 10). Hierbei spielen der in Abhängigkeit vom CMS unterschiedliche Einfluss der Immunzellen sowie mögliche Interaktionen mit weiteren Therapeutika im Rahmen von Kombinationstherapien eine Rolle (10, 11).

## **2 THEORETISCHER HINTERGRUND**

### **2.1 Kolorektales Karzinom (KRK)**

#### **2.1.1 Epidemiologie**

Das KRK zählt zu den häufigsten Krebserkrankung in Deutschland (2). Laut dem Robert-Koch-Institut liegt das KRK bundesweit bei Männern bei Krebsneuerkrankungen auf Platz 3 und bei Frauen auf Platz 2 (Stand 2017) (12). Die Zahl der KRK-Neuerkrankungen beträgt jährlich ca. 60.000 (1, 12). Das Erkrankungsrisiko nimmt im Alter zu, nur etwa 10 % erkranken vor dem 55. Lebensjahr (2). Durch im Regelfall ab dem 50. Lebensjahr empfohlene Vorsorgeuntersuchungen werden viele Karzinome in frühen Stadien entdeckt, wodurch die Sterberate in den vergangenen Jahren gesunken ist (1, 2). Dennoch bleibt das KRK mit jährlich 26.000 Sterbefällen in Deutschland die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache (1, 2).

#### **2.1.2 Risikofaktoren, Symptome und Prävention**

Zahlreiche Risikofaktoren tragen zur Entstehung des KRK bei. Neben Lebensgewohnheiten (z. B. ballaststoffarme Ernährung, Rauchen, übermäßiger Konsum von Alkohol oder rotem Fleisch) zählen auch genetische Veranlagungen zu den Risikofaktoren für die Entstehung des KRK (13). Das Vorliegen von Adenomen im Bereich des Kolons oder Rektums kann eine Entartung und Entstehung eines KRK zur Folge haben (14). Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (z. B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) gehen mit einem erhöhten Entartungsrisiko einher (1, 15). Darüber hinaus kommt das KRK bei Patienten mit genetisch vererbten Erkrankungen (z. B. Peutz-Jeghers-Syndrom) häufiger vor (1).

KRK sind durch ein in der Regel langsames Tumorwachstum gekennzeichnet. Daher verläuft die Erkrankung häufig lange Zeit ohne oder nur mit milden Symptomen (16). Beschwerden wie Stuhlveränderungen, eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, ein Gewichtsverlust oder Schmerzen treten nicht selten erst in fortgeschrittenen Stadien auf (16). Daher kommt den Vorsorgeuntersuchungen eine hohe Bedeutung zu (17). Bei Männern ab dem 50. Lebensjahr und bei Frauen ab dem 55. Lebensjahr wird eine Koloskopie alle 10 Jahre empfohlen (1, 17). Wird eine Koloskopie abgelehnt, sollten alternativ eine Sigmoidoskopie und jährliche Untersuchungen auf Blutbeimengungen im

Stuhl (fäkaler okkultur Bluttest) erfolgen (1). Für Patienten mit einer genetischen Prädisposition, bestimmten Vorerkrankungen oder auffälligen Befunden gelten abweichende Empfehlungen (1). Durch die Vorsorgeuntersuchungen lassen sich viele Adenome vor der Entartung oder Karzinome in frühen Stadien nachweisen. Eine präventive Entfernung der Adenome bzw. frühzeitige Therapie eines Karzinoms trägt zur Senkung der Sterberate bei (18).

### **2.1.3 Pathogenese, Diagnostik und Staging**

Adenokarzinome machen den überwiegenden Anteil der KRK aus. Pathophysiologisch gehen den meisten KRK Adenome im Bereich des Dickdarms voraus. Dieser Entstehungsmechanismus wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet (14).

Nach einer KRK-Diagnose mittels Koloskopie und Biopsie folgen weitere diagnostische Maßnahmen, um das für den Patienten geeignete Therapieschema festzulegen (1). Die diagnostischen Maßnahmen umfassen laut der aktuellen S3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. neben einer umfangreichen Anamnese, körperlichen Untersuchung inklusive digital-rektaler Untersuchung und Koloskopie mindestens eine Abdomensonographie sowie Röntgenaufnahmen des Thorax. Zusätzliche Untersuchungen sind je nach Krankheitsbild zu ergänzen (1).

Weitere bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT) von Abdomen, Becken und ggf. Thorax kommen bei unklarem Befund oder beim Verdacht auf eine mögliche Fernmetastasierung oder Infiltration von Nachbarstrukturen zum Einsatz (1). Bei einem Rektumkarzinom ist darüber hinaus die starre Rektoskopie fester Bestandteil der Diagnostik (1). Zusätzlich mögliche bildgebende Verfahren sind die Magnetresonanztomographie (MRT) und je nach Tumorlage die rektale Endosonographie (1). Auch Blutuntersuchungen (z. B. Analyse der Tumormarker) gehören zur KRK-Diagnostik (1). Je nach Lage des Primärtumors und Befundes schließen sich ggf. weitere Untersuchungen an.

Bei der Klassifikation maligner Tumoren (TNM-Klassifikation) des KRK werden das Ausmaß der lokalen Tumordinfiltration, die lymphogene Infiltration und das Vorkommen von Fernmetastasen berücksichtigt (1). Die Basis für Therapieentscheidungen und die Prognose des KRK bildet die Klassifikation der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC) (1). In Abhängigkeit vom Stadium und von weiteren Faktoren werden verschiedene Therapieansätze und -ziele verfolgt.

### **2.1.4 CMS-Klassifizierung**

2015 teilte ein Consortium KRK-Zellen anhand ihrer aktiven Gene, Methylierungen, chromosomalen Instabilitäten und der Mikrosatelliten-Instabilität in vier CMS ein (4). Mit

37 % macht der CMS-2 den größten Anteil der KRK aus, gefolgt von 23 % CMS-4, 14 % CMS-1 und 13 % CMS-3 (4).

Der CMS-1 ist durch eine Aktivierung des Immunsystems und eine vermehrte Expression mit Entzündungen assoziierter Gene gekennzeichnet (4). Vor allem das Vorkommen von T-Helferzellen-(T<sub>H</sub>)-1 Zellen und zytotoxischen T-Zellen (CTLs) in der Tumormikroumgebung ist für den CMS-1 charakteristisch (4). Außerdem fällt der CMS-1 durch eine vermehrte Mikrosatelliten-Instabilität, hohe CpG island methylator phenotype (CIMP)-Methylierungsraten und Serin/Threonin-Kinase B-Raf (BRAF)-Mutationen auf (4). Der CMS-2 (canonical) ist durch eine ausgeprägte chromosomale Instabilität, eine überwiegend epitheliale Differenzierung sowie durch eine erhöhte Expression der Gene WNT und MYC charakterisiert (4). Der metabolisch aktive CMS-3 ist mit einem vermehrten Vorkommen von Kirsten Rat Sarcoma (KRAS)-Mutationen assoziiert (4). Die KRK-Zellen des CMS-4 sind durch eine die mesenchymale Transformation begünstigende Genexpression und ein infiltratives Wachstum geprägt (3, 4). Laut Guinney et al. wird die beim CMS-4 auftretende gesteigerte Angiogenese durch eine vermehrte Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Aktivierung und Expression von NOTCH-Vascular Endothelial Growth Factor-Genen begünstigt (4). Patienten mit einem KRK-CMS-4 weisen das schlechteste Gesamtüberleben auf (4).

Die Eigenschaften der verschiedenen CMS des KRK in Interaktion mit dem Immunsystem beeinflussen den Therapieverlauf wesentlich. In diesem Kontext spielt die Tumormikroumgebung eine entscheidende Rolle (19). Laut Becht et al. unterscheidet sich die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung deutlich zwischen den einzelnen CMS (20). Der CMS-1 zeigt eine starke Infiltration durch Cluster of differentiation (CD)8<sup>+</sup> CTLs, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T<sub>H</sub>-1), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und CD68<sup>+</sup> Makrophagen und somit eine hohe immunologische Aktivität (3, 19, 20). Außerdem weisen hypermutierte Tumore mit Mikrosatelliten-Instabilität verstärkt Immuncheckpoint-Proteine wie Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4), Programmed cell death protein (PD-1), Programmed death-ligand 1 (PD-L1) und Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) auf (3, 6, 20).

Beim CMS-4 dominieren regulatorische T-Zellen (Tregs), Myeloid-derived-suppressor cells (MDSCs) und T<sub>H</sub>-17-Zellen (3). Aufgrund ihrer hohen immunogenen Komponente gelten der CMS-1 und der CMS-4 als „immunologisch heiße“ Tumoren (11, 20). Vermutlich sprechen diese Subtypen auf eine immunologische Therapie an.

### **2.1.5 Therapie des KRK**

Die KRK-Therapie hängt von verschiedenen Faktoren (z. B. Stadium der Erkrankung, molekulargenetische Charakteristika des Tumors, Lokalisation des Primärtumors, mögliche

Metastasenbildung, Konstitution des Patienten) ab (1). Nach Möglichkeit wird eine kurative Therapie durch die vollständige Exzision des Tumors angestrebt. Je nach Tumorlokalisation, lymphogener Streuung und Metastasenbildung schließt sich eine adjuvante Chemotherapie an (1). Bei einem Karzinom im Bereich des Rektums ist ggf. eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie indiziert (1). Die Chemotherapie-Schemata beim KRK beinhalten Folinsäure + 5-Fluorouracil + Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) oder alternativ Folinsäure + 5-Fluorouracil + Irinotecan (FOLFIRI-Schema) (1). Weitere Optionen sind Folinsäure + 5-Fluorouracil + Oxaliplatin + Irinotecan (FOLFOXIRI-Schema) oder Oxaliplatin + Capecitabin (CAPOX/XELOX-Schema) (1). Bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder sonstigen erschwerenden Faktoren wird ein palliativer Therapieansatz eingeleitet (1).

## **2.2 Humanes Immunsystem**

### **2.2.1 Überblick**

Das humane Immunsystem dient dem Körper als Abwehrsystem gegenüber exogenen und endogenen Gefahren. Neben exogenen Krankheitserregern kann das Immunsystem auch entartete oder erkrankte körpereigene Zellen erkennen und eliminieren (21). Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen und einem erworbenen Anteil (22).

Die unspezifische Abwehr des angeborenen Immunsystems erfolgt über die Haut- und Schleimhaut-Barriere, dem Komplementsystem sowie über Zytokine und Lysozym (23). Zu den Zellen des unspezifischen Immunsystems zählen Granulozyten, Neutrophile, Basophile, dendritische Zellen, Mastzellen, Makrophagen und NK-Zellen (21). Die unspezifische Abwehr wird durch Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) aktiviert (22). Daran maßgeblich beteiligt sind Granulozyten, Makrophagen und das Komplementsystem (21). Die Komplementaktivierung verbessert über die Opsonisierung die Phagozytose. Darüber hinaus wird ein Membranangriffskomplex zur Bekämpfung von Pathogenen gebildet und es kommt zur chemotaktischen Rekrutierung weiterer Immunzellen (24).

Die angeborenen Abwehrmechanismen reagieren schnell auf mögliche Bedrohungen, wohingegen das erworbene Abwehrsystem verzögert, jedoch gezielter agiert (21, 23). Durch die Konfrontation des Körpers mit unterschiedlichen Pathogenen bildet sich im Laufe der Zeit das spezifische Immunsystem basierend auf der Funktion von T- und B-Lymphozyten aus, das mittels einer Gedächtnisfunktion Pathogene bei erneuter Infektion wiedererkennt und dann gezielt angreifen kann (21, 22).

Die im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs, z. B. Makrophagen, dendritische Zellen) präsentieren durch Phagozytose

aufgenommene Antigene über die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) I oder II und aktivieren so die spezifische Immunabwehr (22). Bindet eine CD4<sup>+</sup>-T-Zelle mit passendem Rezeptor an das über den MHC-II präsentierte Antigen, kommt es zur Differenzierung u. a. in Tregs, folliculäre T-Zellen und T-Gedächtniszellen. Mit Viren infizierte Zellen oder Tumorzellen präsentieren Antigene über den MHC-I-Komplex (21). Die Bindung von CTLs an ein über den MHC-I präsentierte Antigen induziert die Apoptose der Zielzelle (21).

Für eine ausreichende Immuninduktion ist neben der MHC-T-Zellbindung eine Stimulation von Korezeptoren erforderlich (21). Hierzu zählen auch Korezeptoren mit hemmender Wirkung (z. B. CTLA-4, PD-1), die eine überschießende Immuninduktion verhindern (21, 25).

Zur spezifischen Immunabwehr gehören außerdem B-Zellen, die Antigene direkt oder über die Präsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) erkennen (21). B-Zellen können über den MHC-II auch Antigene präsentieren und darüber mit folliculären T-Zellen interagieren (21). Aus aktivierten B-Zellen können B-Gedächtniszellen und Plasmazellen, die spezifische Antikörper bilden, entstehen (21, 23). Bei einer erneuten Konfrontation des Immunsystems mit denselben Pathogenen, wird dadurch eine schnellere Immunantwort des spezifischen Immunsystems möglich (21).

### **2.2.2 Zellen und Mediatoren des Immunsystems**

Für ein besseres Verständnis der nachfolgenden Untersuchungen werden einige Immunzellen und Bestandteile des Immunsystems im Folgenden genauer beschrieben.

#### **Regulatorische T-Zellen (Tregs)**

Die zum spezifischen Immunsystem zählenden Tregs wirken immunsupprimierend und sind an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Immunantwort und Autoimmunität bzw. an der Selbsttoleranz beteiligt (26, 27). Sie sind gekennzeichnet durch die Expression von Forkhead box protein P3 (FoxP3) und in starkem Maße CD25 (26). Bei Tumorerkrankungen wirken Tregs immunsuppressiv (28). Durch die Freisetzung von Interleukin-(IL-)10 und TGF- $\beta$  sowie anhand von zellvermitteltem Kontakt durch CTLA-4 unterbinden Tregs die Erkennung und Bekämpfung der Tumorzellen durch das Immunsystem (29).

Tumorzellen können durch eine vermehrte Sekretion von TGF- $\beta$  die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Tregs fördern und somit eine Antitumor-Antwort verhindern (30). In der Literatur wird die Rolle der Tregs kontrovers diskutiert. Einige Studien berichten über eine Assoziation der Tregs mit einer besseren Prognose beim KRK (28, 31).

**Zytotoxische CD8+-T-Zellen (CTLs)**

CTLs spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Tumorzellen (32, 33). CTLs erkennen über den MHC-I präsentierte Tumor-assoziierte Antigene (5). Sie induzieren eine Antitumor-Immunantwort durch Freisetzung zytotoxischer Perforine und Granzyme sowie durch die Ausschüttung von Zytokinen (z. B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-2), die Tumorzellen bekämpfen (5). Da CTLs bei Karzinomzellen eine Apoptose auslösen können, gelten sie als wichtiges Element der Antitumor-Immunantwort (32, 33).

**T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen, CD4+-T-Zellen)**

Die T<sub>H</sub>-Zellen sind Teil der spezifischen Immunabwehr. T<sub>H</sub>-1-Zellen bilden über die Freisetzung von IL-2 und IFN- $\gamma$  sowie über die Einwirkung auf CTLs, Makrophagen und NK-Zellen die Grundlage für die zelluläre Immunantwort (29, 34). T<sub>H</sub>-2-Zellen erzeugen mit der Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13 eine nicht-zelluläre (humorale) Immunantwort (34). Durch die Ausschüttung von Zytokinen können sich T<sub>H</sub>-Zellen bei Tumorerkrankungen prognostisch günstig auswirken (34).

**Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

Die zum angeborenen Immunsystem gehörenden NK-Zellen ähneln morphologisch Lymphozyten und dienen dem Erkennen abnormaler Zellen (21). Aktiviert durch den Kontakt ihrer Oberflächenrezeptoren mit Liganden der Tumorzellen reagieren NK-Zellen mit der Freisetzung von Perforinen, Granzymen, Liganden von Todesrezeptoren (Fas-Ligand (FasL) und Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)), Zytokinen sowie dem Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) (5). Perforine verletzen die Oberfläche von Zellen, wodurch eine Öffnung entsteht, durch die Granzyme in die Zelle eindringen und die Apoptose auslösen (21).

**NK-T-Zellen**

NK-T-Zellen sind Teil des spezifischen Immunsystems. Sie weisen sowohl Merkmale von NK-Zellen als auch von T-Zellen auf (35). Aktivierte NK-T-Zellen produzieren sowohl pro- (z. B. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) als auch anti-inflammatorische (z. B. IL-10) Zytokine (35). NK-T-Zellen sind im Tumorstroma nachweisbar (29). Laut Studien ist eine hohe NK-T-Zellinfiltration beim KRK mit einem verminderten Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert (35). Dieser Effekt könnte auf die Induktion der Apoptose durch die NK-T-Zellen über IFN- $\gamma$  und weitere Moleküle (z. B. Granzym B, Perforin, FasL) zurückzuführen sein (35).

## Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems. Sie vermitteln ihr Signal über Bindung an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen (21) und lösen dort unterschiedliche Reaktionen, wie Apoptose, Aktivierung, Differenzierung, Ausreifung, Teilung oder Chemotaxis aus (21). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und Granzym B bei KRK-Zellen des CMS-1 und CMS-4 vor und nach H-1PV-Infektion untersucht (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Zytokine

Zytokin	Herkunft	Relevante ausgelöste Reaktionen im Rahmen von Tumorerkrankungen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CTLs, CD4+-T-Zellen (29), Makrophagen (33), NK-Zellen (36)	Induziert Antitumor-Immunantwort; induziert Apoptose/Nekrose (37); Tumor-suppressiv; eventuell auch tumorfördernde Eigenschaften (33)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	CTLs, CD4+-T-Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen (38)	Induziert Antitumor-Immunantwort; induziert Apoptose/Nekrose (37); pro-inflammatorisch; unterdrückt Angiogenese in Tumoren; Stimulation von MHC-I und MHC-II (33, 38), aktiviert Phagozytose (39), zellvermittelte Immunität (36)
<b>IL-2</b>	CTLs, CD4+-T-Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen(38)	Fördert CD8+-T-Zellen, CD4+-T-Zellen, NK-Zellen, Tregs (38) sowie NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen (36)
<b>IL-10</b>	T <sub>H</sub> -1- und T <sub>H</sub> -2-Zellen, CTLs, B-Lymphozyten, Mastzellen (36), NK-T-Zellen (35)	Unterdrückt die Produktion von IFN- $\gamma$ und IL-2, unterdrückt MHC II Moleküle; fördert Immuntoleranz (36)
<b>Granzym B</b>	CTLs (40, 41), NK-Zellen (42)	Repräsentiert T-Zellaktivität (25); involviert in T- und NK-Zell-vermittelte Zytolyse (43)

CD = Cluster of Differentiation, CTLs = zytotoxische T-Zellen, IFN- $\gamma$  = Interferon gamma, IL = Interleukin, MHC = Major Histokompatibility Complex, NK-Zellen = Natürliche Killerzellen, TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha

### 2.2.3 Tumor Escape Mechanismen

Das Immunsystem schützt den Körper nicht nur vor exogenen, sondern auch vor endogenen Bedrohungen. Es kann entartete Zellen erkennen und eine Tumorbildung verhindern (44). Tumore entwickeln jedoch Strategien (Tumor Escape Mechanismen), um der Immunantwort zu entgehen (5). Beispielsweise ist der Tumor bei einer verminderten Expression von Antigenen für das Immunsystem kaum sichtbar (45).

Auch durch die Schaffung einer besonderen Mikroumgebung kann der Tumor den Angriffen des Immunsystems entgehen (46). Zu den die Tumormikroumgebung prägenden Zellen gehören CTLs, T<sub>H</sub>-Zellen, Tregs, B-Lymphozyten, Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), Tumor-assoziierte Neutrophile (TANs), dendritische Zellen, MDSCs, NK-Zellen und NK-T-Zellen (29, 33). Das tumoreigene Mikromilieu führt nicht nur zu einer verminderten T-Zellproliferation, sondern auch zu einer vermehrten Apoptose von T-Zellen (5). Daher wird die Antitumor-Immunantwort durch CTLs oder NK-Zellen unterdrückt und ein ungehindertes Tumorwachstum ermöglicht (5).

Darüber hinaus mindern rekrutierte Tregs die Immunantwort durch eine Unterdrückung der Proliferation und Produktion von zytolytischen Granula durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (7). Die Rolle der Tregs bei Tumorerkrankungen wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Durch die Freisetzung von Mediatoren (z. B. TGF- $\beta$ , IL-10) im tumoreigenen Mikromilieu, kommt es zur Immunsuppression (7).

Eine Immuninduktion hängt sowohl von der Erkennung der MHC-Antigen-Komplexe als auch von kostimulierenden Signalen ab. Beides kann durch Tumor Escape Mechanismen unterbunden werden (7). Durch die gezielte Inhibierung der Expression von MHC-Molekülen wird die Antigen-Präsentation verhindert (5). Auch die verstärkte Expression von Immuncheckpoint-Molekülen (z. B. CTLA-4, PD-L1) stellt ein Tumor Escape Mechanismus dar (47, 48). Die T-Zellreaktion auf Tumorantigene kann durch die aktive Induktion einer Toleranz durch den Tumor selbst reduziert werden (49). Möglicherweise spielen auch phänotypisch veränderte Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) bei der verminderten Immunantwort eine Rolle (46). Befunde lassen vermuten, dass sich die Tumor Escape Mechanismen des KRK bei den verschiedenen Immunphänotypen und genetischen Zusammensetzungen unterscheiden (6).

## 2.3 Onkolytische Viren

### 2.3.1 Onkolytische Viren in Historie und Gegenwart

Der Einfluss onkolytischer Viren auf Tumorzellen und Krebserkrankungen ist seit dem 20. Jahrhundert Gegenstand der Krebsforschung (50). Onkolytische Viren differenzieren gezielt zwischen Tumorzellen und gesunden Körperzellen (51). Tumorzellen zeigen eine verminderte antivirale Reaktion sowie eine Toleranz gegenüber der Virusreplikation (7).

Onkolytische Viren lassen sich in der Tumorthherapie vielfältig einsetzen. Bei einer gezielten Infektion von Tumorzellen aktivieren die Tumorzelllysate das unspezifische und spezifische Immunsystem (52). Die Tumorzellen werden durch die Infektion mit einem onkolytischen Virus für das Immunsystem sichtbar, was die Tumorabwehr stärkt (5). Die Onkolyse fördert die Freisetzung von Tumor-assoziierten Antigenen, viralen Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und Danger-associated molecular patterns (DAMPs), was die

vermehrte Präsentation von Tumor-spezifischen Antigenen, die Reifung von dendritischen Zellen und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge hat (5, 7). Dieses „Heating up“ der Tumormikroumgebung schafft die Grundlage für körpereigene und therapeutische Strategien zur Eindämmung des Tumorwachstums (5, 48).

Verschiedene onkolytische Viren – darunter das H1-PV – werden derzeit als Therapieoption für das KRK untersucht (53), da sie Tumor-supprimierende Effekte aufweisen (54, 55).

### 2.3.2 Parvovirus H-1 im Überblick

Das Ende der 1950er Jahre entdeckte H-1PV ist ein nicht-behülltes, einzelsträngiges DNA-Virus (single stranded DNA, ssDNA) (56) mit einem Genom von circa 5100 Nukleotiden (5). Es gehört zur Familie der Parvoviridae (Protoparvovirus) (57). Natürliche Wirtsorganismen des H-1PV sind Nagetiere, insbesondere Ratten (58). Mit einem Durchmesser von ca. 25 nm zählt es zu den kleinsten bekannten Viren (9).

H1-PV können sich in gesundem Gewebe nicht replizieren, aber Tumorzellen infizieren (5, 59). Das Virus gelangt über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle. Der Zelleintritt ist abhängig von Dynamin und dem Vorliegen eines sauren pH-Wertes (60).

Früh wurde eine selektive Affinität von H-1PV zu Tumorzellen beschrieben (Onkoselektivität); eine anfänglich angenommene onkogene Wirkung bestätigte sich jedoch nicht (56, 61). Stattdessen fiel eine verzögerte Tumorentwicklung bei H-1PV-Infektionen auf (62). Untersuchungen bestätigten die Onkosuppression durch H-1PV (59). Die Onkotoxizität von H-1PV beruht vor allem auf das oxidativen Stress induzierende Nicht-Strukturprotein (NS)1-Protein. Weiter ist auch die Induktion verschiedener Zelltod-Programme von Bedeutung (5, 63). Daher kann die H-1PV-Infektion die Antitumor-Immunantwort verbessern (64).

Zwei Merkmale machen das H-1PV als Therapieoption interessant. Erstens weist eine H-1PV-Infektion für Menschen ein geringes gesundheitliches Risiko auf, da sie nach aktuellem Forschungsstand häufig klinisch stumm oder mit milder Symptomatik verläuft (7, 8). Zweitens besteht bei den meisten Menschen bisher keine Immunität gegen das H-1PV, sodass bei einer iatrogen induzierten Infektion das Virus nicht direkt eliminiert wird (65). Eine Transmission des H-1PV von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht nachgewiesen (8). H-1PV zeigt eine geringe Kontagiösität, was die klinische Handhabung erleichtert (58). In Tierversuchen fanden Geletneky et al. bei Glioblastomen eine Tumorreduktion und ein verlängertes Überleben nach der Behandlung mit H-1PV bei gleichzeitig geringem Nebenwirkungsspektrum (66). Diese Ergebnisse bildeten 2012 die Grundlage für die erste intravenöse H-1PV-Applikation bei Menschen im Rahmen der Therapie von Glioblastomen in Deutschland (58).

### 2.3.3 H-1PV – Therapieoptionen beim KRK

Das H-1PV ist möglicherweise auch beim KRK einsetzbar (7). Zwar waren bei einer Infektion von KRK-Zellen mit dem H-1PV keine ausreichenden onkolytischen Effekte nachweisbar, jedoch konnte eine Immunreaktion (z. B. gesteigerte NK-Zell-vermittelte Abwehr) beobachtet werden (67, 68).

Bei einer H-1PV-Infektion kann das virale NS1-Protein bei Tumorzellen oxidativen Stress erzeugen und die Apoptose einleiten (63). Die bei der Infektion entstehenden Tumorzelllysate können das Immunsystem aktivieren (69). Nachweislich führen Tumorzelllysate zur Reifung dendritischer Zellen, zur Freisetzung und Cross-Präsentation Tumor-spezifischer Antigene, dies umfasst die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen über MHC I für CTL, und zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (69). Außerdem konnte eine T-Zellstimulation nachgewiesen werden (7). Durch ein vermehrtes Recruitment von Immunzellen in die Umgebung des Tumors kann die H-1PV-Infektion die körpereigene Abwehr gegen die Tumorzellen verbessern (48).

Bei der Infektion humaner Melanomzellen mit dem H-1PV kam es neben der Induktion der Apoptose und der Immunzellaktivierung auch zur Aktivierung des Heat Shock Proteins (HSP) 72, was eine deutliche Steigerung der Immunogenität impliziert (54). In Gliomzellen kann das H-1PV weitere Zelltod-Mechanismen (z. B. Nekrose, Cathepsin vermittelter Zelltod) auslösen (59, 70).

Betont werden sollte, dass bei einer H-1PV-Infektion vor allem Tumorzellen geschädigt werden. Das Virus infiziert Immunzellen nur in geringem Maße (7). Bei einer H1-PV-Infektion von Tumorzellen kommt es dagegen zu einer Immunaktivierung (71). Als vielversprechende Option für die KRK-Therapie sollte das onkolytische H-1PV langfristig auch in Kombination mit anderen therapeutischen Optionen untersucht werden (10).

## 2.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit sollen der CMS-1 und der CMS-4 des KRK hinsichtlich ihres Effektes auf Immunzellen charakterisiert werden. Weiter soll der Einfluss einer H-1PV-Infektion auf die Tumorzell-Immunzell-Interaktion untersucht werden. Daher wird zunächst die Fähigkeit des H-1PV analysiert, CMS-1- und CMS-4-Zelllinien zu infizieren. Weiter wird der Effekt der H-1PV-Infektion auf die Zellviabilität mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethyl-2-triazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) untersucht. Zur Analyse des Effektes der CMS-1- und CMS-4-Zelllinien auf Immunzellen werden Kokulturversuche mit Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) durchgeführt. Hierbei werden die Immunzell-Subpopulationen mittels Fluorescence-activated cell sorting (FACS) und die Zytokin-Produktion der Tumorzellen mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) untersucht. Zur Beurteilung des Effektes der H-1PV-Infektion auf die Immunabwehr werden

Kokulturen mit nicht-infizierten und infizierten KRK-Zellen verglichen. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Identifikation von möglichen Unterschieden zwischen dem CMS-1 und CMS-4.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	ITW Companies, Darmstadt, Mailand, Barcelona
Ham's (Zellkulturmedium)	Biochrom GmbH, Berlin
Humanserum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
3-(4,5-Dimethyl-2-triazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid (MTT)	Biomol GmbH, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco Life Technologies
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	Gibco Life Technologies, UK
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Terralin Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypanblau	Gibco Life Technologies, UK
Trypsin	Gibco Life Technologies, UK
Tween	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 gelistet

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	CMS	Beschreibung	Quelle	Medium
<b>DLD-1</b>	CMS-1	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen	ATCC, USA	RPMI 90 % + FCS 10 % + Pen/Strep 1 %
<b>HCT-15</b>	CMS-1	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen	ATCC, USA	RPMI 90 % + FCS 10 % + Pen/Strep 1 %
<b>SW-480</b>	CMS-4	Humane kolorektale Adenokarzinomzellen	ATCC, USA	RPMI 90 % + FCS 10 % + Pen/Strep 1 %
<b>CL-11</b>	CMS-4	Humane Adenokarzinomzellen (Kolon)	DSMZ; Deutschland	Ham's 40 % + DMEM 40 % + FCS 20 % + Pen/Strep 1 %

ATCC = American type culture collection, CMS = Consensus molecular subtype, DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, FCS = Fetales Kälberserum, Pen/Strep = Penicillin/Streptomycin, RPMI = Roswell Park Memorial Institute

### Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Die verwendeten PBMCs wurden freundlicherweise durch die Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt.

### Virusstamm

Der Wildtyp- H-1PV-Stamm stammt von Prof. J. Rommelaere (DKFZ, Heidelberg).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Verwendete Zytokine

Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ )	Thermo Fisher Scientific
Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )	Thermo Fisher Scientific
Interleukin 2 (IL-2)	Thermo Fisher Scientific
Interleukin (IL-10)	Thermo Fisher Scientific
Granzyme B	R&D Systems

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Übersicht Herkunft der untersuchten Antikörper

Antikörper	Herkunft
CD3-PerCP	BD Pharmingen™
CD4-FITC	BD Pharmingen™
FoxP3-PE	BD Pharmingen™
CD69-APC	BD Pharmingen™
CD8-PE	BD Pharmingen™
GranB-FITC	BD Pharmingen™
CD14-FITC	BD Pharmingen™
HLA-DR-PE	BD Pharmingen™
CD33-PeCy7	BD Pharmingen™
CD11b-APC	BD Pharmingen™
Anti-Human TNF- $\alpha$ (ELISA Capture Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human TNF- $\alpha$ (ELISA Detection Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IFN- $\gamma$ (ELISA Capture Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IFN- $\gamma$ (ELISA Detection Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IL-2 Purified (ELISA Capture Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IL-2 Biotin (ELISA Detection Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IL-10 Purified (ELISA Capture Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Human IL-10 Biotin (ELISA Detection Antibody)	Thermo Fisher Scientific
Human Granzyme B Capture Antibody	R&D Systems
Human Granzyme B Detection Antibody	R&D Systems

APC = Allophycocyanin (Fluorophor), CD = Cluster of Differentiation, Cy = Cyanin (Fluorophor), ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay, FITC = Fluorescein (Fluorophor), HLA = Humanes Leukozytenantigen, IFN- $\gamma$  = Interferon gamma, PE = Phycoerythrin (Fluorophor), Per-CP = Peridinin-Chlorophyll-Protein (Fluorophor), TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha

### Medien für die Zellkultur

Die Lagerung aller Medien erfolgte durchgehend bei 4 °C im Kühlschrank. Die Erwärmung der Medien vor der Verwendung in den Zellkulturen fand im Wasserbad bei 37 °C statt.

### Medium für DLD-1, HCT-15 und SW-480

RPMI	90 %
FCS	10 %
Pen/Strep	1 %

**Medium für CL-11**

Ham's	40 %
DMEM	40 %
FCS	20 %
Pen/Strep	1 %

**Einfriermedium**

FCS	90 %
DMSO	10 %

**Puffer und Lösungen****FACS-Puffer (FACS)**

PBS	95 %
FCS	5 %

**Elispot (ELISA)**

Destilliertes Wasser	80 %
5 x Elispot-Lösung	20 %

**Waschpuffer (ELISA)**

Destilliertes Wasser	900 ml
10 x PBS	100 ml
Tween-20	500 µl

**Coating-Puffer (ELISA)**

Destilliertes Wasser	108 ml
Coating Puffer	12 ml

**Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur**

Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

**Stopp-Lösung (MTT)**

0,01 M HCl	10 ml
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	1 g

**ELISA-Stopp-Lösung**2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>21,32 ml 25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 78,68 ml H<sub>2</sub>O

Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

**Verbrauchsmaterialien**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Abwurfbehälter	Mauser, USA
Bechergläser	Schott, Mainz
Combitips (5 ml, 12,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Costar Assay Platte, 96 wells	Corning, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Einmal-Handschuhe	Avantor vwr, Darmstadt
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Laborflaschen	Schott, Mainz
Leucosep-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Parafilm	Bemis, Neenah USA
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 5 ml)	A. Hartenstein, Würzburg; Eppendorf, Hamburg
Schutzbrille	Zantac Injection
SealPlate Film	Excel Scientific, USA
Sterile Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Plastikröhrchen (Falcons)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-, 12-,24-, 96-well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	SPL Life Sciences, Südkorea

## Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Chemikalienschrank	Köttermann GmbH, Uetze
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, USA
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Hamburg
ELISA-Reader X-Fluor	Thermo Fisher Scientific, USA
Gefrier- und Kühlschränke -20/4°C	Bosch; Liebherr Premium
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, USA
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer IKA, Staufen	
Mehrfachdispenser Handystep	Brand, Wertheim
Mehrkanalpipette	HTL Lab solutions, Polen
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön
Platten-Waschgerät	Tecan Trading AG, Schweiz
Pipetten 10 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Accu-Jet Pro, Brand, Wertheim
Reagenzglasgestelle	Kartell, Noviglio, Italien
Rollschüttler	A. Hartenstein, Würzburg
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific, USA
Stickstoffbehälter	Thermo Fisher Scientific, USA
Stoppuhr	Thermo Fisher Scientific, USA
Trinokular Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Vakuum-Absauganlage	Fastbiotec, Frankfurt am Main
Vortexer	Scientific Industries, USA
Waagen	Kern Fachhandel, München; Sartorius analytic, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, USA

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Zellkultivierung**

Alle Arbeiten mit den Tumorzellen DLD-1, HCT-15, SW-480 und CL-11 erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank. Die verwendeten Medien und Lösungen waren steril und wurden ausschließlich unter der sterilen Werkbank verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in 15 ml des entsprechenden Mediums (siehe Kapitel 3.1) ausgesät und wuchsen adhärent. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C mit in Wasserdampf gesättigter Umgebung und 5 % CO<sub>2</sub>. Üblicherweise war nach drei Tagen ein konfluenten Zellrasen nachweisbar.

### **3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Die verwendeten Zellen wurden in einem Einfriermedium aus 10 % DMSO und 90 % FCS eingefroren und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Durch den Zusatz von DMSO wurde die Ausbildung der für die Zellen schädlichen Kristalle unterbunden (72).

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Trypsin-Wirkung wurde mit Medium abgestoppt. Die gesamte Lösung wurde in einem Falcon-Gefäß zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml FCS aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl DMSO schnellstmöglich in einem Kryogefäß über Nacht bei -80 °C eingefroren. Im Mr. Frosty Einfrierbehälter war ein schonender Einfrierprozess mit einer kontrollierten Temperaturabnahme gewährleistet. Für die langfristige Lagerung wurde das Kryogefäß in den Stickstofftank mit -196 °C überführt. Der Auftauprozess wurde zügig durchgeführt, da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt. Dazu wurden die Kryogefäße nach Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Vor dem vollständigen Auftauen wurden die Zellen in einer 5-fachen Menge Medium aufgenommen und bei 1500 rounds per minute (rpm) 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in dem entsprechenden Medium in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wurde das Medium erstmals gewechselt.

### **3.2.3 Passage der Zellen**

In regelmäßigen Intervallen von drei bzw. vier Tagen wurden die Zellen passagiert. Nach Abnahme des Mediums wurde die Kulturflasche mit 10 ml PBS gespült, um Zell- und Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 5–15 min mit 5 ml 1 % Trypsin-Lösung im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurde die Reaktion mit 10 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon überführt. Nach der Zentrifugation (5 min, Raumtemperatur, 1500 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert.

Der gewünschte Anteil der Zellen wurde in eine Kulturflasche überführt und mit 15 ml Medium im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung der Zellzahl in den Kulturflaschen wurden beim oben beschriebenen Verfahren nach der Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen in 1 ml Medium 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 90 µl Trypanblau 3 min inkubiert. 10 µl dieser Suspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Der errechnete Mittelwert von vier Quadranten wurde mit  $10^4$  sowie mit dem Verdünnungsfaktor 10 (1:10 mit Trypanblau gemischt) multipliziert. Die Zellzahl in der Kulturflasche betrug somit:

$$\text{Zellen(ml)} = (\text{Zellzahl der großen Quadrate} / 4) \times 10^4 \times 10 \text{ (Verdünnung)}$$

### 3.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay

Der MTT-Test ist ein Verfahren zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und Viabilität von Zellen. Die Reduktion des gelblichen MTT zum violetten kristallinen Formazan lässt Rückschlüsse auf die Wirkung von Substanzen (z. B. H-1PV) zu. MTT reagiert mit dem reduzierten Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat ( $\text{NADPH}^+\text{H}^+$ ) der Zellen. Das gebildete Formazan lässt sich photometrisch quantifizieren. Die Reduktion von MTT findet nur in metabolisch aktiven Zellen statt, sodass mit steigender (subtoxischer/toxischer) Wirkung und verminderter Zellviabilität die Reduktionsrate sinkt (73). Durch eine Verdünnungsreihe kann die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des Virus eingeordnet werden. Die Infektionsstärke (Multiplicity of infection = MOI) beschreibt die Viruspartikel-Menge im Verhältnis zur Zellzahl. Die MOI wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{MOI} = (\text{c}_{(\text{Virus})} \times \text{V}_{(\text{Virus})}) / (\text{c}_{(\text{Zellkultur})} \times \text{V}_{(\text{Zellkultur})})$$

c = Konzentration; V = Volumen

#### Durchführung des MTT-Assays

*Tag 1:* Am ersten Tag wurden die Zellen nach Vorbereitung (siehe Kapitel 3.2.3) und Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 3.2.4) in einer 96-Well-Platte steril ausgesät. Da eine Analyse der Zytotoxizität nach 24 sowie 48 h erfolgen sollte, wurden pro Zelllinie zwei 96-Well Platten vorbereitet. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos wurden die randständigen Wells der 96-Well-Platte mit 200 µl PBS befüllt. Die errechnete Menge Lösung mit  $2 \times 10^6$  Zellen (für 200 Wells) wurde auf 20 ml mit Medium (10 ml pro Platte) aufgefüllt. In jedes Well wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10.000 Zellen pipettiert. Die letzte Reihe wurde als Blank freigelassen. Zur Inkubation wurden die 96-Well-Platten über

Nacht im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> bewahrt.

*Tag 2:* Am zweiten Tag erfolgte nach einer optischen Kontrolle die Infektion der Zellen mit H-1PV. Zur Beurteilung der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe von H-1PV hergestellt. Die H-1PV-Lösung wurde in den Konzentrationen MOI 0,5, MOI 1, MOI 2,5, MOI 5, MOI 10, MOI 15 und MOI 20 angesetzt. Da die Infektion in 50 µl Medium und in je 6 Wells pro Platte erfolgen sollte, wurden pro Virus-Konzentration 700 µl Medium (für 7 Wells pro Platte bei zwei Platten) vorgelegt. Falls mehrere Zelllinien mit demselben Medium infiziert wurden, wurde die Menge des Mediums angepasst. Die gemäß den unterschiedlichen MOI errechnete Virus-Menge wurde hinzugefügt. Die Infektion erfolgte nach Entfernung des bisherigen Mediums unter sterilen Bedingungen. Die infizierten Ansätze wurden im Brutschrank bei 37 °C für 1 h mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde in jedes Well 50 µl Medium zugefügt, sodass sich insgesamt 100 µl Medium in jedem Well befanden. Bei der Zellkontrollreihe erfolgte lediglich ein Mediumwechsel (100 µl Medium).

*Tag 3:* 24 h später wurden bei der 24-h-Platte 10 µl MTT pro Well zugefügt. Nach 4 h wurden die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl MTT-Stopp-Lösung abgestoppt und die Kristalle gelöst. Die behandelte 96-Well-Platte wurde über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank aufbewahrt.

*Tag 4:* Die Behandlung der 48-h-Platte erfolgte analog zur Behandlung der 24-h-Platte (siehe Tag 3). Die 24-h-Platte wurde durch eine photometrische Messung bei 550 nm ausgewertet. Die Subtraktion der Blank-Werte der optischen Dichte von den Werten der Ansätze, ergab die Viabilität in % bezogen auf die unbehandelte Zellkontrolle. Die Auswertung der 48-h-Platte erfolgte an Tag 5 nach dem gleichen Vorgehen (siehe Tag 4).

### **3.2.6 Gewinnung der PBMCs**

Für die Kokulturen wurden PBMCs aus heparinisierem Vollblut isoliert. Über eine Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die Blutbestandteile anhand ihrer Sedimentationsgeschwindigkeiten separiert (24).

Hierzu wurden mit jeweils 15 ml Ficoll-Hypaque-Lösung befüllte Leucosep-Röhrchen 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Inhalt des Blutbeutels wurde in eine Zellkulturflasche überführt und auf etwa 120 ml mit PBS aufgefüllt. Die Leucosep-Röhrchen wurden mit jeweils 15 ml des Blutgemisches befüllt. Die Blutbestandteile wurden durch eine Zentrifugation für 20 min bei 2200 rpm ohne Bremse aufgetrennt. Die PBMCs befanden sich danach in der Interphase. Die PBMCs waren als heller Ring (Buffy Coat) erkennbar

und von anderen Fraktionen leicht zu unterscheiden. Zunächst wurde das überstehende Plasma bis ca. 5 ml oberhalb der PBMC-Schicht abgenommen und anschließend die Schicht selber. Das Plasma wurde für weitere Versuche eingefroren. Nach Überführung der PBMC-haltigen Lösung in ein Falcon-Gefäß wurde diese bis auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Zur Minimierung der Verunreinigung der PBMCs durch Thrombozyten, sonstige Blutbestandteile oder Überreste der Ficoll-Hypaque-Lösung wurden mehrere Waschschrte mit PBS und nachfolgender Zentrifugation für 6-8 min bei 1700–2000 rpm mit Bremse durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung wurden die PBMCs mit Tumorzellen kokultiviert bzw. eingefroren (siehe Kapitel 3.2.2).

### 3.3 Infektion von Zellen mit H-1PV

Die Infektion der Tumorzellen mit H-1PV erfolgte unter der sterilen Werkbank. Hierzu wurden die Zellen in der gewünschten Anzahl in Well-Platten oder Petrischalen ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Infektion. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde das Virus (MOI 0,5, MOI 1, MOI 2,5, MOI 5, MOI 10, MOI 20) in Medium zugegeben. Bei der Infektion wurden die Zellen mit dem Virus in 25 % des Finalvolumens zunächst bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h wurde das Restvolumen zugefügt. Die Ansätze wurden weiter im Brutschrank verwahrt. Die Kontrollen ohne Virus wurden analog mit reinem Medium behandelt:

$$\text{Virus } (\mu\text{l}) = \text{MOI} \times \text{Zellzahl} / \text{PFU (Plaque forming units; Viruskonzentration)}$$

### 3.4 Kokultivierung mit PBMCs

#### 3.4.1 Grundlagen

Durch eine Kokultivierung sollte die Interaktion der infizierten KRK-Tumorzellen mit PBMCs (Humanes Leukozytenantigen-(HLA)-korrespondierend) analysiert werden. Die H-1PV induzierte Aktivierung der Immunzellen wurde anschließend mittels FACS-Analyse untersucht. Die Tumorzellen der CMS-1-Zelllinien DLD-1 und HCT-15 und der CMS-4-Zelllinien SW-480 und CL-11 wurden 24 h inkubiert und danach mit dem H-1PV infiziert. Weitere 24 h später wurden vorbereitete PBMCs (siehe Kapitel 3.2.6) zugefügt. Als Kontrollen dienten PBMC-Monokulturen, Tumorzell-Monokulturen und Kokulturen ohne H-1PV-Infektion (siehe Abbildung 1).

#### 3.4.2 Durchführung der Kokultivierung

##### *Tag 1: Aussäen der Zellen*

Für die Kokultivierung wurden Tumorzellen in 12-Well-Platten ausgesät. Hierbei wurden pro Zelllinie vier Wells mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen befüllt. Ein Well diente als Kontrolle (Tumorzell-

Monokultur). In einem weiteren Well wurden Tumorzellen mit PBMCs kokultiviert. In den beiden verbliebenen Wells wurden die Tumorzellen mit H-1PV (MOI 1, MOI 5) infiziert und anschließend mit PBMCs kokultiviert.

Das Vorgehen beim Aussäen der vier Zelllinien war identisch. Die Zelllinien DLD-1, SW-480 und HCT-15 erhielten dasselbe Medium. Die Zelllinie CL-11 wurde in einem anderen Medium (siehe Kapitel 3.1) ausgesät. Nach der vorsichtigen Entfernung des Mediums in den Kulturflaschen mit einer Stripette und einem Waschschrift mit 7 ml PBS wurden 4 ml 1x Trypsin auf die Zellen gegeben. Die Ansätze wurden ca. 5–15 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurden sie in 8 ml Medium aufgenommen und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. 10 µl des Zellgemischs wurden für die Zellzählung in 90 µl Trypanblau aufgenommen und 3 min inkubiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen auf 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro 10 ml Medium eingestellt. Von den 10 ml wurden je 2 ml pro Well auf vier Wells einer 12-Well-Platte verteilt. Auf jeder 12-Well-Platte wurden zwei Zelllinien ausgesät.

#### *Tag 2: Infektion*

Am zweiten Tag wurden die Zellen mit H-1PV infiziert. Pro Zelllinie wurden zwei der vier Wells (MOI 1, MOI 5) infiziert. Hierzu wurde zunächst mikroskopisch das Wachstum und die Adhärenz der Zellen in den Wells kontrolliert. Vor der Infektion wurde die Virus-Lösung vorbereitet. Für die Zelllinien DLD-1, SW-480 und HCT-15 erfolgte der Ansatz gemeinsam, da diese Zelllinien im selben Medium wachsen. Die Infektion erfolgte in je 200 µl Medium.

#### DLD-1, SW-480, HCT-15

$$\text{MOI 1} = (3 \cdot 2 \cdot 10^5 \cdot 1) / 2,5 \cdot 10^7 = 24 \mu\text{l in } 600 \mu\text{l Medium}$$

$$\text{MOI 5} = (3 \cdot 2 \cdot 10^5 \cdot 5) / 2,5 \cdot 10^9 = 1,2 \mu\text{l in } 600 \mu\text{l Medium}$$

#### CL-11

$$\text{MOI 1} = (2 \cdot 10^5 \cdot 1) / 2,5 \cdot 10^7 = 8 \mu\text{l in } 200 \mu\text{l Medium}$$

$$\text{MOI 5} = (2 \cdot 10^5 \cdot 5) / 2,5 \cdot 10^7 = 40 \mu\text{l in } 170 \mu\text{l Medium}$$

Die Ansätze in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen wurden mehrfach gevortext. Vor der Infektion wurde das Medium aus allen Wells abgesaugt. In jeweils zwei Wells wurden je 200 µl reines Medium (Kontrollen ohne H-1PV-Infektion) oder 200 µL Medium mit H-1PV (MOI 1 bzw. MOI 5) gegeben. Nach leichtem Schwenken wurden die Platten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 1 h inkubiert. Dabei wurden die Platten gelegentlich erneut geschwenkt um eine flächendeckende Infektion in den Wells zu ermöglichen. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurde pro Well 1,8 ml Medium zugefügt, um ein Endvolumen von 2 ml pro Well zu erreichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert.

### Tag 3: Kokultivierung

Am dritten Tag erfolgte die Kokultivierung der ausgesäten Zellen mit PBMCs. Die eingefrorenen PBMCs wurden aufgetaut und in 6 ml RPMI-Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, Raumtemperatur) wurden der Überstand entfernt, die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und mittels Trypanblaufärbung gezählt.

Pro Zelllinie wurden drei Wells mit jeweils  $2 \cdot 10^6$  PBMCs kokultiviert. Zusätzlich wurden drei bis vier Wells mit reinen PBMCs in 2 ml Medium angesetzt.  $32 \cdot 10^6$  PBMCs wurden in 16 ml RPMI-Medium aufgenommen und gemischt. Jeweils 1 ml des PBMC-Gemisches wurden auf drei der vier Wells (ohne H-1PV, H-1PV MOI 1, H-1PV MOI 5) gegeben. Dem vierten Well ohne PBMCs wurde 1 ml RPMI-Medium zugefügt.

Die Wells, die nur PBMCs und Medium enthielten, dienen als Kontrolle. Die Ansätze in zwei Wells wurden mit 100 IU/ml IL-2, 1 µg/ml CD3 und 1 µg/ml CD28 stimuliert. Anschließend wurden die Platten leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 3 Tage inkubiert.

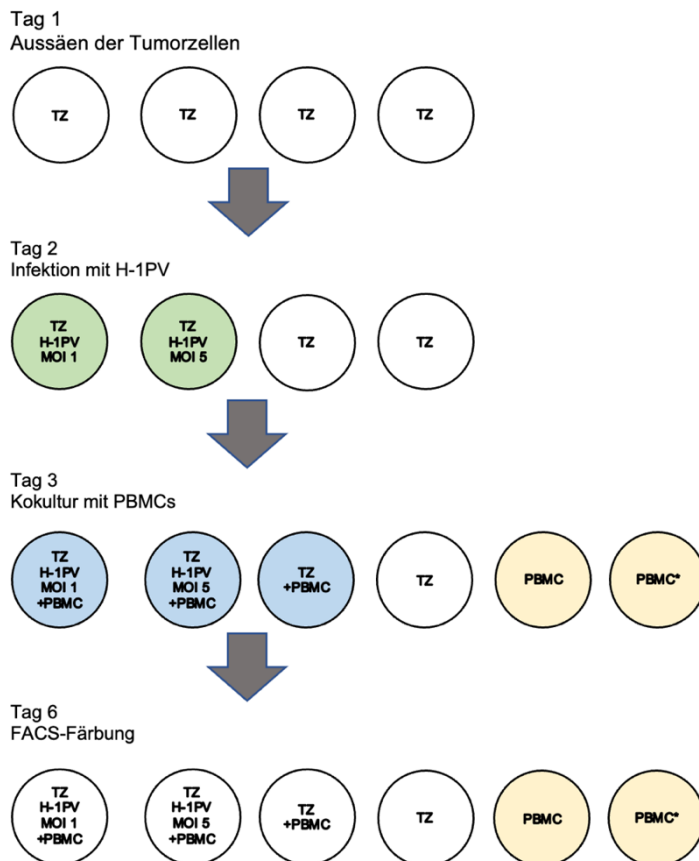


Abbildung 1: Übersicht Kokulturanbau und FACS-Färbung

## **3.5 Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Analyse**

### **3.5.1 Grundlagen**

Die FACS-Analyse ist ein Verfahren der Durchflusszytometrie. Die durchflusszytometrische Messung erlaubt eine Beurteilung der Quantität, Morphologie und molekularen Merkmale von Zellen. Die FACS-Analyse ermöglicht so eine Klassifizierung und Auftrennung der Zellen (24). Bei der FACS-Analyse werden spezifische Zellen einer Mischpopulation mit Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. fluoreszenzmarkierte Antikörper) markiert (24), die an Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine der Zellen binden. Für eine Markierung intrazellulärer Proteine müssen die Zellen aufgeschlossen werden (25).

Bei der FACS-Analyse wird das Zellgemisch in einer Hüllstromflüssigkeit durch eine Düse gepresst. Dadurch passieren die Zellen den Laserstrahl nacheinander. Die optischen Signale werden von einem Messgerät erfasst. Die gemessene Lichtstreuung spezifischer Zellen lässt Rückschlüsse auf deren Morphologie und den Anteil dieser Zellen in einer Zellpopulation zu. Die Fluoreszenzmarker werden zur Emission angeregt. Die resultierenden Signale erlauben eine Beurteilung der Proteinexpression der Zellen. Weiter können die Zellen durch eine Markierung mit elektrischen Ladungen anhand der emittierten Lichtsignale im elektrischen Feld voneinander getrennt werden (24).

### **3.5.2 Durchführung der FACS-Analyse**

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen der Kokultur-Versuche mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt, in ein FACS-Röhrchen überführt und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die gesamte FACS-Analyse wurde auf Eis durchgeführt; auch die Zentrifuge wurde auf 4°C gekühlt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde für spätere Versuchsreihen bei -20 °C eingefroren. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit FACS-Puffer für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden je 5 µl des Antikörpers (siehe Tabelle 8) in die FACS-Röhrchen gegeben. Ein FACS-Röhrchen blieb als Kontrolle ohne Antikörper-Zusatz. Nach einer Inkubationszeit von 45 min im Kühlschrank erfolgten ein weiterer Waschschrtritt mit FACS-Puffer und eine Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm. In den Versuchsreihen sollten sowohl Oberflächenproteine als auch intrazelluläre Proteine markiert werden. Bei der Markierung von Oberflächenproteinen wurden nach der Behandlung mit dem ersten Antikörper und den nachfolgenden Waschschrritten die Zellen mit 100 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Bei der Färbung intrazellulärer Proteine (FoxP3) wurden 200 µl Fix Perm Puffer in jedes FACS-Röhrchen gegeben und die Ansätze 20 min im Kühlschrank inkubiert. Nach einem Waschschrtritt mit 500 µl Perm Waschpuffer und Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut mit 5 µl Antikörper pro FACS-Röhrchen für 45 min im Kühlschrank inkubiert, mit Perm-Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 1500 rpm

zentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl Paraformaldehyd (PFA) wurden die Röhrchen im Kühlschrank aufbewahrt. Abschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung am FACS-Gerät.

Tabelle 8: Übersicht über die Marker-Konstellation in den Immunzellsubpopulationen in der Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Analyse

Untersuchte Immunzellen	Marker-Konstellation in der FACS-Analyse
Regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+FoxP3+
Aktivierte regulatorische T-Zellen	CD3+CD4+FoxP3+CD69+
Aktivierte T-Helferzellen	CD3+CD4+FoxP3-CD69+
Aktivierte zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+CD69+
Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)	CD3-CD56+
Ausgereifte Natürliche Killerzellen	CD3-CD56+CD57+
NK-T-Zellen	CD3+CD56+
Ausgereifte NK-T-Zellen	CD3+CD56+CD57+

CD = Cluster of Differentiation, FoxP3 = Forkhead box P3; NK-Zellen = Natürliche Killerzellen

### 3.6 Analyse der Zytokin-Produktion mittels ELISA

#### 3.6.1 Grundlagen

Die Konzentrationen der Zytokine (IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und der Serinprotease Granzym B wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Bei diesem Verfahren werden die Analyte über die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen. Durch die Beschichtung der 96-Well-Platte mit spezifischen Antikörpern (Capture-antibody) binden die gesuchten Antigene in einem Probengemisch an den Boden der Platten (24). An die gebundenen Antigene bindet ein weiterer spezifischer mit Biotin verknüpfter Antikörper (Detection-antibody). Ein sekundärer, mit Horse-radish-peroxidase (HRP) konjugierter Avidin- bzw. Streptavidin-Antikörper bindet an die primären, Biotin-gekoppelten Antikörper. Das Enzym setzt 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) um, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbstoffentwicklung ist proportional zur Menge des Analyten in der Probe. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird die Farbentwicklung am ELISA-Reader optisch bei 450 nm gemessen und analysiert (24).

#### 3.6.2 Durchführung des ELISA

In dem Zellkulturüberstand der Kokulturen (Lagerung bei -20 °C) wurde die Produktion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2 und Granzym B analysiert.

Die Vorbereitung der ELISA-Platte erfolgte gemäß Anleitung mit dem Coating-Buffer und dem Capture-Antibody. Jedes Well der 96-Well-Platte wurde mit 100 µl Capture-antibody befüllt. Die Platte wurde danach über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank bzw. bei Raumtemperatur (bei Granzym B) gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte nach mehreren Waschschritten zunächst für 1 h bzw. 2 h (bei Granzym B) mit Elispot geblockt und anschließend erneut gewaschen.

Parallel zu den Proben wurde eine Standardreihe gemäß Anleitung in den entsprechenden Verdünnungsschritten aufgetragen. Pro Well wurden 200 µl der aufgetauten Zellkulturüberstände auf die Platten aufgetragen. Die stimulierten PBMCs, als Positivkontrolle, wurden aufgrund der erwarteten starken Analyt-Produktion im Voraus 1:100 mit Elispot verdünnt. Die Platten wurden erneut über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach Entfernung des Überstands und drei Waschschritten wurden die Proben für 1 h mit je 100 µl Detection-antibody im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten Waschschritten erfolgte die Inkubation für 30 Min. mit 100 µl der Avidin-HRP- bzw. Streptavidin-HRP-Antikörper (bei Granzym B) pro Well.

Nach 5–7 Waschschritten wurden 100 µl TMB-Lösung hinzugegeben. In Abhängigkeit von der Farbentwicklung wurden die Ansätze für ca. 15–30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Farbentwicklung am ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt.

### **3.7 Statistische Verfahren**

Alle gezeigten Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung berechnet. Pro Versuch erfolgten 2-4 Durchgänge. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweiseitiger Student-t-Verteilung berechnet. Es wird \* P ≤ 0,05 als signifikant, \*\* P ≤ 0,01 als hochsignifikant und \*\*\* P ≤ 0,001 als höchstsignifikant bewertet.

## 4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss des onkolytischen H-1PV auf die Zellviabilität und Immunaktivierung beim CMS-1 und CMS-4 des KRK untersucht. Die Viabilität der KRK-Zellen nach H-1PV-Infektion wurde bei verschiedenen Inkubationszeiten und Infektionsstärken mit dem MTT-Assay überprüft. Zur Analyse der Immunzellaktivierung nach H-1PV-Infektion wurden die mit H-1PV infizierten KRK-Zellen mit PBMCs kokultiviert. Die Zellen wurden anschließend einer FACS-Analyse unterzogen. Mittels Sandwich-ELISA wurde in den Ansätzen die Produktion verschiedener Zytokine (IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) sowie Granzym B analysiert.

### 4.1 Zellviabilität der CMS-1- und CMS-4-Zelllinien (MTT-Assay)

Die Veränderung der Zellviabilität der Zelllinien DLD-1 und HCT-15 (CMS-1) sowie SW-480 und CL-11 (CMS-4) durch eine H-1PV-Infektion wurde mittels MTT-Assay analysiert. Pro Zelllinie wurden 2–3 Messreihen nach 24 und 48 h Inkubation mit dem Virus ausgewertet. Aus den gemessenen Werten wurde der Mittelwert gebildet. Die Infektion mit dem H-1PV erfolgte mit unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI: 0 (Kontrolle), 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 15, 20). In den Abbildungen 2–4 sowie 6–8 werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Zellviabilität (%; MOI 0 = 100 %) in Abhängigkeit von der Infektionsstärke und Infektionsdauer dargestellt.

#### 4.1.1 DLD-1 (KRK-CMS-1)

Laut Zellviabilitätsassay nahm die Stoffwechselaktivität der Zelllinie DLD-1 (KRK-CMS-1) nach der H-1PV-Infektion ab (siehe Abbildung 2). Mit steigender MOI wurde eine hochsignifikante Abnahme der Viabilität beobachtet. Auch mit zunehmender Infektionsdauer nahm die Stoffwechselaktivität hochsignifikant ab. Beispielsweise betrug die Viabilität bei einer MOI 20 nach 24 h 64,87 % und nach 48 h 55,89 %.

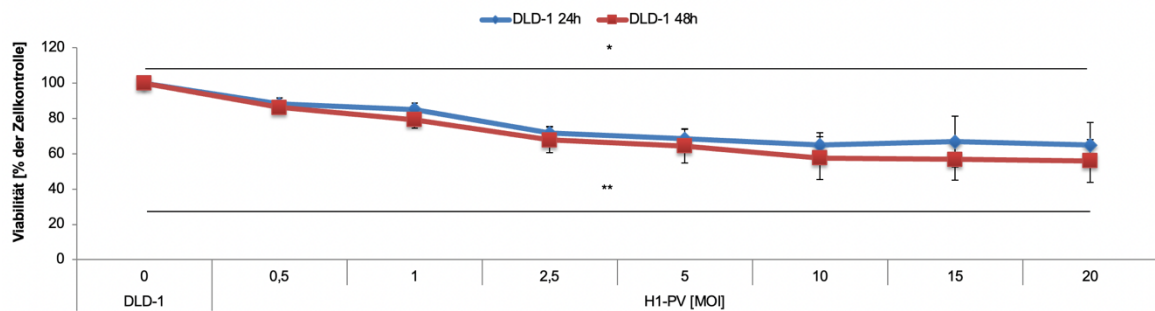


Abbildung 2: Relative Viabilität von DLD-1-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI)

MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , MOI = multiplicity of infection

#### 4.1.2 HCT-15 (KRK-CMS-1)

Die Zelllinie HCT-15 zeigte im MTT-Assay lediglich eine tendenzielle Abnahme der Stoffwechselaktivität mit steigender Infektionsstärke. Nach einer Infektionsdauer von 24 h wurde eine Zellviabilität von 98,39 % bei MOI 20 gemessen. Bei einer Infektionsdauer von 48 h war in den Ansätzen mit unterschiedlichen MOI eine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität auf bis zu 80,19 % (MOI 20) zu verzeichnen (siehe Abbildung 3). Es bestand keine eindeutige Korrelation der Viabilität mit der Infektionsstärke.

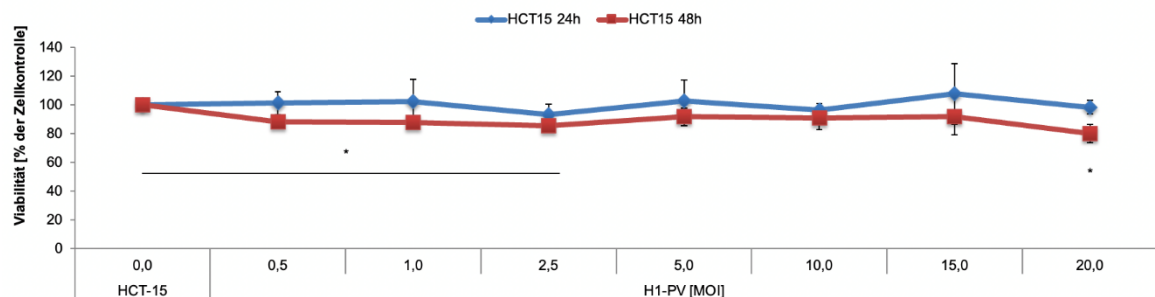


Abbildung 3: Relative Viabilität von HCT-15-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI)

MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei (48 h) bzw. drei (24 h) unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , MOI = multiplicity of infection

#### 4.1.3 SW-480 (KRK-CMS-4)

Die KRK-CMS-4-Zelllinie SW-480 zeigte eine höchstsignifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität mit steigender Infektionsstärke. Bereits in den Ansätzen mit einer MOI 1 konnte nach 24 h Inkubation eine Abnahme der Viabilität auf 84,60 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Nach 48 h betrug die Viabilität unter diesen Bedingungen 70,80 %, was den zusätzlichen Effekt der Infektionsdauer verdeutlicht. Bei einer MOI von

20 reduzierte sich die Viabilität der Zellen nach 24 h auf 44,33 % und nach 48 h auf 23,51 % (siehe Abbildung 4).

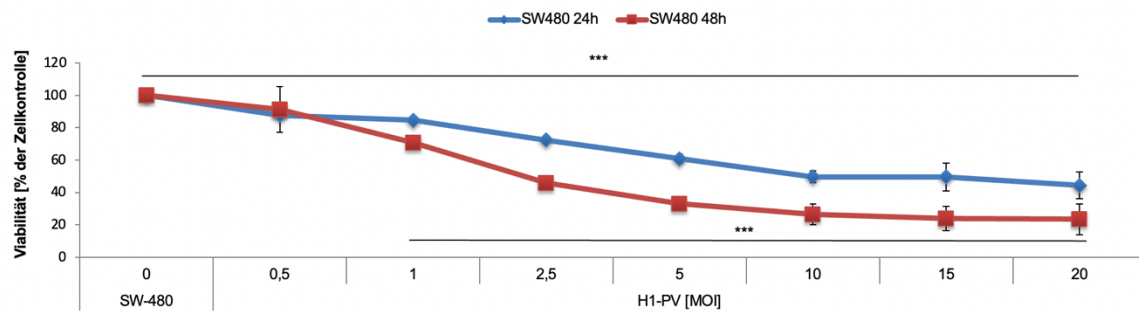


Abbildung 4: Relative Viabilität von SW-480-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI)

MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , MOI = multiplicity of infection

Im MTT-Assay war bei der Zelllinie SW-480 eine deutliche Entfärbung der Wells mit steigender Infektionsstärke erkennbar (siehe Abbildung 5).

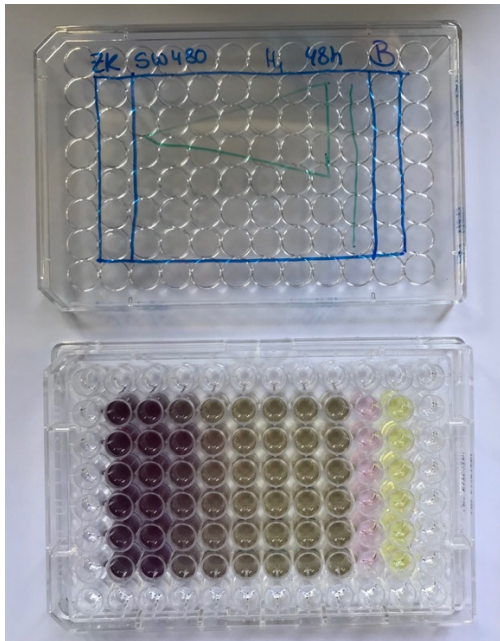


Abbildung 5: MTT-Assay (Beispiel) – SW-480-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI)

Links: Ansätze ohne H-1PV: Erkennbar war eine deutliche Aufhellung der Wells mit steigender Infektionsstärke von links nach rechts.

#### 4.1.4 CL-11 (KRK-CMS-4)

Auch die zweite KRK-CMS-4-Zelllinie (CL-11) zeigte im MTT-Assay mit zunehmender H-1PV-Infektionsstärke eine deutliche Minderung der Stoffwechselaktivität. Zudem unterschieden sich die Ergebnisse bei verschiedenen Inkubationszeiten erheblich. Es bestand eine deutlich positive Korrelation zwischen der Infektionsdauer und der Viabilität.

Nach 24 h Inkubationszeit war in den Ansätzen mit einer MOI 5–20 eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nachweisbar. Nach 48 h war bei allen Infektionsstärken eine höchstsignifikante Abnahme der Zellviabilität nach H-1PV-Infektion nachweisbar. Bei einer MOI 20 betrug die Viabilität nach 24 h 57,27 % des Wertes der Nullkontrolle und nach 48 h 21,90 % (siehe Abbildung 6).

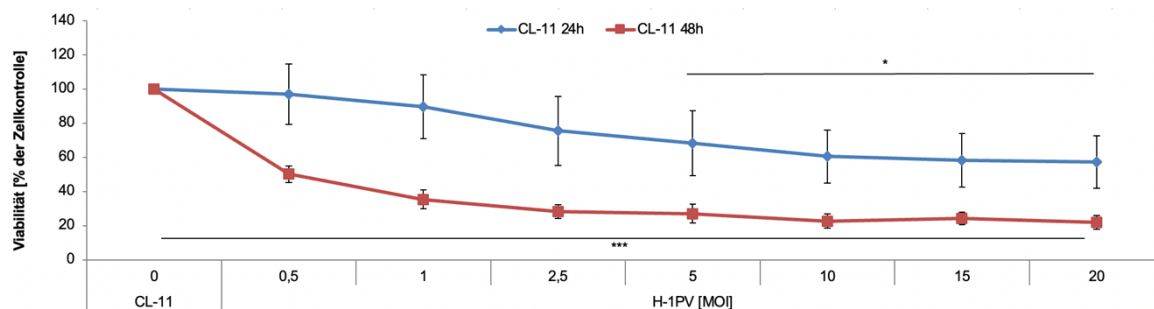


Abbildung 6: Relative Viabilität von CL-11-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI)

MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , MOI = multiplicity of infection

#### 4.1.5 Vergleich der CMS-1- und CMS-4-Zelllinien

Eine Infektion mit H-1PV hatte bei CMS-1- und CMS-4-Zelllinien einen unterschiedlichen Effekt auf die Viabilität. Die Unterschiede waren sowohl bei unterschiedlichen Infektionsstärken als auch bei unterschiedlichen Infektionsdauern erkennbar. Die CMS-1-Zelllinien DLD-1 und HCT-15 zeigten insgesamt eine geringere, bei DLD-1 jedoch überwiegend signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität. Die Viabilität der Zelllinie HCT-15 wurde durch die Infektion mit H-1PV am wenigsten beeinträchtigt (siehe Abbildung 7).

Die Zellreihen SW-480 und CL-11 des CMS-4 des KRK wiesen eine signifikante Verminderung der Zellviabilität nach Infektion mit dem H-1PV auf. Beide CMS-4-Zelllinien zeigten bereits bei einer Infektionsstärke von MOI 20 und einer Inkubationszeit von 24 h eine signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität auf 44,33 % (SW-480) und 57,27 % (CL-11). Bei den CMS-1-Zelllinien wurden vergleichbare Werte allenfalls nach 48 h Infektion mit MOI 20 erreicht (55,89 % bei DLD-1). Die Zelllinie HCT-15 zeigte keine entsprechende Minderung der Viabilität (80,19 % bei MOI 20 nach 48 h). Weiter zeigten die CMS-4-Zelllinien eine z.T. höchstsignifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität mit zunehmender Infektionsdauer (siehe Abbildung 8).

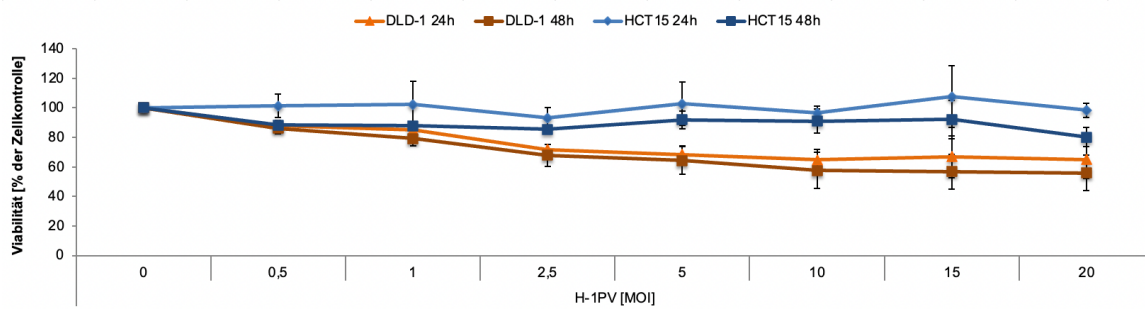


Abbildung 7: Vergleich der relativen Viabilität der KRK-CMS-1-Zelllinien (DLD-1, HCT-15) nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI). MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei bis drei unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. CMS = Consensus molecular subtype, KRK = kolorektales Karzinom, MOI = multiplicity of infection

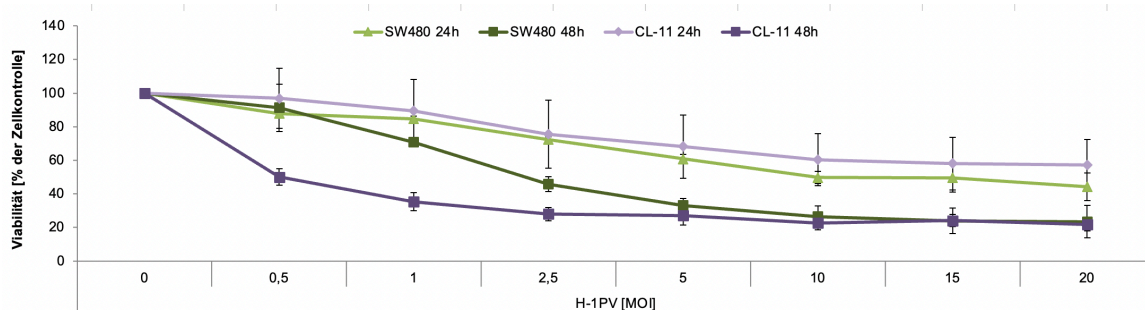


Abbildung 8: Vergleich der relativen Viabilität der KRK-CMS-4-Zelllinien (SW-480, CL-11) nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI). MTT-Analyse: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei bis drei unabhängigen Messreihen. Viabilität der Zellen in den Ansätzen ohne H-1PV entsprechen 100 %. CMS = Consensus molecular subtype, KRK = kolorektales Karzinom, MOI = multiplicity of infection

## 4.2 Charakterisierung der PBMCs nach Kokultivierung mit H-1PV-infizierten KRK-Zellen

Im zweiten Schritt erfolgte eine Kokultivierung der mit H-1PV infizierten (MOI 1, MOI 5) KRK-Zellen (CMS-1: DLD-1, HCT-15; CMS-4: SW-480, CL-11) mit PBMCs. Kokultur-Ansätze mit nicht-infizierten KRK-Zellen dienten als Kontrolle. Mittels FACS-Analyse wurden die Anteile von Immunzell-Subpopulationen bestimmt (siehe Tabelle 8). Aus 2–4 voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen berechnet (siehe Abbildungen 9–16). Die Anteile der Immunzell-Subpopulationen in den Kokultur-Experimenten wurden mit den Anteilen in PBMC-Monokulturen (nicht-stimuliert, stimuliert, siehe Kapitel 3.4.2) verglichen.

### 4.2.1 Treg-Anteil an den PBMCs

Tregs wurden in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3+CD4+FoxP3+ bestimmt. In den Kokulturen mit den nicht-infizierten KRK-Zelllinien zeigte der Treg-Anteil an den PBMCs ein inhomogenes Bild (siehe Abbildung 9). Bei den CMS-1-Zelllinien betrug der Anteil 15,43 % (DLD-1) bzw. 6,14 % (HCT-15) und bei den CMS-4-Zelllinien 17,64 % (SW-480) bzw. 7,98 % (CL-11). Kokulturen mit DLD-1 und SW-480 zeigten höhere Treg-Anteile als Monokulturen unstimulierter PBMCs, aber niedrige Anteile als Monokulturen stimulierter PBMCs.

Eine Infektion der KRK-Zellen mit H-1PV hatte bei keiner der vier Zelllinien eine signifikante Auswirkung auf den Anteil der Tregs in den Kokulturen. Beispielsweise wiesen die Kokulturen mit nicht infizierten bzw. infizierten (MOI 5) HCT-15-Zellen einen Treg-Anteil von 6,14 % bzw. 5,57 % auf. Auch die unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI 1, MOI 5) zeigten keinen Effekt. In den Kokulturen mit infizierten CL-11-Zellen betrug der Treg-Anteil 10,03 % bei MOI 1 und 9,68 % bei MOI 5. Alle Werte in den Kokulturen mit infizierten KRK-Zellen lagen unter den Werten der unstimulierten bzw. stimulierten PBMC-Monokulturen. Insgesamt schien eine H-1PV-Infektion der KRK-Zellen den Anteil der Tregs in den Kokulturen nicht zu beeinflussen.

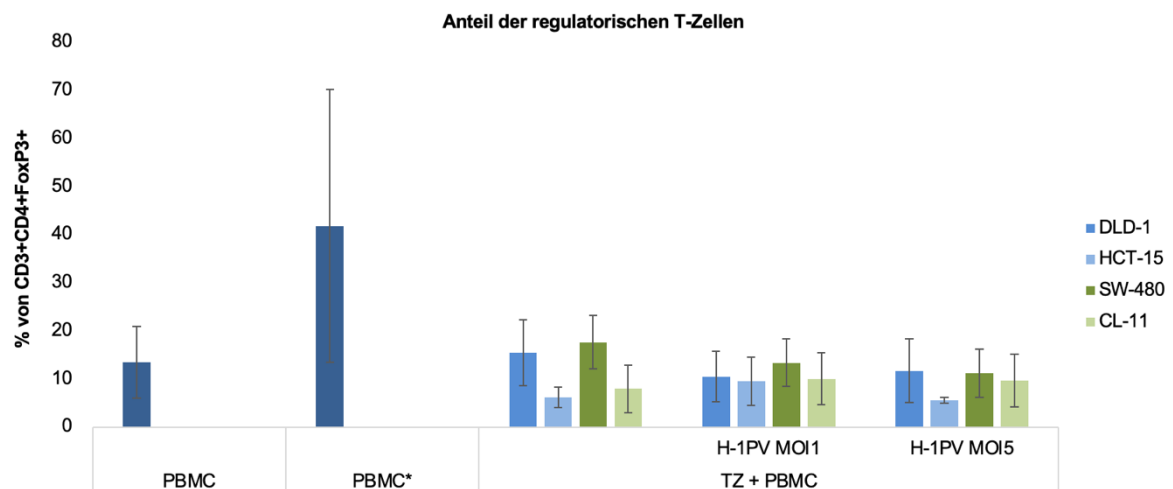


Abbildung 9: Anteil der regulatorischen T-Zellen (Tregs, CD3+CD4+FoxP3+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 3–4 unabhängigen Messreihen. CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

## 4.2.2 Anteil aktivierter Tregs an den PBMCs

Aktiviert Tregs wurden in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3+CD4+FoxP3+CD69+ bestimmt. In den Kokulturen mit den CMS-1-Zelllinien (DLD-1: 7,78 %, HCT-15: 4,23 %) war der Anteil der aktivierten Tregs an den PBMCs niedriger als in den Kokulturen mit den CMS-4-Zelllinien (SW-480: 10,65 %, CL-11: 10,90 %). Die Werte der Kokulturen bewegten sich mit Ausnahme der Kokultur mit HCT-15 über dem Wert der unstimulierten PBMC-Monokultur (5,46 %) und in allen Kokulturen unter dem Wert der stimulierten PBMC-Monokultur (siehe Abbildung 10).

Die Kokulturen mit infizierten CMS-1-Zelllinien ergaben ein inhomogenes Bild. Während die H-1PV-Infektion bei der Zelllinie DLD-1 den Anteil aktivierter Tregs von 7,78 % (ohne Infektion) auf 13,77 % (MOI 1) bzw. 23,75 % (MOI 5, hochsignifikanter Anstieg) erhöhte, war in den Kokulturen mit der Zelllinie HCT-15 keine signifikante Veränderung dieses Anteils nach H-1PV-Infektion nachweisbar (3,82–4,23 %). In den Kokulturen mit CMS-4-Zelllinien erhöhte die H-1PV-Infektion den Anteil aktivierter Tregs deutlich (SW-480: 10,65 % (ohne Infektion), 19,76 % (MOI 1), 25,40 % (MOI 5, signifikanter Anstieg); CL-11: 10,90 % (keine Infektion), 26,17 % (MOI 1) und 28,67 % (MOI 5, signifikanter Anstieg). Die Werte in den CMS-4-Kokulturen lagen über dem Wert der unstimulierten PBMC-Monokultur. In fast allen Kokulturen (Ausnahme HCT-15) war ein Anstieg des Anteils an aktivierten Tregs nach einer H-1PV-Infektion nachweisbar; dieser Anstieg war in den CMS-4-Kokulturen deutlicher und bei einer Infektionsstärke von MOI 5 signifikant. Zwischen der Infektionsstärke und dem Anteil der Tregs bestand eine tendenziell positive Korrelation.

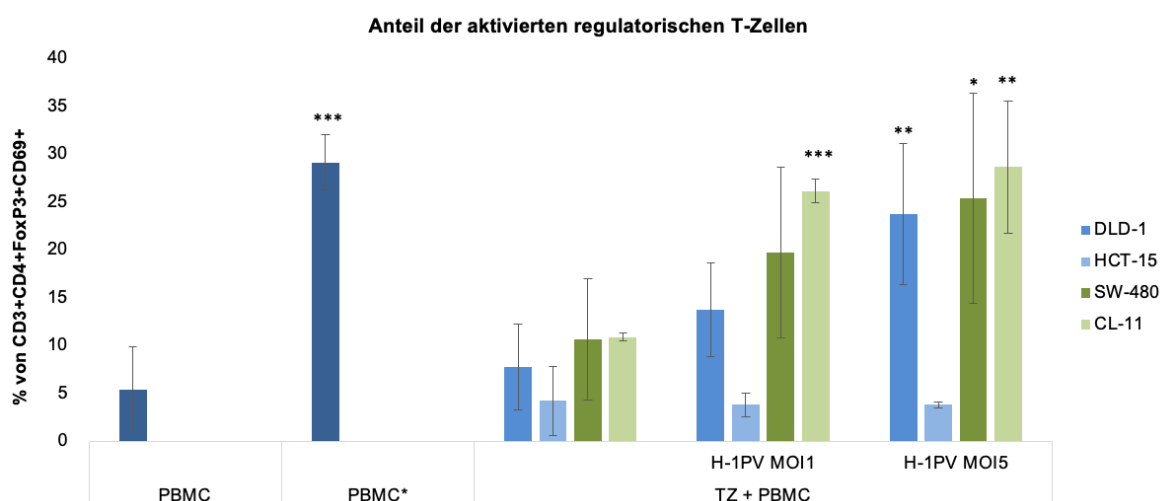


Abbildung 10: Anteil aktivierter regulatorischer T-Zellen (Tregs, CD3+CD4+FoxP3+CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 3–4 unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.2.3 Anteil aktivierter T<sub>H</sub>-Zellen

Aktivierete T<sub>H</sub>-Zellen wurden in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3+CD4+FoxP3-CD69+ bestimmt.

In den Kokulturen war der Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen in allen vier untersuchten Zelllinien vergleichbar. Zwischen den CMS-1- und CMS-4-Zelllinien bestand kein Unterschied (siehe Abbildung 11). Weiter entsprach der Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen in den Kokulturen dem Anteil in den unstimulierten PBMC-Monokulturen und lag deutlich unter dem Anteil in den stimulierten PBMC-Monokulturen.

In den Kokulturen mit den CMS-1- und CMS-4-Zelllinien erhöhte eine H-1PV-Infektion den Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen. In den HCT-15-Kokulturen war aber lediglich eine tendenzielle Erhöhung von 1,24 % (keine Infektion) auf 2,99 % (MOI 1) und 4,29 % (MOI 5) nachweisbar. In den Kokulturen mit der anderen CMS-1-Zelllinie (DLD-1) war die Zunahme des Anteils der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen dagegen signifikant (1,47 % (keine Infektion), 5,24 % (MOI 1), 6,88 % (MOI 5)). Das Gleiche galt für die Kokulturen mit den CMS-4-Zelllinien, wobei der Anstieg in den Kokulturen mit SW-480 am deutlichsten war (SW-480: 2,51 % (keine Infektion), 7,29 % (MOI 1, hochsignifikanter Anstieg), 13,23 % (MOI 5, höchstsignifikanter Anstieg); CL-11: 2,91 % (ohne Infektion), 5,77 % (MOI 1), 6,41 % (MOI 5)). Der Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen lag in den Kokulturen mit den CMS-1- und -4-Zelllinien nach H1-PV-Infektion über dem Wert von 1,83 % der unstimulierten PBMC-Monokulturen. In den meisten Fällen bestand eine positive Korrelation zwischen der Infektionsstärke und dem Anteil aktivierter T<sub>H</sub>-Zellen.

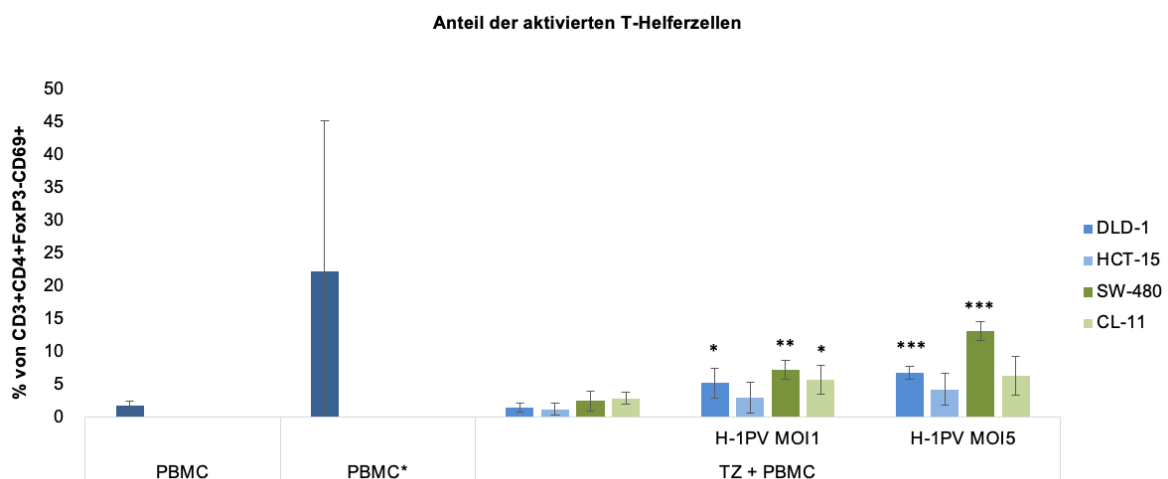


Abbildung 11: Anteil aktivierter T-Helferzellen (CD3+CD4+FoxP3-CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 3–4 unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

#### 4.2.4 Anteil der aktivierten CTLs (CD8+-T-Zellen)

Aktiviert CTLs wurden in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3+CD8+CD69+ bestimmt. In den Kokulturen mit den CMS-4-Zelllinien (CL-11: 12,43 %, SW-480: 10,43 %) ohne Infektion entsprachen die Anteile tendenziell den Anteilen in den unstimulierten PBMC-Monokulturen, während in den Kokulturen mit den CMS-1-Zelllinien deutlich niedrigere Werte auftraten (siehe Abbildung 12). Somit führte die Kokultur mit CMS-1- und -4-Zelllinien zu keiner Aktivierung der CTLs.

Nach der Infektion der KRK-Zellen mit H-1PV war in den Kokulturen in der Regel eine Zunahme des Anteils aktivierter CTLs nachweisbar. Bei den DLD-1-Kokulturen wurde ein signifikanter Anstieg von 4,28 % (ohne Infektion) auf 12,25 % (MOI 5) festgestellt. Der Anteil überstieg jedoch nicht den Anteil in den nicht-aktivierten PBMC-Monokulturen und war daher nicht als Aktivierung zu werten. Der Anstieg in den HCT-15-Kokulturen (7,82 % (MOI 1), 8,60 % (bei MOI 5)) war gering; die Werte blieben deutlich unter dem Wert in den nicht-aktivierten PBMC-Monokulturen. In den SW-480-Kokulturen war der Anstieg des Anteils aktivierter CTLs (10,43 % (ohne Infektion), 17,60 % (MOI 1), 21,27% (MOI 5)) am größten. Die Zunahme der aktivierten CTLs nach Infektion mit H-1PV überstiegen den Wert in den unstimulierten PBMC-Monokulturen. Der Anstieg in den Kokulturen mit der CMS-4-Zelllinie CL-11 war deutlich geringer (12,43 % (ohne Infektion), 13,48 % (MOI 1), 13,83 % (MOI 5)). In den meisten Fällen bestand eine positive Korrelation zwischen der Infektionsstärke und dem Anteil aktivierter T<sub>H</sub>-Zellen.

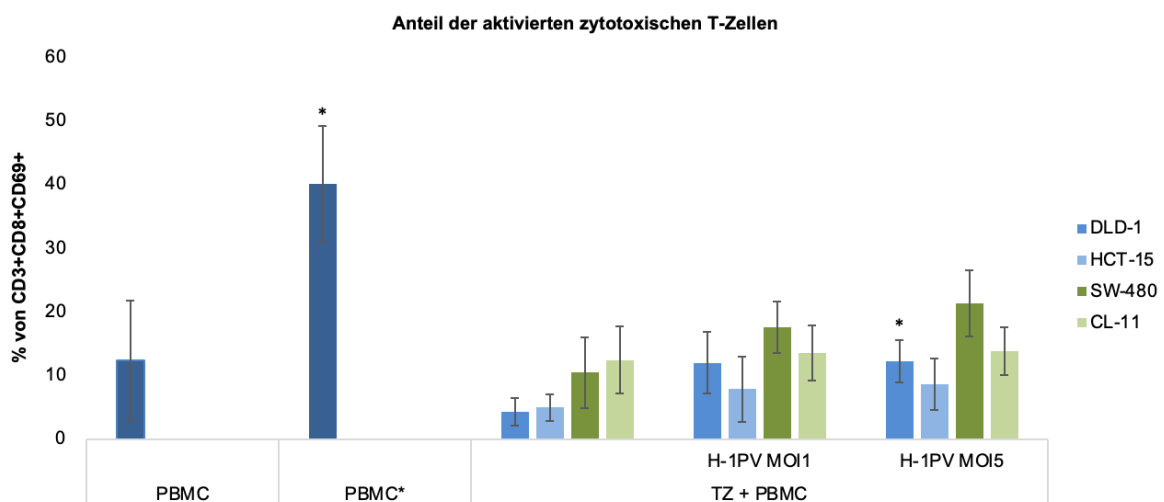


Abbildung 12: Anteil aktivierter zytotoxischer T-Zellen (CTLs, CD3+CD8+CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.2.5 Anteil der NK-Zellen

NK-Zellen wurden in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3-CD56+ bestimmt. Der Anteil der NK-Zellen an den PBMCs in den Kokulturen mit nicht-infizierten KRK-Zellen war variabel. Die CMS-4-Kokulturen wiesen im Vergleich zu den CMS-1-Kokulturen tendenziell höhere Anteile auf (siehe Abbildung 13). Die SW-480-Kokultur (CMS-4) zeigte mit 69,03 % den höchsten Anteil; der Wert lag deutlich über dem Wert in den unstimulierten PBMC-Monokulturen. Auch der Wert in den CL-11-Kokulturen (CMS-4) lag mit 39,20 % leicht über dem Wert in den PBMC-Monokulturen. Dagegen zeigten die CMS-1-Kokulturen (DLD-1: 30,27 %, HCT-15: 17,47 %) im Vergleich zu den unstimulierten PBMC-Monokulturen deutlich niedrigere Werte.

Eine H-1PV-Infektion wirkte sich auf den Anteil der NK-Zellen in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen unterschiedlich aus. Bei den Zelllinien des CMS-1, insbesondere bei DLD-1, war nach der H-1PV-Infektion eine tendenzielle Zunahme des Anteils an NK-Zellen erkennbar. Die Werte in den DLD-1-Kokulturen (30,27% (ohne Infektion), 36,07 % (MOI 1), 43,70 % (MOI 5)) überstiegen den Anteil in den PBMC-Monokulturen. Hierbei korrelierte die Infektionsstärke annähernd positiv mit dem Anteil an NK-Zellen. Bei den CMS-4-Kokulturen (SW-480, CL-11) verringerte die H-1PV-Infektion dagegen tendenziell den Anteil an NK-Zellen (SW-480: 69,03 % (ohne Infektion), 62,63 % (MOI 5); CL-11: 39,20 % (ohne Infektion), 35,77 % (MOI 1), 27,27 % (MOI 5)). Dabei sank der Anteil an NK-Zellen tendenziell mit zunehmender Infektionsstärke.

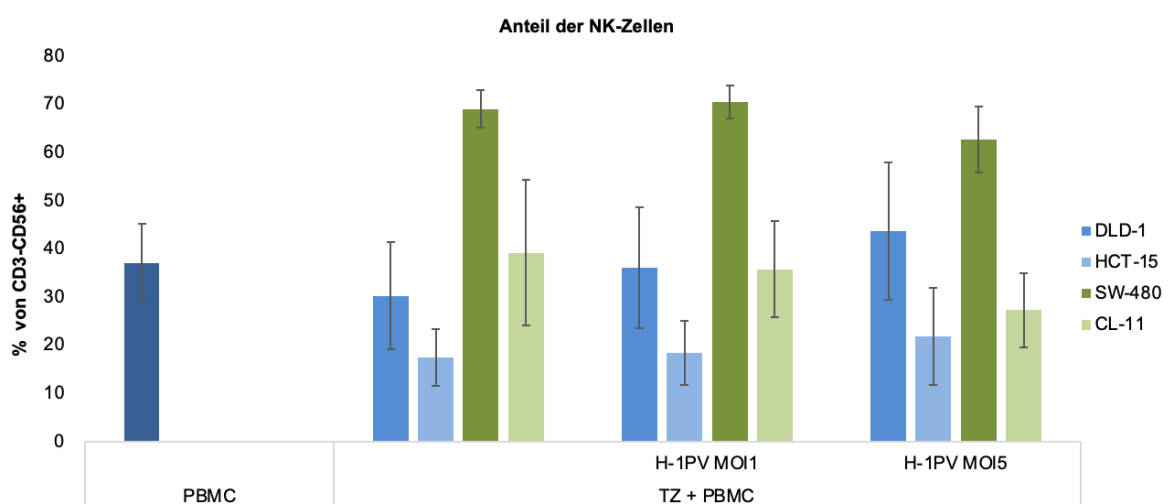


Abbildung 13: Anteil Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen, CD3-CD56+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

#### 4.2.6 Anteil der ausgereiften NK-Zellen

Der Anteil der ausgereiften NK-Zellen wurde in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3-CD56+CD57+ bestimmt.

Der Anteil der ausgereiften NK-Zellen in den Kokulturen mit der SW-480-Zelllinie (CMS-4) lag mit 87,63 % deutlich höher als die Werte in den Kokulturen der anderen Zelllinien (zwischen 20,20–22,07 %), aber auch als die Anteile in den unstimulierten und stimulierten PBMC-Monokulturen (siehe Abbildung 14).

Auch nach einer Infektion der KRK-Zellen mit dem H-1PV blieben die Unterschiede bestehen. In den Kokulturen mit der SW-480-Zelllinie (CMS-4) war der Anteil der ausgereiften NK-Zellen am höchsten. In den Kokulturen mit den Zelllinien DLD-1 und HCT-15 war nach der H-1PV-Infektion eine tendenzielle Abnahme des Anteils ausgereifter NK-Zellen zu beobachten (DLD-1: 21,33 % (ohne Infektion), 16,56 % (MOI 5); HCT-15: 20,20 % (ohne Infektion), 14,82 % (MOI 5)). Bei niedrigeren Werten als in der unstimulierten PBMC-Monokultur ist kein Maturierungseffekt der H-1PV-Infektion erkennbar. Die Kokulturen mit den CMS-4-Zelllinien zeigten nach einer H-1PV-Infektion weitgehend gleichbleibende bzw. leicht erhöhte Werte (SW-480: 87,63 % (ohne Infektion), 87,50 % (MOI 5); CL-11: 22,07 % (ohne Infektion), 35,93 % (MOI 5)), wobei die Anteile der ausgereiften NK-Zellen nur in den Kokulturen mit SW-480 höher lagen als in den PBMC-Monokulturen.

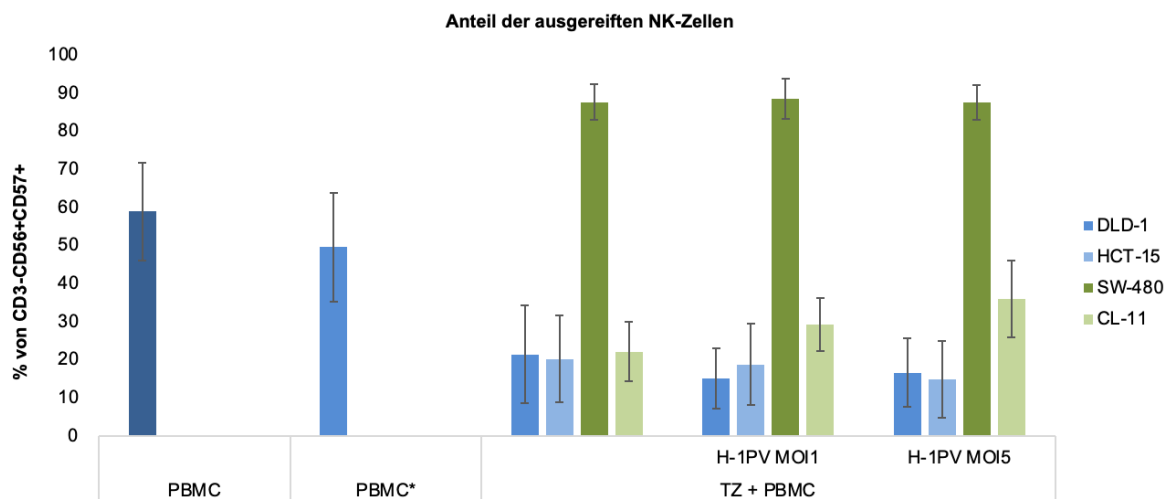


Abbildung 14: Anteil ausgereifter Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen, CD3-CD56+CD57+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.2.7 Anteil der NK-T-Zellen

Der Anteil der NK-T-Zellen wurde in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination CD3+CD56+ bestimmt (siehe Abbildung 15).

In den Kokulturen mit den CMS-1- und CMS-4-Zelllinien waren die Anteile der NK-T-Zellen vergleichbar. Bei den CMS-4-Kokulturen (SW-480: 25,17 %; CL-11: 23,80 %) wurden im Vergleich zu den CMS-1-Kokulturen (DLD-1: 18,20 %, HCT-15: 21,27 %) höherer Anteile gemessen, jedoch lagen alle Werte unterhalb der Werte in der unstimulierten PBMC-Monokultur.

Eine H-1PV-Infektion der KRK-Zellen erhöhte in allen Kokulturen den Anteil der NK-T-Zellen tendenziell. Dabei zeigte sich innerhalb der CMS jedoch kein einheitliches Bild. Während in den DLD-1-Kokulturen (CMS-1) ein signifikanter Anstieg der NK-T-Zellen von 18,20 % auf 25,07 % (MOI 1) bzw. 35,19% (MOI 5) auftrat, zeigten die Kokulturen der Zelllinie HCT-15 desselben Subtyps keine Änderung. Die Werte der Kokulturen beider Zelllinien lagen unterhalb der Werte in der PBMC-Monokultur. In den CMS-4-Kokulturen war das Bild vergleichbar. Während sich in den Kokulturen der Zelllinie SW-480 keine Änderung beobachten ließ, nahmen die Anteile der NK-T-Zellen nach H-1PV-Infektion in den Kokulturen mit CL-11 tendenziell von 23,80 % (keine Infektion) auf 33,80 % (MOI 1) bzw. 41,13 % (MOI 5) zu und lagen damit über dem Wert in der PBMC-Monokultur. Das Ergebnis der Infektionsstärke MOI 5 war dabei signifikant. Damit wies die Zelllinie CL-11 tendenziell die höchsten Werte an NK-T-Zellen aller untersuchten Zelllinien auf.

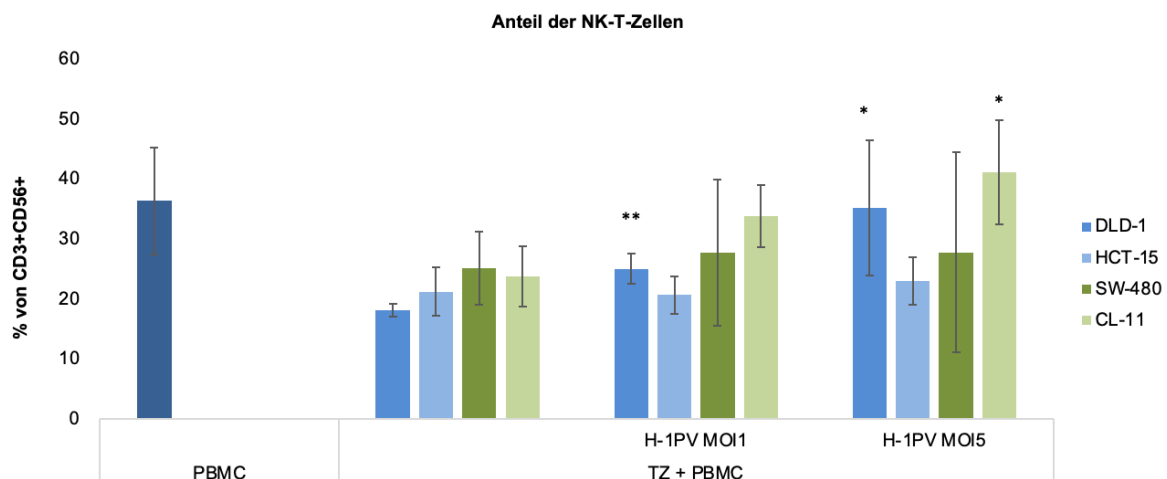


Abbildung 15: Anteil NK-T-Zellen (CD3+CD56+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

#### 4.2.8 Anteil ausgereifter NK-T-Zellen

Der Anteil der ausgereiften NK-T-Zellen wurde in der FACS-Analyse über die Marker-Kombination (CD3+CD56+CD57+) bestimmt (siehe Abbildung 16).

In den Kokulturen mit den CMS-1-Zelllinien sowie der CMS-4-Zelllinie CL-11 waren die Anteile der ausgereiften NK-T-Zellen tendenziell vergleichbar und lagen unter dem Wert in den unbehandelten PBMC-Monokulturen. In den Kokulturen mit der CMS-4-Zelllinie SW-480 lag der Anteil der ausgereiften NK-T-Zellen mit 79,33 % jedoch tendenziell deutlich höher.

Nach der H-1PV-Infektion war in den CMS-1-Kokulturen tendenziell eine leichte Abnahme des Anteils ausgereifter NK-T-Zellen erkennbar (DLD-1: 15,39 % (ohne Infektion), 14,97 % (MOI 1), 12,53 % (MOI 5); HCT-15: 16,42 % (ohne Infektion), 15,15 % (MOI 5)). Alle Werte lagen unterhalb des Wertes der unbehandelten PBMC-Monokultur.

Die CMS-4-Kokulturen zeigten nach Infektion mit H-1PV tendenziell eine Zunahme des Anteils an ausgereiften NK-T-Zellen (SW-480: 79,33 % (ohne Infektion), 84,23 % (MOI 1), 91,47 % (MOI 5); CL-11: 14,13 % (ohne Infektion), 22,13 % (MOI 1), 23,37 % (MOI 5)). Es bestand tendenziell eine positive Korrelation zwischen der Infektionsstärke und dem Anteil an ausgereiften NK-T-Zellen. Die Werte in den CMS-4-Kokulturen lagen oberhalb des Wertes in der PBMC-Monokultur.

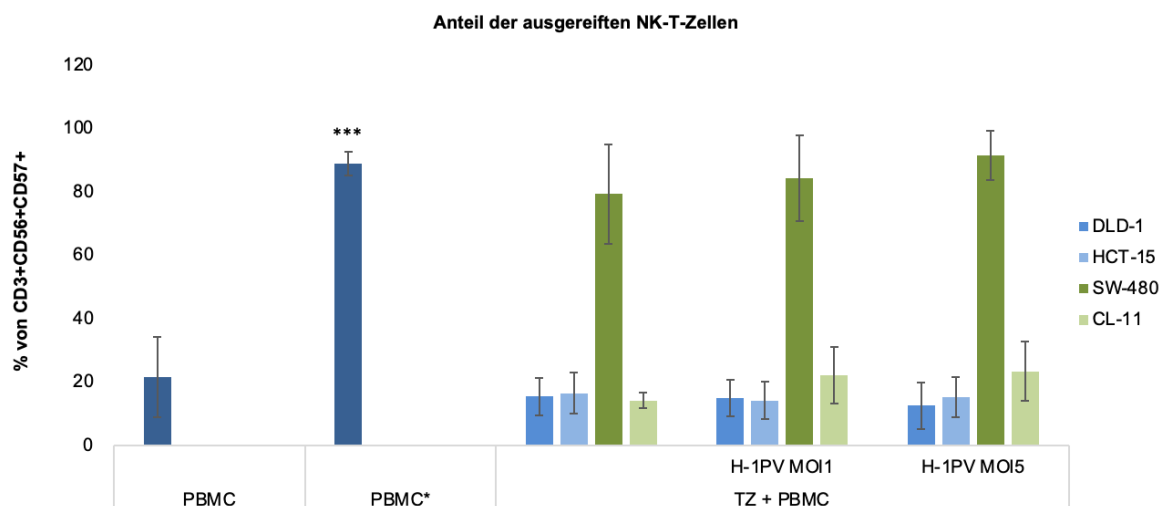




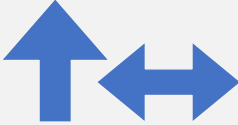









Abbildung 16: Anteil ausgereifter NK-T-Zellen (CD3+CD56+CD57+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)

Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse): Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.2.9 Übersicht der FACS-Ergebnisse nach H-1PV-Infektion

Tabelle 9 verdeutlicht die Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei dem Effekt einer H-1PV-Infektion auf die Anteile der Immunzell-Subpopulationen in Kokulturen aus PBMCs und KRK-CMS-1- bzw. KRK-CMS-4-Zelllinien.

Tabelle 9: Übersicht über die Effekte einer Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) auf die Anteile der Immunzell-Subpopulationen in Kokulturen aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) und mit Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten Kolonkarzinom-Zellen – Consensus molecular subtype (CMS) 1 vs. 4

	CMS-1 nach H-1PV-Infektion	CMS-4 nach H-1PV-Infektion
<b>Regulatorische T-Zellen</b>		
<b>Aktivierte regulatorische T-Zellen</b>		
<b>Aktivierte T-Helferzellen (CD4+-T-Zellen)</b>		
<b>Aktivierte zytotoxische CD8+-T-Zellen</b>	-	
<b>Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)</b>		
<b>Ausgereifte NK-Zellen</b>	-	
<b>NK-T-Zellen</b>	-	
<b>Ausgereifte NK-T-Zellen</b>	-	

Die Veränderungen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Der Anteil an Tregs veränderte sich nach einer H-1PV-Infektion in den CMS-1- bzw. CMS-4-Kokulturen nicht. Dagegen nahm der Anteil der aktivierten Tregs in den Kokulturen der CMS-4-Zelllinien und DLD-1 (CMS-1) signifikant zu (CMS-4 > CMS-1).
- Der Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen nahm in den CMS-4-Kokulturen und in der DLD-1-Kokultur (CMS-1) nach H-1PV-Infektion signifikant zu.
- Der Anteil der aktivierten CTLs nahm bei einer H-1PV-Infektion in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen tendenziell zu, wobei die Werte nur in den CMS-4-Kokulturen die Werte in den unbehandelten PBMC-Monokulturen überstiegen.
- Der Anteil der NK-Zellen nahm nach einer H-1PV-Infektion in den CMS-1-Kokulturen tendenziell zu und in den CMS-4-Kokulturen tendenziell ab, wobei die Ergebnisse bei fehlender Signifikanz nur eingeschränkt bewertbar waren. Der Anteil der ausgereiften NK-Zellen sprach in den meisten Kokulturen (CMS-1, CL-11 (CMS-4)) gegen einen Maturierungseffekt der H-1PV-Infektion. Bei den Kokulturen mit der Zelllinie SW-480 war eine Maturierung in den Kokulturen auch ohne H-1PV-Infektion nachweisbar.
- Der Anteil der NK-T-Zellen nahm nach H-1PV-Infektion in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen tendenziell zu. Er überstieg jedoch nur in den CL-11-Kokulturen die Werte der unbehandelten PBMC-Monokultur. Bei den ausgereiften NK-T-Zellen zeigte sich ein Unterschied zwischen den CMS-1- und -4-Kokulturen. In CMS-1-Kokulturen verringerte sich der Anteil nach einer H-1PV-Infektion, somit lagen alle Werte unterhalb der Werte der PBMC-Monokultur. In den CMS-4-Kokulturen war dagegen eine tendenzielle Zunahme des Anteils an ausgereiften NK-T-Zellen mit steigender Infektionsstärke erkennbar. Bei fehlender Signifikanz waren die Effekte jedoch nur eingeschränkt bewertbar.

### **4.3 Produktion von Zytokinen und Granzym in Kokulturen aus KRK-Zellen mit und ohne H-1PV-Infektion und PBMCs**

Im dritten Schritt wurden die Zellkulturüberstände der Kokulturen aus KRK-Zellen (CMS-1: DLD-1, HCT-15; CMS-4: SW-480, CL-11) mit/ohne H-1PV-Infektion und PBMCs mittels ELISA analysiert. Parallel dazu wurden auch die Zellkulturüberstände der Monokulturen (PBMC, KRK) untersucht. Bestimmt wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-2, IFN- $\gamma$ ) und Granzym B.

### 4.3.1 TNF- $\alpha$

Im Vergleich zu den Monokulturen der vier KRK-Zelllinien zeigten die Kokulturen mit PBMCs tendenziell eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Sekretion. Die Überstände der CMS-4-Zelllinien wiesen leicht höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auf als die der CMS-1-Zelllinien. Die Werte der Kokulturen des CMS-4 bewegten sich oberhalb des Wertes der unstimulierten PBMC-Monokultur (siehe Abbildung 17).

Bei einer H-1PV-Infektion der KRK-Zelllinien war in allen Kokultur-Überständen eine tendenziell verstärkte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung erkennbar. Dabei bestand eine positive Korrelation zwischen der Infektionsstärke und dem Ausmaß der TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Während es bei einer Infektionsstärke von MOI 1 nur zu einem leichtem Anstieg der TNF- $\alpha$ -Werte kam, war die Zunahme bei einer Infektionsstärke von MOI 5 bei allen vier Zelllinien deutlicher. Die Werte in den CMS-4-Kokulturen lagen tendenziell höher als die Werte in den CMS-1-Kokulturen. Bei einer MOI von 5 überstiegen die Werte bei allen untersuchten Zelllinien die Werte in den Überständen der PBMC-Monokultur.

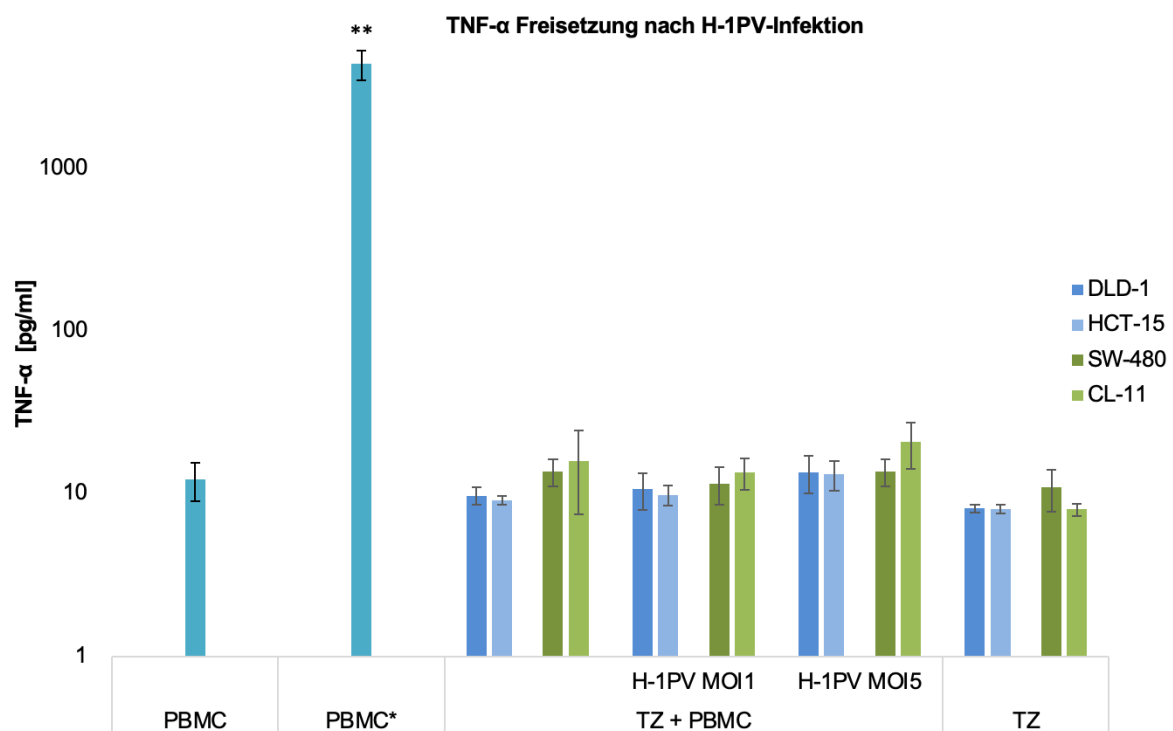


Abbildung 17: Nachweis von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.3.1 IL-10

In den Monokultur- und Kokultur-Überständen der CMS-1-Zelllinien DLD-1 und HCT-15 waren allenfalls geringe Mengen an IL-10 nachweisbar. Alle Werte lagen unter den Werten in der unstimulierten PBMC-Monokultur. In den Überständen der Mono- und Kokulturen der CMS-4-Zelllinien SW-480 und CL-11 war dagegen IL-10 messbar. Die Werte in den CMS-4-Monokulturen (SW-480: 134,95 pg/ml, CL-11: 120,20 pg/ml) und CMS-4-Kokulturen (SW-480: 133,99 pg/ml, CL-11: 122,30 pg/ml) waren vergleichbar (siehe Abbildung 18) und überstiegen deutlich den Messwert in der unstimulierten PBMC-Monokultur.

Bei einer H-1PV-Infektion der CMS-1-Zelllinien kam es zu einem leichten Anstieg der IL-10-Konzentration in den Überständen der Kokulturen (DLD-1: 3,32 pg/ml (MOI 1), 8,61 pg/ml (MOI 5); HCT-15: 0,97 pg/ml (MOI 1), 3,71 pg/ml (MOI 5)). Die Werte überstiegen nur zum Teil den Wert in den Überständen der unstimulierten PBMC-Monokultur. Zwischen der Infektionsstärke und der IL-10-Freisetzung bestand in den Kokultur-Ansätzen mit den CMS-1-Zelllinien näherungsweise eine positive Korrelation. Kokulturen mit HCT-15 zeigten jedoch durchgehend Werte < 5 pg/ml. Bei einer H-1PV-Infektion der CMS-4-Zelllinien verringerte sich die IL-10-Konzentration in den Überständen der Kokulturen in Abhängigkeit von der Infektionsstärke (SW-480: 133,99 pg/ml (ohne Infektion), 124,25 pg/ml (MOI 1), 119,52 pg/ml (MOI 5); CL-11: 122,30 pg/ml (ohne Infektion), 63,90 pg/ml (MOI 1), 31,26 pg/ml (MOI 5)). Der Abfall der IL-10-Konzentration war aber nur in den CL-11-Kokulturen signifikant (bei MOI 5 auf ein Viertel des Ausgangswerts). Die Ergebnisse belegen eine unterschiedliche Reaktion der CMS-1- und -4-Zelllinien in Bezug auf die IL-10-Ausschüttung nach einer H-1PV-Infektion.

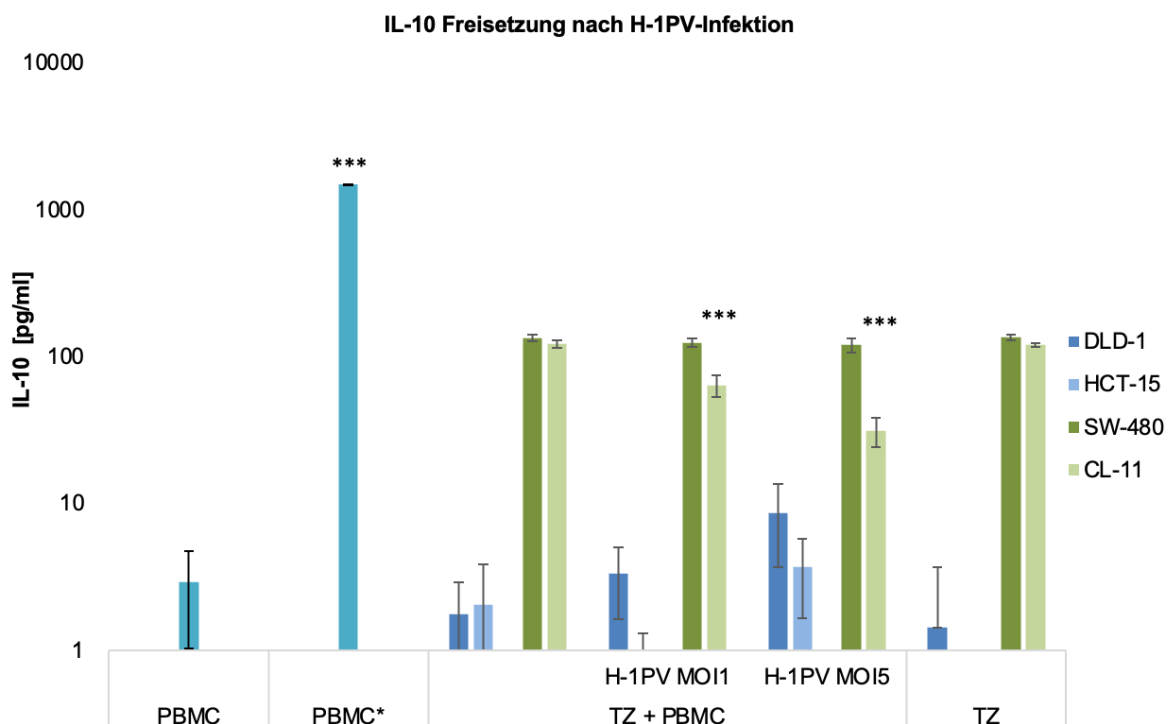


Abbildung 18: Nachweis von Interleukin 10 (IL-10) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.3.2 IL-2

Bei allen KRK-Zelllinien war in den Überständen der Kokulturen tendenziell mehr IL-2 nachweisbar als in den Überständen der Monokulturen. In den CMS-1-Kokulturen blieben die Werte jedoch unterhalb der Werte in den unstimulierten PBMC-Monokulturen. Dagegen zeigten die Überstände der CMS-4-Kokulturen etwas höheren IL-2-Werte, die die Werte in den unstimulierten PBMC-Monokulturen leicht überstiegen (siehe Abbildung 19).

Eine H-1PV-Infektion erhöhte bei allen vier KRK-Zelllinien die IL-2-Konzentration in den Kokultur-Überständen. Bei einer Infektionsstärke von MOI 5 war die Erhöhung der IL-2-Ausschüttung in allen Fällen signifikant (z. B. SW-480: 36,15 pg/ml (ohne Infektion), 37,84 pg/ml (MOI 1), 54,40 pg/ml (MOI 5)). Alle Werte lagen oberhalb der Werte in den unstimulierten PBMC-Monokulturen. Zwischen der Infektionsstärke und der IL-2-Freisetzung bestand bei allen vier KRK-Zelllinien tendenziell eine positive Korrelation.

Auch bei einer H-1PV-Infektion wiesen die CMS-4-Kokulturen im Vergleich zu den CMS-1-Kokulturen tendenziell eine höhere IL-2-Freisetzung auf. Jedoch wurden in den DLD-1-Kokulturen (CMS-1) mit 50,84 pg/ml bei MOI 5 ähnlich hohe Werte gemessen. Auch in den HCT-15-Kokulturen war ein Anstieg der IL-2-Konzentration nach einer H-1PV-Infektion zu beobachten. Insgesamt war das Niveau der IL-2-Freisetzung bei dieser Zelllinie jedoch am geringsten.

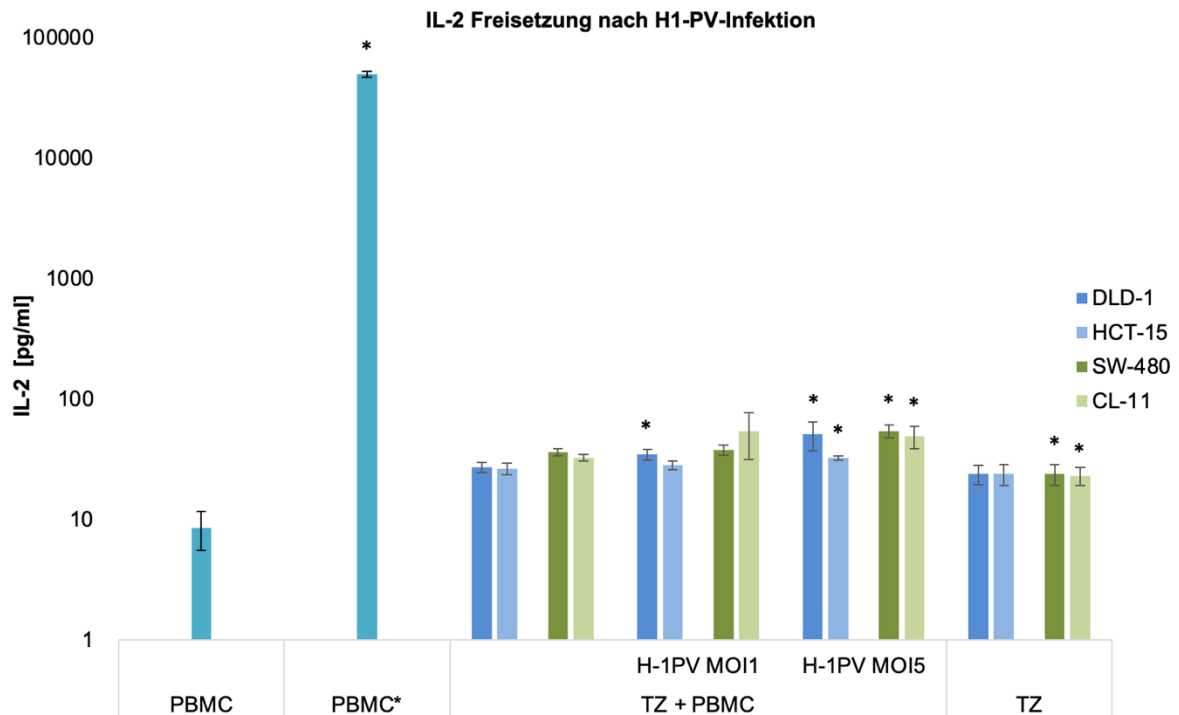


Abbildung 19: Nachweis von Interleukin 2 (IL-2) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

### 4.3.3 IFN- $\gamma$

Die IFN- $\gamma$ -Konzentration war in den Überständen der KRK-Monokulturen und KRK-Kokulturen vergleichbar. Auch zwischen den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen bestand bezüglich der IFN- $\gamma$ -Freisetzung kein Unterschied. Die Werte ähnelten dem Wert in den Überständen der unstimulierten PBMC-Monokulturen, lediglich die CL-11-Kokultur wies leicht höhere Werte auf (siehe Abbildung 20).

Eine H-1PV-Infektion erhöhte in den Kokulturen mit allen vier KRK-Zelllinien tendenziell die IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Bei der CMS-1-Zelllinie DLD-1 war diese Zunahme bei einer Infektionsstärke von MOI 5 signifikant (8,79 pg/ml (ohne Infektion), 11,13 pg/ml (MOI 1), 37,97 pg/ml (MOI 5)). In den Ansätzen mit der CMS-1-Zelllinie HCT-15 war tendenziell eine Zunahme zu erkennen (9,59 pg/ml (ohne Infektion), 15,12 pg/ml (MOI 5)). In den Ansätzen mit den CMS-4-Zelllinien SW-480 und CL-11 kam es bei einer Infektionsstärke von MOI 1 zu einer signifikanten Steigerung der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung.

Damit waren auch in den Ansätzen mit einer H-1PV-Infektion die Ergebnisse bezüglich der IFN- $\gamma$ -Sekretion für die vier KRK-Zelllinien vergleichbar. Die Werte lagen oberhalb der

Werte der nicht stimulierten PBMC-Monokultur. Es bestanden keine deutlichen Unterschiede zwischen CMS-1- und -4-Zelllinien. Mit steigender Infektionsstärke nahm die IFN- $\gamma$ -Freisetzung zu.

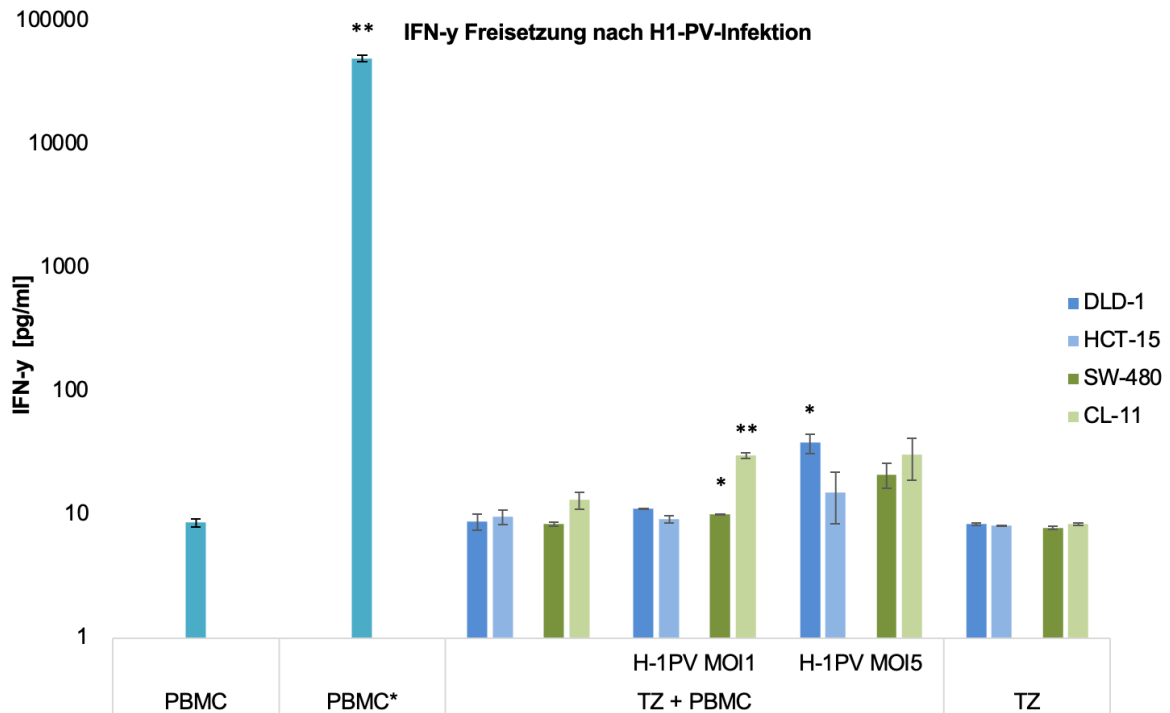


Abbildung 20: Nachweis von Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

#### 4.3.4 Granzym B

Die Überstände der Kokulturen aus PBMCs und den CMS-1-Zelllinien enthielten nur geringe Granzym B Mengen (DLD-1: 56,99 pg/ml; HCT-15: 53,09 pg/ml). Die Werte überstiegen aber anders als in den CMS-1-Monokulturen (DLD-1: 23,97 pg/ml; HCT-15: unter der Nachweisgrenze) die Werte in den Überständen der nicht stimulierten PBMC-Monokulturen (29,18 pg/ml). In den Ansätzen mit den CMS-4-Zelllinien enthielten die Überstände dagegen sowohl bei den Monokulturen (SW-480: 200,49 pg/ml, CL-11: 879,70 pg/ml) als auch bei den Kokulturen mit PBMCs (SW-480: 202,44 pg/ml, CL-11: 915,87 pg/ml) höhere Granzym B Konzentrationen (siehe Abbildung 21).

Auch die H-1PV-Infektion wirkte sich in den Ansätzen mit CMS-1- und -4-Zelllinien unterschiedlich aus. In den CMS-1-Kokulturen bzw. und SW-480-Kokulturen (CMS-4)

fürte eine H-1PV-Infektion tendenziell zu einer vermehrten Ausschüttung von Granzym B. Dieser Anstieg war bei einer MOI 5 signifikant. Die Werte überstiegen den Wert in der nicht stimulierten PBMC-Monokultur. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der Infektionsstärke und dem Ausmaß der Granzym B Freisetzung. Dagegen zeigten die Überstände der CL-11-Kokulturen (CMS-4) bei einer H-1PV-Infektion eine höchstsignifikante Abnahme der Granzym B Konzentration von 915,87 pg/ml (ohne Infektion) über 732,83 pg/ml (MOI 1) auf 661,93 pg/ml (MOI 5).

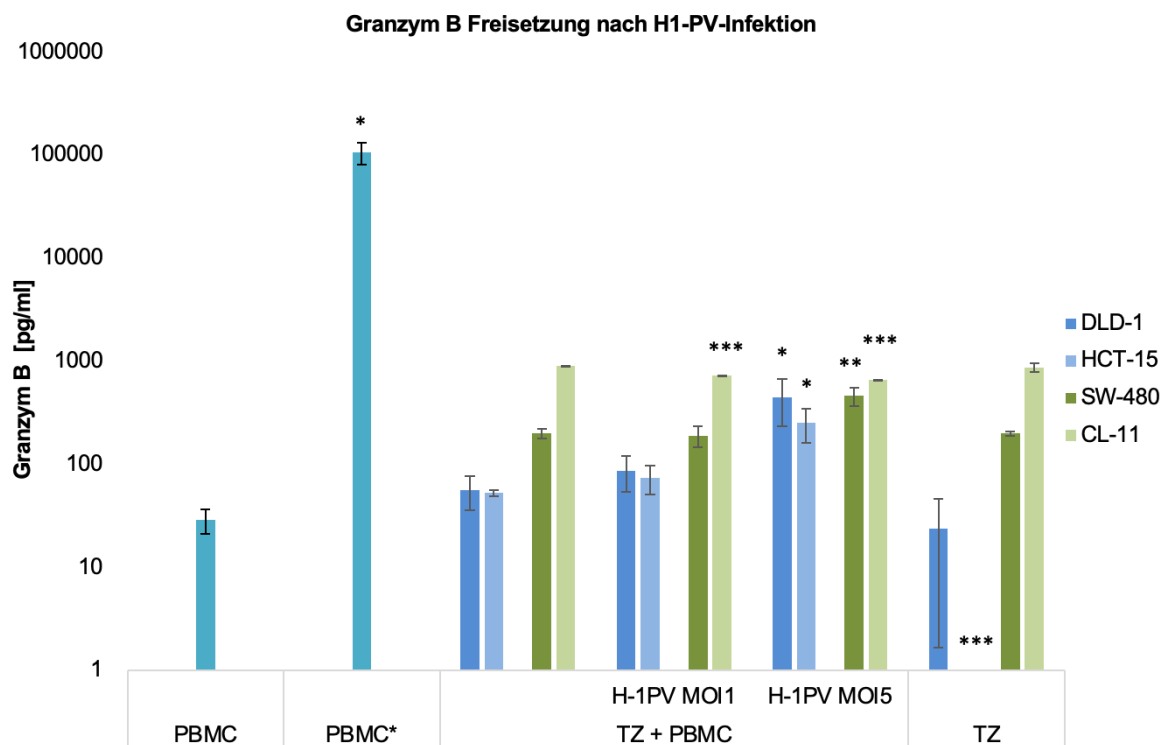


Abbildung 21: Nachweis von Granzym B in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Dargestellt sind die die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messreihen. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ , CMS = Consensus molecular subtype, MOI = Multiplicity of infection.

## 5 DISKUSSION

Das KRK zählt mit zu den häufigsten Tumorerkrankungen (12). Die variable Prognose bei an KRK erkrankten Patienten hängt unter anderem vom Tumorstadium, den Therapieoptionen und der körperlichen Verfassung des Patienten ab. Für eine valide Prognose und zur Optimierung der Therapie sind weitere Kriterien notwendig (1). Eine Möglichkeit ist die Einteilung des KRK in CMS. Weiter bietet das H-1PV die Chance, die KRK-Therapie ohne weitere kostenaufwendige Tumorcharakterisierungen auszuweiten (9, 41).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Zellviabilität von KRK-CMS-1- und -CMS-4-Zelllinien nach einer H-1PV-Infektion untersucht. Zur Analyse der Immunzellaktivierung durch eine H-1PV-Infektion wurden KRK-Zellen (mit und ohne Infektion) mit PBMCs kokultiviert. In diesen Ansätzen wurden Immunzell-Subpopulationen (FACS-Analyse) und die Zytokin-Produktion (ELISA) bestimmt.

Eine H-1PV-Infektion der KRK-CMS-1- und -CMS-4-Zelllinien zeigte Auswirkungen auf die Immunzell-Stimulation und Zytokin-Produktion in Kokulturen mit PBMCs.

### 5.1 Effekt der H-1PV-Infektion auf die Zellviabilität von KRK-CMS-1- und -4-Zelllinien

Die vorliegende Analyse bestätigt, dass eine Infektion von CMS-1- und CMS-4-KRK-Zellen mit H-1PV möglich ist. Bereits Moehler et al. zeigten, dass sich Tumorzellen (z. B. KRK-Zellen) mit dem H-1PV infizieren lassen (74, 75). Klinische Studien belegen die Sicherheit der Anwendung von H-1PV und zeigen, dass das Virus die Immunreaktion in der Tumormikroumgebung erhöht, was für seine mögliche Anwendung als ergänzendes Therapeutikum spricht (8, 55). Der antineoplastische Effekt der H-1PV-Infektion beruht nicht nur auf einer direkten onkolytischen Wirkung, sondern zusätzlich auf einer Stimulation der Immunantwort (76). Diese beiden Mechanismen werden in der vorliegenden Dissertation näher untersucht. Dabei wurde zunächst analysiert, ob sich das onkolytische Potenzial des H-1PV in CMS-1 und -4-Zelllinien unterscheidet. Solche Unterschiede könnten eine Selektion der Patienten erlauben, die von einer onkolytischen Therapie am meisten profitieren.

In den vorliegenden Experimenten führte eine H-1PV-Infektion MOI- und zeitabhängig zu einem Verlust der Zellviabilität von KRK-CMS-1- und -4-Zelllinien. Bereits 2013 wiesen Heinrich et al. eine MOI-abhängige Abnahme der Zellviabilität einiger kolorektaler Zelllinien nach H-1PV-Infektion im MTT-Assay nach (39). Diese Ergebnisse bestätigen den in der Literatur beschriebenen möglichen onkolytischen Effekt einer H-1PV-Infektion (54).

Das Ausmaß des Verlustes der Zellviabilität korrelierte mit der Infektionsdauer. Die onkolytische Wirkung des H-1PV ließ sich damit deutlich nachweisen. Durch seine Tumorselektivität eignet sich H-1PV zur Infektion von KRK-Zellen, da gesunde Körperzelle keinen Schaden nehmen (76).

Wie schon in der Studie von Heinrich et al. ließ sich über eine Steigerung der Infektionsstärke eine stärkere Reduktion der Tumorzellviabilität erzielen (39). Allerdings führte eine H-1PV-Infektion weder in den CMS-1- noch in den CMS-4-Zelllinien zu einem vollständigen Viabilitätsverlust. Laut Malerba et al. ist eine flächendeckende Infektion von KRK-Zellen mit dem H-1PV nur bedingt bei hohen Infektionsstärken und langen Expositionszeiten möglich. Da der onkolytische Effekt des H-1PV allein nicht ausreicht, um den Tumor zu bekämpfen, ist das Virus als Monotherapeutikum in Frage zu stellen (67, 77). Beim H-1PV induzierten Zelltod entstehen Tumorzelllysate, die als Antigene die körpereigene Abwehr aktivieren (69). Die H-1PV-induzierte Immunantwort könnte als weiterer Mechanismus bei der Therapie des KRK genutzt werden. In diesem Kontext sollte die Form des KRK-Zelltods analysiert und seine Abhängigkeit von der Immunreaktion untersucht werden (74, 78). Laut Moehler et al. dominiert bei einer H-1PV-Infektion der apoptotische Zelltod (54, 74). Damit eignet sich H-1PV potenziell als ergänzendes Therapeutikum zur Induktion der Apoptose und Zellviabilitätsminderung bei KRK-Zellen.

Die CMS-1-Zelllinien DLD-1 und HCT-15 zeigten nach H-1PV-Infektion eine geringe, im Falle von DLD-1 jedoch überwiegend signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität. Bei der Zelllinie HCT-15 wurde die Viabilität am wenigsten beeinträchtigt. Die tendenzielle Korrelation zwischen der Zunahme der Infektionsdauer und der Abnahme der Stoffwechselaktivität war geringer ausgeprägt als bei den CMS-4-Zelllinien.

Die CMS-4-Zelllinien SW-480 und CL-11 wiesen eine signifikant reduzierte Zellviabilität nach der H1-PV-Infektion auf. Es bestand eine deutliche Korrelation der Infektionsstärke mit der Ausprägung der Stoffwechsellminderung. In beiden Zelllinien führte eine Zunahme der Infektionsdauer zu einer signifikanten Minderung der Stoffwechselaktivität.

Verschiedene Charakteristika der KRK-Zellen könnten die erhöhte Suszeptibilität des CMS-4 im Vergleich zum CMS-1 gegenüber dem onkolytischen Effekt einer H-1PV-Infektion erklären, andere stehen jedoch im Widerspruch dazu.

CMS-4-Tumoren sind durch eine hohe Infiltration von immunsuppressiven Zellen gekennzeichnet, die bei einer H-1PV-Infektion möglicherweise die antivirale Immunantwort

hemmen. Während in der Tumormikroumgebung beim CMS-1  $T_H$ -1-Zellen und T-Zell-bezogene Chemokine dominieren, finden sich beim CMS-4 vermehrt Komponenten des Komplementsystems, angiogenetische Faktoren und immunsuppressive Faktoren (4, 19). Die onkolytische Wirkung des H-1PV beruht unter anderem auf der Induktion von oxidativem Stress (63). Möglicherweise verfügen CMS-1-Tumorzellen vermehrt über antioxidative Mechanismen und können so dem durch H-1PV induzierten Stress und somit der Onkotoxizität entgehen (5).

Auch die Effektivität der Infektion könnte das onkolytische Potenzial beeinflussen. Laut Marchini et al. wird die Zellanhaftung und der Zelleintritt von H-1PV durch Laminine mit einer  $\gamma$ 1-Kette moduliert (79). Tumorzellen, die mehr solche Laminine enthalten, reagieren empfindlicher auf eine H-1PV Infektion (79). Möglicherweise unterscheidet sich die extrazelluläre Matrix zwischen CMS-1- und CMS-4-KRK-Zellen hinsichtlich des Vorkommens von Lamininen mit  $\gamma$ 1-Kette. Zur Überprüfung dieser These wären Untersuchungen der Extrazellulärmatrix der CMS notwendig.

Der Zelleintritt von H-1PV erfolgt über eine Bindung des Virus an einen spezifischen Rezeptor auf der Zellmembran und anschließender Clathrin-vermittelter Endozytose (60, 80). Auffällig ist, dass durch die Ausschaltung von Caveolin-1 die H-1PV-Aufnahme gesteigert werden kann (60). Für den Zelleintritt von H-1PV sind Dynamin und ein saurer pH-Wert erforderlich (60). Damit könnten auch Unterschiede beim pH-Wert bzw. dem Vorkommen von Dynamin oder Caveolin-1 das unterschiedliche Ausmaß der Viabilitätsabnahme nach einer H-1PV-Infektion bei den KRK-CMS-1- und -4-Zelllinien erklären. Zur Abklärung dieser These sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## **5.2 Effekt der KRK-Zellen auf die Entwicklung von Immunzell-Subpopulationen (Kokultur-Versuche)**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Kokulturen aus Tumorzellen und Immunzellen gesunder Spender analysiert. Dieses Vorgehen erlaubte den Vergleich des Effektes von nicht infizierten und mit H-1PV-infizierten Tumorzellen auf die PBMCs. Bei der Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen spielten sowohl direkte als auch indirekte (z. B. über Zytokine) Kontakte eine Rolle. Die Ergebnisse der Kokulturen wurden mit den Ergebnissen der Tumorzell- und PBMC-Monokulturen verglichen.

### **5.2.1 Einfluss von KRK-Zellen auf die Immunzell-Ausreifung (FACS-Analyse)**

Da die Tumormikroumgebung eine entscheidende Rolle für die Prognose und Therapieoptionen spielt, wurde in verschiedenen Studien der Einfluss von Tumorzellen, u.a.

KRK-Zellen, auf Immunzellen analysiert (81, 82, 83, 84). Dabei wurde eine Infiltration von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, Tregs, B-Zellen und NK-Zellen in die Tumormikroumgebung nachgewiesen (33).

Der Nachweis einer erhöhten Anzahl von T<sub>H</sub>-Zellen und CTLs im Tumorgewebe belegt die mögliche Immunogenität des KRK (85). Laut Pagès et al. ist eine T-Zellreaktion beim KRK mit einer verminderten Metastasierung und einer besseren Prognose assoziiert (83). Die Zusammensetzung der Immunzellen in der Tumormikroumgebung kann somit die Prognose entscheidend beeinflussen (81). Zur Optimierung der Therapie des KRK ist es wichtig, die Interaktionen der Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung und insbesondere mit beteiligten Immunzellen zu verstehen (86). Laut Becht et al. unterscheidet sich die Immunzellinfiltration in den CMS des KRK (20). Dabei zeigten CMS-1 und -4 die deutlichsten Immunreaktionen (20).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Effekt der CMS-1-Zelllinien DLD-1 und HCT-15 sowie der CMS-4-Zelllinien SW-480 und CL-11 auf die Entwicklung der Subpopulationen der PBMCs mittels FACS-Analyse untersucht. Dazu wurden die Anteile der Immunzell-Subpopulationen in den Kokulturen mit den Anteilen in PBMC-Monokulturen verglichen.

Laut Literatur sind CMS-1 und -4 durch eine vermehrte Immunzellinfiltration charakterisiert (4, 11, 81). Becht et al. wiesen ein hohes Vorkommen von CTL und NK-Zellen im CMS-1 nach (20).

In der vorliegenden Analyse fiel auf, dass die Kokulturen mit CMS-4 im Vergleich zu den Kokulturen mit CMS-1 tendenziell einen höheren Anteil an aktivierten Tregs sowie NK-Zellen aufwiesen. Im Vergleich zur PBMC-Monokultur waren in den SW-480-Kokulturen insbesondere die Anteile von NK-Zellen und ausgereiften NK-T-Zellen erhöht, die Anteile aktivierter T-Helferzellen waren bei beiden CMS vergleichbar. Dieser Befund weicht zum Teil von den Erwartungen ab. Laut Guinney et al. ist besonders der CMS-1 durch das Vorkommen von T<sub>H</sub>-1-Zellen und CTLs geprägt, während beim CMS-4 eine Stromainvasion, mesenchymale Aktivierung und Aktivierung des Komplementsystems dominieren(4).

Laut Galon und Bindea et al. ist eine Infiltration des Tumorgewebes mit T<sub>H</sub>-1-Zellen und CTLs mit einem besseren Outcome assoziiert (82, 87). In anderen Studien war der CMS-4 beim nicht metastasierten KRK mit der schlechtesten Prognose assoziiert (88). Für diese widersprüchlichen Befunde – schlechtes Outcome bei zum Teil prognostisch günstiger bzw. vergleichbaren Immunzell-Konstellationen in der Tumormikroumgebung – gibt es verschiedene Erklärungsansätze, für die eine genauere Analyse der Immunzell-Subpopulationen erforderlich ist.

### **(Aktivierte) Tregs**

Die häufig im Blut tumorerkrankter Patienten sowie in der Tumormikroumgebung nachweisbaren Tregs können eine Antitumor-Immunantwort unterdrücken, indem sie die Proliferation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und deren Produktion zytolytischer Granula hemmen. Jedoch ist auch ein Anti-Tumor-Effekt der Tregs denkbar (89). Bei der CMS-Klassifizierung des KRK wurde der CMS-4 durch ein vermehrtes Auftreten von Tregs charakterisiert (3). In der vorliegenden Untersuchung waren die Treg-Anteile in den Kokulturen bei beiden CMS-Gruppen vergleichbar. Insbesondere in den Kokulturen mit DLD-1 (CMS-1) und SW-480 (CMS-4) waren die Treg-Anteile im Vergleich zu den Treg-Anteilen in den PBMC-Monokulturen erhöht. Dagegen zeigten CMS-4-Kokulturen im Vergleich zu CMS-1-Kokulturen und zu PBMC-Monokulturen deutlich erhöhte Anteile an aktivierten Tregs und NK-Zellen. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen. Bei Bindea et al. wiesen Patienten mit einem schlechteren Outcome vermehrt NK-Zellen und Tregs in der Tumormikroumgebung auf (87). Auch Li et al. fanden ein höheres Vorkommen von Tregs und aktivierten NK-Zellen bei Patienten mit höherem Risiko (90). Möglicherweise ist bei einem vermehrten Vorkommen von Tregs die Antitumor-Immunantwort weniger effektiv (27, 30). Dennoch ist der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Präsenz von Tregs beim KRK und der Prognose umstritten. Anders als die oben erwähnten Autoren fanden Lodenkemper et al. keinen Effekt der Tregs auf das Outcome des KRK (91). In verschiedenen Studien waren höhere Treg-Anteile mit einem besseren (krankheitsfreien) Überleben assoziiert (31, 92). Laut Kuwahara et al. hat das Vorkommen von aktivierten Tregs in der Tumormikroumgebung einen positiven Effekt (93). Eine hohe Dichte von Tregs war dabei einerseits mit einem verlängerten remissionsfreien Überleben sowie einem verbesserten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert, andererseits stand eine verminderte Dichte von Tregs mit einer sehr schlechten Prognose in Zusammenhang (93). Mögliche Erklärungen für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind das Vorhandensein unterschiedlicher Treg-Subtypen. Beispielsweise könnten non-Tregs (Fraktion der Tregs) durch ihre Eigenschaften (z. B. Produktion pro-inflammatorischer Zytokine) zur verbesserten Prognose beitragen (27, 28, 94).

### **Aktivierte T<sub>H</sub>-Zellen**

Weiter zeigten in der vorliegenden Studie die CMS-4-Kokulturen im Vergleich zu den CMS-1-Kokulturen vergleichbare bis geringfügig höhere Anteile an aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen. Jedoch lagen die Werte im Bereich der Werte der PBMC-Monokulturen, was gegen einen aktivierenden Effekt der KRK-Zellen spricht. Dieser Befund entsprach nicht den Erwartungen, da in vorherigen Untersuchungen insbesondere der CMS-1 durch das Vorhandensein von CD4<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>-Zellen (T<sub>H</sub>-1) charakterisiert wurde (3).

Auch die Rolle der T<sub>H</sub>-Zellen im Kontext von Tumorerkrankungen ist nicht vollständig verstanden. Ein hoher Anteil von T<sub>H</sub>-1-Zellen im Rahmen einer Tumorerkrankung wird als prognostisch günstig bewertet (34). Dagegen ist das Vorkommen von T<sub>H</sub>-17-Zellen bzw. T<sub>H</sub>-2-Zellen mit einer schlechteren Prognose assoziiert (6, 34, 92). Zur Beurteilung der Bedeutung der T<sub>H</sub>-Zellinfiltration in die Tumormikroumgebung für die Prognose und das Outcome sind somit weitere Untersuchungen erforderlich.

Das schlechte Outcome beim KRK-CMS-4 könnte auch auf eine stromale Infiltration und auf TGF- $\beta$ -Signalen beruhen, die den CMS-4 deutlich von anderen CMS unterscheidet (19). Becht et al. machten insbesondere die inflammatorische Komponente des CMS-4 für die ungünstige Prognose verantwortlich (20).

### **(Aktivierte) CTL**

CTLs spielen bei der gegen Karzinomzellen gerichteten Immunabwehr eine entscheidende Rolle (44). CTLs erkennen tumorassoziierte Antigene (TAAs) und können die Tumorzellen durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen angreifen (44). Das Vorkommen von CTLs in der Tumormikroumgebung ist mit einer günstigen Prognose assoziiert (34, 91, 92). Sowohl beim CMS-1 als auch beim CMS-4 lassen sich CTLs in der Tumormikroumgebung nachweisen (20).

Entgegen den Erwartungen waren in der vorliegenden Studie in den CMS-1- und -4-Kokulturen im Vergleich zu den PBMC-Monokulturen keine erhöhten aktivierten CTL-Anteile nachweisbar.

Das erhöhte Vorkommen von CTLs in der Tumormikroumgebung bei KRK mit Mikrosatelliteninstabilität beruht möglicherweise auf der Erzeugung von Peptiden durch die genetische Instabilität (95, 96). Die Mikrosatelliteninstabilität ist ein Charakteristikum des CMS-1. Daher wäre in der vorliegenden Studie in den CMS-1-Kokulturen ein Effekt auf die aktivierten CTL-Anteile zu erwarten gewesen. Weiter sollten in den Kokulturen des mit einer schlechteren Prognose assoziierten CMS-4 die Anteile der als prognostisch günstig eingestuftten aktivierten CTL geringer sein als in den CMS-1-Kokulturen. Möglicherweise hat in diesem Kontext jedoch auch die Beziehung von Tregs zu den CTLs zur schlechteren Prognose des CMS-4 beitragen (97).

Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass die Hochregulierung vonIDO-1 und PD-L1 als auch die Rekrutierung von Tregs von einer CTL-vermittelten IFN- $\gamma$ -Ausschüttung abhängig sind (98, 99). In diesem Fall wäre ein vermehrtes Auftreten von CTL beim prognostisch ungünstigeren CMS-4 eine logische Konsequenz und als Teil des Tumor Escape Mechanismus zu werten.

### **(Aktivierte) NK-Zellen**

Auch NK-Zellen sind entscheidend an der Antitumor-Immunantwort beteiligt (38, 68). Laut Bhat et al. können durch IL-2 aktivierte NK-Zellen KRK-Zellen eliminieren (68). Während bei Bindea et al. eine höhere NK-Infiltration mit einer schlechteren Prognose assoziiert war, war bei Angelova et al. eine verstärkte NK-Zellinfiltration tendenziell mit einer besseren Prognose verbunden (6, 87).

In der vorliegenden Studie lag der Anteil der NK-Zellen in den CMS-4-Kokulturen im Vergleich zu den PBMC-Monokulturen tendenziell höher. Jedoch wiesen tendenziell nur die SW-480-Zellen eine Maturierung auf. Dieser Befund passt zu Untersuchungen an anderen Karzinomen, wonach NK-Zellen in der Tumorumgebung häufig einen anergen Zustand aufweisen (34). Der teilweise anerge Zustand der NK-Zellen könnte die unsichere Korrelation mit der Prognose erklären (29). In der vorliegenden Studie lag der Anteil ausgereifter NK-Zellen in den SW-480-Kokulturen (CMS-4) bei ca. 87 %. Möglicherweise spielen ausgereifte NK-Zellen auch als tumorfördernde Elemente eine Rolle (100, 101).

### **(Ausgereifte) NK-T-Zellen**

Entgegen den Erwartungen lagen in der vorliegenden Forschungsarbeit die Anteile der NK-T-Zellen in den KRK-Kokulturen unterhalb der Werte in den PBMC-Monokulturen. In der Studie von Tachibana et al. waren in der Umgebung von KRK-Zellen im Vergleich zur Umgebung gesunder kolorektaler Zellen vermehrt NK-T-Zellen nachweisbar (35). Die NK-T-Zellen befanden sich zudem überwiegend in einem aktivierten Zustand. Patienten mit einem höheren Vorkommen von NK-T-Zellen wiesen eine bessere Prognose auf (35). Auch in der vorliegenden Studie betrug der Anteil der ausgereiften NK-T-Zellen in den SW-480-Kokulturen ca. 79 %. Die Rolle der NK-T-Zellen in der Tumorbekämpfung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass NK-T-Zellen zur Antitumor-Reaktion beitragen (102). Laut Tenerabe et al. unterdrücken NK-T-Zellen aber durch die Produktion von IL-13 und TGF- $\beta$  die Antitumor-Antwort (103).

Zusammenfassend bestätigten die vorliegenden Untersuchungen den Effekt von KRK-CMS-1- und -4-Zellen auf das Immunsystem (3). Die im Rahmen eines Immunoscorings nachgewiesenen Unterschiede bei der Immunzell-Infiltration von Tumoren können die Prognose entscheidend beeinflussen (84).

Der im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit nachgewiesene Effekt der KRK-Tumorzellen auf die Immunzell-Differenzierungen passt aber nur zum Teil zu bisherigen Literaturbefunden. Dienstmann et al. charakterisieren den CMS-1 als „stark immunogenen“ Phänotyp, der durch eine hohe Mikrosatelliten-Instabilität, eine vermehrte Expression von Immuncheckpoint-Proteinen sowie durch eine Infiltration mit T<sub>H</sub>-1-Zellen, NK-Zellen und

CTLs gekennzeichnet ist (3). In der vorliegenden Arbeit beeinflussten die CMS-1-Tumorzellen die Anteile der Immunzell-Subpopulationen im Kokultur-Versuch jedoch kaum. Der „entzündliche“ CMS-4-Phänotyp ist laut Dienstmann et al. durch eine Infiltration mit Tregs, MDSCs und T<sub>H-17</sub>-Zellen gekennzeichnet (3). In der vorliegenden Arbeit waren dazu passend in den CMS-4-Kokulturen vermehrt aktivierte Tregs nachweisbar. Zusätzlich traten aber auch die eigentlich für CMS-1 charakteristischen NK-Zellen in den CMS-4-Kokulturen, vermehrt auf. Das widersprüchliche Bild des CMS-4 entspricht den Befunden vorheriger Untersuchungen (81). Eine mögliche Ähnlichkeit der Immunkomponenten beim CMS-4 und CMS-1 ist bemerkenswert. Laut Roeland et al. bietet ein Immunoswitch die Chance, CMS-4-Tumoren in Richtung „CMS-1-ähnliche“ Tumoren mit besserem Therapieansprechen umzuwandeln und so CMS-4-Tumoren erfolgreicher behandeln zu können (19).

Weiter zeigten in der vorliegenden Studie der CMS-1 und CMS-4 einen unterschiedlichen Effekt auf Immunzellen. In den CMS-4-Kokulturen waren im Vergleich zu den CMS-1-Kokulturen die Anteile an NK-Zellen, ausgereiften NK-Zellen, ausgereiften NK-T-Zellen und aktivierten Tregs erhöht.

Die Immunzell-Befunde der vorliegenden Forschungsarbeit wichen damit von den erwarteten CMS-Charakteristika ab. Der Anteil der Tregs war lediglich in den Kokulturen mit DLD-1 (CMS-1) und SW-480 (CMS-4) im Vergleich zur PBMC-Monokultur erhöht. Dieses inhomogene Bild innerhalb der CMS widerspricht der Charakterisierung von Guinney et al. (3, 4). Die Anteile ausgereifter NK-Zellen und NK-T-Zellen waren nur in den SW-480-Kokulturen tendenziell erhöht, während die Kokultur mit der anderen CMS-4-Zelllinie CL-11 ähnliche niedrige Werte aufwies wie die CMS-1-Kokulturen. Auch hier wäre ein vergleichbarer Effekt in den CMS-4-Kokulturen zu erwarten gewesen.

Auffällig war, dass zwischen den HCT-15-Kokulturen und den PBMC-Monokulturen die geringsten Differenzen auftraten. Dieser Befund deutet auf eine geringere Immunogenität dieser CMS-1-Zelllinie hin, was der Definition des CMS-1 widerspricht (3). Daher sollte in zukünftigen Analysen, geklärt werden, ob aus therapeutischer Sicht ein Immunoswitch hin zu einem „CMS-1-ähnlichem“ Bild erstrebenswert ist. Sowohl CMS-1- als auch CMS-4-Zellen scheinen eine Immunkomponente aufzuweisen, was eine gute Voraussetzung für Immuntherapien bietet. Aufgrund der Bedeutung der Tumormikroumgebung für die Prognose und die Therapieoptionen könnte die CMS-Klassifikation und eine detaillierte Analyse des Effekts der Tumorzellen auf Immunzellen in Zukunft die Charakterisierung von KRK über die TNM-Klassifikation hinaus, ergänzen (88). Für eine vollständige Betrachtung ist jedoch auch die Analyse der Immunzellinfiltration beim CMS-2 und CMS-3 notwendig.

### **5.2.2 Einfluss einer H-1PV-Infektion der KRK-Zellen auf die Ausreifung von Immunzellen**

Da eine H-1PV-Infektion von KRK-Zellen die Antitumor-Immunreaktion durch Zytokin-Sekretion und Immunzell-Aktivierung verstärkt, lässt sich eine solche Infektion möglicherweise therapeutisch einsetzen (75).

Die vorliegende Analyse der Kokulturen aus PBMCs und KRK-Zellen nach H-1PV-Infektion ergab für die CMS-1 und CMS-4 nur teilweise unterschiedliche Ergebnisse.

#### **(Aktivierte) Tregs**

Vergleichbar mit den Befunden vorangegangener Studien hatte eine H-1PV-Infektion in den Kokulturen beider Subtypen keinen Einfluss auf den Treg-Anteil (64). Dagegen fanden Goepfert et al. eine leichte Abnahme der Tregs nach der Infektion von humanen Melanomzellen mit dem H-1PV (25).

Abweichend von Vorbefunden wiesen die Kokulturen fast aller Zelllinien nach H-1PV-Infektion einen erhöhten Anteil aktivierter Tregs auf; dieser Effekt war in den CMS-4-Kokulturen stärker als in den CMS-1-Kokulturen. Laut Moralès et al. hat eine H-1PV-Infektion keine vermehrte Aktivierung von Tregs zur Folge, sondern hemmt vielmehr die immunsuppressive Wirkung von Tregs (64). Eine mögliche Aktivierung der Tregs im Rahmen der Immuninduktion durch eine H-1PV-Infektion könnte den Antitumor-Effekt verringern.

#### **Aktivierte T<sub>H</sub>-Zellen**

Der Anteil der aktivierten T<sub>H</sub>-Zellen erhöhte sich in den CMS-4-Kokulturen und in den DLD-1-Kokulturen (CMS-1) nach H-1PV-Infektion signifikant; die Kokulturen aller Zelllinien erzielten höhere Werte als die PBMC-Monokulturen. In den CMS-4-Kokulturen war der Anstieg tendenziell größer als in den CMS-1-Kokulturen. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von Moehler et al., die in Kokultur-Versuchen eine Aktivierung von Makrophagen und T<sub>H</sub>-1-Zellen nach einer H-1PV-Infektion fanden (7). Bei Grekova et al. führte die Infektion von PBMC-Monokulturen zu einem Anstieg von CD3+-Lymphozyten und insbesondere der CD4+-Population (104). In der Studie von Moralès et al. hatte eine H-1PV-Infektion eine Stimulation von CD4+-Zellen und eine vermehrte Freisetzung von T<sub>H</sub>-1 und T<sub>H</sub>-2 Zytokinen (z. B. IL-2, IFN- $\gamma$ ) zur Folge (64).

#### **(Aktivierte) CTL**

In der vorliegenden Arbeit nahm der Anteil der aktivierten CTLs nach der H-1PV-Infektion in den Kokulturen beider CMS tendenziell zu, jedoch wurden nur in den CMS-4-Kokulturen die Werte in den PBMC-Monokulturen überschritten. Auch Moehler et al. zeigten, dass die

Antigen-Präsentation in Tumorzell-Lysaten bei einer H-1PV-Infektion die CTL-Aktivierung und -reifung induziert (69). Der bei einer H-1PV-Infektion überwiegende apoptotische Zelltod erklärt die deutliche Reaktion der CTLs (74, 78, 105).

### **(Ausgereifte) NK-Zellen**

In der Literatur ist das Vorkommen von NK-Zellen in der Tumormikroumgebung, u.a. des KRKs, zum Teil mit einer besseren Prognose assoziiert (19, 87). Die Befunde der vorliegenden Arbeit bezüglich des Anteils der NK-Zellen in den Kokulturen nach H-1PV-Infektion sollten aufgrund der fehlenden Signifikanz zurückhaltend interpretiert werden. In den CMS-1-Kokulturen stieg nach der H-1PV-Infektion der Anteil der NK-Zellen an, wobei keine Ausreifung der NK-Zellen erkennbar war. In den CMS-4-Kokulturen nahm unter diesen Bedingungen der Anteil der NK-Zellen tendenziell ab, wobei in den SW-480-Kokulturen der Anteil der maturierten NK-Zellen konstant blieb. Diese unterschiedliche Reaktion der NK-Zellen bei CMS-1 und -4-Tumorzellen lässt Raum für Diskussion und erfordert weitergehende Analysen.

NK-Zellen können zur Tumorbekämpfung beitragen (33). Laut Bhat et al. hat eine H-1PV-Infektion bei Tumorzellen eine vermehrte Aktivierung von NK-Zellen zur Folge, die die Tumorzellen angreifen (68, 106). Die Stimulation der NK-Zellen beruht auf der verminderten Expression von MHC-Molekülen und der verstärkten Expression NK-aktivierender Liganden (106).

In den vorliegenden FACS-Analysen zeigten die NK-Zellen in den CMS-1-Kokulturen nach H-1PV-Infektion tendenziell keine deutliche Maturierung, während in den SW-480-Kokulturen (CMS-4) ein gleichbleibender Anteil an ausgereiften NK-Zellen auftrat, sodass hier kein Rückschluss auf eine Auswirkung der H-1PV-Infektion möglich ist.

Hinweise in der Literatur lassen vermuten, dass insbesondere unreife NK-Zellen in der Tumormikroumgebung prognostisch günstige Effekte haben und die Antitumor-Immunantwort unterstützen (33). Die Kokulturen mit der prognostisch ungünstigeren CMS-4-Zelllinie SW-480 wiesen dazu passend einen hohen Anteil an ausgereiften NK-Zellen auf. Ausgereifte NK-Zellen können möglicherweise durch die Expression von PD1-Rezeptoren das Tumorwachstum unterstützen (33, 100, 101). Die Rolle der (ausgereiften) NK-Zellen nach einer H-1PV-Infektion von KRK-Tumorzellen (insbesondere CMS-4) sollte weiter untersucht werden.

### **(Ausgereifte) NK-T-Zellen**

In der vorliegenden Untersuchung zeigten insbesondere CL-11-Kokulturen (CMS-4) nach H-1PV-Infektion einen tendenziellen Anstieg des Anteils der NK-T-Zellen auf Werte über denen in der PBMC-Monokultur. Auch die Analyse der Differenzierung der NK-T-Zellen

ergab Unterschiede bei den Kokulturen mit den verschiedenen Zelllinien. Während die Ausreifung von NK-T-Zellen in den CMS-1-Kokulturen und den CL-11-Kokulturen (CMS-4) nicht wesentlich beeinflusst wurde, zeigten die SW-480-Kokulturen (CMS-4) einen tendenziell steigenden Anteil an ausgereiften NK-T-Zellen mit steigender Infektionsstärke. Ein höherer Anteil an ausgereiften NK-T-Zellen bei dem prognostisch ungünstigeren CMS-4 ist vor dem Hintergrund interessant, dass in der Literatur das vermehrte Vorkommen von NK-T-Zellen in der Tumormikroumgebung als prognostisch günstig gewertet wird (35). Möglicherweise lässt sich die Maturierung von NK-T-Zellen in den SW-480-Kokulturen auf die vermehrten entzündlichen Aktivitäten zurückführen, die den CMS-4 kennzeichnen (11). Weitere Studien sollten klären, ob die Tendenz zu einer NK-T-Zellaktivierung beim CMS-4 nach einer H-1PV-Infektion als Parameter der Antitumor-Immunantwort zu werten ist (35).

Bei der Interpretation der Befunde sollte die Genauigkeit der für die Subpopulationen verwendeten Oberflächenmarker kritisch überprüft werden (107, 108).

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine Infektion von KRK-Zellen mit dem H-1PV zu einer Veränderung der Immunzell-Subpopulationen in der Tumormikroumgebung führt. Dabei zeigten CMS-1- und -4-KRK-Zellen unterschiedliche Reaktionen und Effekte. Der Befund, dass sowohl der CMS-1 als auch der CMS-4 eine immunologische Komponente besitzen, konnte bestätigt werden (11). Insgesamt deuten die Befunde darauf hin, dass H-1PV die Tumormikroumgebung von einer immunologisch „kalten“ Umgebung hin zu einer immunologisch „heißen“ Umgebung modulieren kann. Die verstärkte „Sichtbarkeit“ des Tumors erhöht die Immunzellaktivität (5). In der vorliegenden Untersuchung erhöhte eine H-1PV-Infektion in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen den Anteil aktivierter  $T_H$ -Zellen. Weiter kam es vereinzelt in den CMS-4-Kokulturen zu einer tendenziellen Erhöhung von NK-T-Zellen (CL-11) und ausgereiften NK-T-Zellen (SW-480) nach der H-1PV-Infektion. In DLD-1-Kokulturen (CMS-1) nahm der Anteil an NK-Zellen nach H-1PV-Infektion zu, während er in den SW-480-Kokulturen (CMS-4) abnahm. Zusammenfassend erhöhte sich die immunologische Aktivität in den Kokulturen durch die H-1PV-Infektion. In den Kokulturen (Ausnahme HCT-15) nahm auch der Anteil aktivierter Tregs nach der H-1PV-Infektion zu. Ob dieser Effekt die immunologische Aktivität in der Tumormikroumgebung fördert oder senkt, müssen weitere Studien zeigen.

### **5.3 Zytokin-Produktion in den Kokultur-Versuchen**

#### **5.3.1 Zytokin-Produktion ohne H-1PV-Infektion**

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, Granzym B und IL-10 in den Kokulturen aus KRK-Zellen und PBMCs sowie in KRK-Zell- und PBMC-Monokulturen mittels ELISA analysiert.

Laut Becht et al. ist der CMS-1 durch eine pro-inflammatorische Zytokin-Sekretion charakterisiert (20). CTLs sezernieren immunmodulatorische Zytokine (z. B. IL-2, IFN- $\gamma$ ), die die Proliferation und Differenzierung von CTLs unterstützen (36, 109). Die Zytokin-Konzentration lässt Rückschlüsse auf die Art, Menge und Aktivierung der tumorinfiltrierenden Immunzellen zu. Als Immunmodulator stimuliert IFN- $\gamma$  die Antigen-Präsentation, die Zytokin-Produktion sowie die Phagozytose (36). IFN- $\gamma$  und IL-2 werden vor allem durch T<sub>H</sub>-1-Zellen, aber auch durch CTLs, NK- und NK-T-Zellen produziert (38, 109, 110). Die vergleichbaren IFN- $\gamma$ - und IL-2-Konzentrationen in den Kokulturen und in den PBMC-Monokulturen in der vorliegenden Studie passen zu den vergleichbaren Anteilen aktivierter T<sub>H</sub>-Zellen in den Kokulturen und in den PBMC-Monokulturen. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Charakterisierung des CMS-1 von Dienstmann et al., wonach dieser Subtyp durch die Infiltration mit T<sub>H</sub>-1-Zellen gekennzeichnet ist (3).

IFN- $\gamma$  und IL-2 beeinflussen die Expression der Checkpoints PD-L1, CTLA-4 und IDO-1 und könnten somit von Karzinomzellen dafür genutzt werden, dem Immunsystem zu entkommen (33, 38, 99). Je nach Aktivierungsstatus könnten CTL in der Tumormikroumgebung daher tumorprotektiv oder tumorfördernd wirken (98, 99). Beispielsweise zeigten Moreno et al., dass IFN- $\gamma$  zur Antitumor-Immunreaktion beiträgt (102).

Dem Zytokin IL-2 wird in der Literatur eine Antitumor-Wirkung zugeschrieben (106) Laut Bhat et al. führt die Aktivierung von NK-Zellen durch IL-2 zur Abtötung von KRC-Zellen (68). Dabei korreliert der Anstieg von NK-Zellen mit der IL-2-Sekretion (38). Auch in der vorliegenden Studie zeigten insbesondere CMS-4-Kokulturen höhere IL-2- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen als PBMC-Monokulturen, was zu dem tendenziell vermehrten Vorkommen von NK-Zellen und ausgereiften NK-T-Zellen in den CMS-4-Kokulturen passte.

Die Freisetzung von TNF- $\alpha$  kann über die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CTL, NK-Zellen und NK-T-Zellen eine Antitumor-Immunantwort bewirken (111). Die TNF- $\alpha$ -Sekretion lag im Rahmen der vorliegenden Dissertation in den CMS-4-Kokulturen über den Werten der PBMC-Monokultur. TNF- $\alpha$  kann als protektiver Faktor wirken (33, 112). Laut Reissfelder et al. lässt TNF- $\alpha$  als „prognostischer Biomarker“ Rückschlüsse auf die CTL-Aktivität zu (113). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass TNF- $\alpha$  prämetastatische Entwicklungen begünstigen kann (33, 114).

In der Literatur wurde das Auftreten von Granzym B in der Tumormikroumgebung beschrieben (33). In der vorliegenden Untersuchung war in den CMS-1-Monokulturen keine und in den Kokulturen mit PBMC nur eine geringe Granzym B Menge nachweisbar. CMS-4-Mono- und Kokulturen wiesen dagegen eine deutlich über dem Niveau in den PBMC-Monokulturen liegende Granzym B Sekretion auf. Dieser Befund ist im Hinblick auf die bisherige Datenlage überraschend. Laut Pagès et al. ist das Vorkommen von Granzym B

mit einem längeren Überleben und einer geringeren Metastasierung assoziiert. Daher ist eine vermehrte Sekretion bei dem prognostisch ungünstigen CMS-4 nicht zu erwarten (83). Granzym B gilt als Marker für CTLs (10). Passend dazu, waren in den CMS-4-Kokulturen tendenziell mehr aktivierte CTLs nachweisbar als in CMS-1-Monokulturen (10).

Karzinomzellen erzeugen über die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  ein tumortolerantes Milieu (115). In der vorliegenden Studie war IL-10 nur in den CMS-4-Mono- und Kokulturen auf einem Niveau oberhalb der Werte der PBMC-Monokulturen nachweisbar, während in den CMS-1-Mono- und Kokulturen tendenziell keine IL-10-Freisetzung messbar war. Dazu passt das erhöhte Vorkommen aktivierter Tregs in den CMS-4-Kokulturen, auf das die IL-10-Freisetzung zurückzuführen ist. Dieser deutliche Unterschied unterstützt die These, dass der CMS-4 durch eine vermehrte Immunsuppression in der Tumormikroumgebung der Immunantwort besser entgehen kann (19). Die fehlende Sekretion des immunsupprimierenden IL-10 unterstützt die Klassifizierung des CMS-1 als einen die Immunreaktion favorisierenden bzw. weniger hemmenden Phänotyp (19). Die deutlich schlechtere Prognose des CMS-4 lässt sich durch die verstärkte Tumor Escape Mechanismen der Immunsuppression durch IL-10-Sekretion erklären (4, 5).

Tumoren können Zytokine dazu nutzen, der Immunantwort zu entgehen (5, 7). Der mögliche Einfluss einer H-1PV-Infektion auf die Zytokin-Sekretion in der Mikroumgebung des Tumors wird im Folgenden beschrieben.

### 5.3.2 Zytokin-Produktion nach H-1PV-Infektion

Sowohl die vorliegende Untersuchung als auch vorangegangene Studien konnten einen Effekt der H-1PV-Infektion auf die Zytokin-Sekretion nachweisen (5).

Laut Moehler et al. hat eine H-1PV-Infektion eine vermehrte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge (7, 69, 75). Bei Heinrich et al. führten durch H-1PV-Infektion entstandene CMS-4-Tumorzelllysate der Zelllinie SW-480 zu einer vermehrten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (39). In Untersuchungen an humanen Melanomzellen war ein deutlicher Anstieg der TNF- $\alpha$ - und IL-6-Sekretion nach H-1PV-Infektion nachweisbar (69, 75). In der vorliegenden Studie korrespondierte die vermehrte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach H-1PV-Infektion in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen über den Wert der PBMC-Monokulturen hinaus mit dem erhöhten Vorkommen von T<sub>H</sub>-Zellen nach H-1PV-Infektion. Der Anstieg von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach H-1PV-Infektion entsprach den Erwartungen, da die TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Sekretion nach H-1PV-Infektion als elementarer Bestandteil der Antitumor-Immunreaktion gilt (25, 39). Auch Moralès et al. detektierten einen IFN- $\gamma$ -Anstieg nach H-1PV-Infektion (64). Grekova et al. wiesen nach, dass die Toxizität von H-1PV nach einer Neutralisation von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  über Antikörper deutlich abnimmt, was gegen eine ausschließlich direkte virale Toxizität

spricht (104). Die Autoren schlussfolgerten, dass die verminderte IFN- $\gamma$ -Freisetzung bei infizierten, kokultivierten Tumorzellen im Vergleich zur IFN- $\gamma$ -Freisetzung bei infizierten PBMC-Monokulturen mit einer Inhibierung der Immunreaktion durch die Tumorzellen direkt zu tun haben könnte (104).

In der vorliegenden Studie war die vermehrte IL-2-Sekretion nach einer H-1PV-Infektion in den Kokulturen mit Werten oberhalb der PBMC-Monokulturen mit einer vermehrten Stimulation von T<sub>H</sub>-Zellen assoziiert. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen der Untersuchung von Moralès et al. (64).

In Studien zum Einsatz von H-1PV zur Bekämpfung von Glioblastomen wurde der Aktivierungsstatus der tumorinfiltrierenden T-Zellen mittels Granzym B sowie Perforin nachgewiesen. Dabei war eine erhöhte Ausschüttung von IL-2 sowie IFN- $\gamma$  nach H-1PV-Infektion erkennbar (8).

Granzym B gilt als Aktivierungsmarker von regulatorischen T-Zellen (25). In der vorliegenden Untersuchung war nach der H-1PV-Infektion in den CMS-1-Kokulturen und in den SW-480-Kokulturen ein Anstieg der Granzym B Freisetzung auf Werte oberhalb der Werte in den PBMC-Monokulturen nachweisbar. Dieser Befund korrespondiert mit den Ergebnissen von Goepfert et al. (25). Die erhöhte Granzym B Sekretion nach H-1PV-Infektion passte zu dem vermehrten Vorkommen und der gesteigerten Aktivierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen (FACS-Analyse). Dagegen wiesen die CL-11-Kokulturen eine verminderte Granzym B Ausschüttung trotz des Anstiegs verschiedener T-Zell-Subpopulationen nach H-1PV-Infektion auf. Eine mögliche Erklärung ist eine Beteiligung von NK-Zellen an der Granzym B-Sekretion in den Kokulturen der anderen Zelllinien, da der Anteil dieses Zelltyps in den CL-11-Kokulturen im Vergleich zum Anteil in den PBMC-Monokulturen tendenziell geringer war.

Der Einfluss der H-1PV-Infektion auf die IL-10-Sekretion unterschied sich in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen. In den CMS-1-Kokulturen war eine vermehrte IL-10 Freisetzung nach H-1PV-Infektion (> Freisetzung in den PBMC-Monokulturen) nachweisbar. Ein Anstieg der IL-10-Sekretion nach einer H-1PV-Infektion weist auf eine vermehrte Aktivierung von Tregs hin (25). Die vermehrte IL-10-Ausschüttung korrelierte in der vorliegenden Untersuchung mit dem Anstieg an aktivierten Tregs nach H-1PV-Infektion in den DLD-1-Kokulturen. Dagegen wurde in den CMS-4-Kokulturen eine verminderte IL-10-Konzentration nach H-1PV-Infektion gemessen, wobei der Anstieg der aktivierten Tregs (FACS-Analyse) eine vermehrte IL-10-Freisetzung hätte erwarten lassen. Unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der IL-10-Freisetzung wurden auch an Melanomzellen beobachtet. Bei Goepfert et al. hatte eine H-1PV-Infektion von Melanomzellen keinen Effekt auf die IL-10-Sekretion (25). Eine Kombinationstherapie aus H-1PV-Infektion und Immuncheckpoint-Inhibitoren führte bei Melanomzellen (Sk29Mel-1) zu einer Abnahme der IL-10-Freisetzung

und einer geringeren Treg-Aktivität (25). Moehler et al. fanden dagegen eine vermehrte IL-10-Freisetzung nach H-1PV-Infektion in humanen Melanomzellen (69). Bei der Interpretation der Befunde ist jedoch zu beachten, dass auch andere Zellen (z. B. MDSCs) IL-10 freisetzen können; daher sind weiterführende Analysen notwendig (5).

Zusammenfassend deutet die veränderte Zytokin-Sekretion nach H-1PV-Infektion auf eine Immuninduktion und eine möglicherweise verbesserte Antitumor-Immunantwort hin (39). Laut Nagorsen et al. sind die Aktivierung dendritischer Zellen und damit antineoplastische Effekte mit einer vermehrten Zytokin-Sekretion (z. B. IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ) assoziiert (116). Jedoch können die nach einer H-1PV-Infektion vermehrt sezernierten immunsuppressiv wirkenden Zytokine auch tumorfördernd wirken.

## 5.4 Limitationen

Die vorliegenden Untersuchungen weisen verschiedene Limitationen auf. Die untersuchten Zelllinien bilden die komplexe Pathogenität der KRK in Patienten nur unzureichend ab. Daher erlauben die Ergebnisse keine ausreichende Prognose hinsichtlich der Wirkung einer H1-PV-Therapie *in vivo*.

Die Versuchsergebnisse zeigten zum Teil eine hohe Streuung der Werte. Bei einer geringen Anzahl an Parallelversuchen wurde in einigen Fällen keine statistische Signifikanz erreicht. Die PBMCs aus Spenderblut wiesen eine hohe Varianz auf und können nicht ohne Weiteres stellvertretend für andere Immunzellprofile anderer Patienten stehen.

Die Einteilung des KRK in CMS erlaubt hauptsächlich Aussagen hinsichtlich der Prognose und des Ansprechens auf etablierte systemische Therapien (88). Möglicherweise eignet sich diese Einteilung jedoch nicht für die Prognose hinsichtlich des Ansprechens von KRK-Patienten auf eine H-1PV-Therapie. Diese potenzielle Einschränkung sollte in weiterführenden Studien berücksichtigt werden.

Zur Entwicklung optimaler H1-PV-basierter Therapieansätze sind Forschungsansätze erforderlich, die auch CMS-2 und -3 einbeziehen. Weiter sollten die Effekte von Kombinationstherapien mit gängigen Chemotherapeutika und Immunmodulatoren analysiert werden.

## 5.5 Fazit und Ausblick

Das H-1PV ist eine vielversprechende Therapieoption beim KRK. Zu den Vorteilen des Verfahrens zählen die klinische Sicherheit, die gezielte Infektion von Karzinomzellen und die Tumorbekämpfung mittels direkter und indirekter Mechanismen. Problematisch sind die heterogenen Verhältnisse in der Tumormikroumgebung und eine limitierte Replikationskapazität des Virus (5, 117). Die vorliegenden Befunde bezüglich des Effekts der H-1PV-Infektion von KRK-Zellen auf die Immunzell-Differenzierung und Zytokin-

Freisetzung sprechen für die weitere Erforschung eines möglichen Einsatzes von H-1PV bei Patienten mit KRK. Die nachgewiesenen Unterschiede bezüglich der Reaktion auf eine H-1PV-Infektion beim CMS-1 und CMS-4 sollten in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Zu den beschriebenen Optimierungsmöglichkeiten bei einer H-1PV-Therapie zählen Kombinationstherapien (10), der Einsatz genetisch veränderter Viren mit verbesserter Wirkung auf das Immunsystem (9, 118), die Berücksichtigung des Lebenszyklus des H-1PV (41, 43) und die Identifikation von Biomarkern für Patienten, die am meisten von der Therapie profitieren (9). H-1PV sollte auch als ergänzendes Therapeutikum in Betracht gezogen werden (75, 78, 117). Den positiven Effekt einer H-1PV-Therapie zusätzlich zu einer Chemotherapie haben Angelova et al. beim Pankreaskarzinom (119) und Moehler et al. bei Melanomzellen (75) nachgewiesen.

Auch eine Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren bietet für das H-1PV möglicherweise therapeutisches Potenzial (7). In der Studie von Goepfert et al. verbesserte eine H-1PV-Infektion die Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei malignen Melanomen (25). Auf der Oberfläche der Zelllinie SW-480 ließen sich nach H-1PV-Infektion vermehrt CTLA-4-Rezeptoren nachweisen (39). Der durch H-1PV induzierte Zelltod ging mit einem Anstieg der Immuncheckpoint-Proteine CTLA-4, PD-1, und PD-L1 einher (25, 39).

Die Anti-Tumor-Aktivität des H-1PV ließe sich durch genetische Modifizierungen potenziell verbessern (43, 78, 118). Eine Möglichkeit wäre die selektive Erhöhung der Infektionsfähigkeit des H-1PV für bestimmte CMS. Auch die therapeutische Verabreichung von Zytokinen oder kostimulierenden Molekülen könnte die induzierte Immunzellaktivierung in der Tumormikroumgebung verstärken (120).

Für die klinische Etablierung der H-1PV-Therapie sind weitere Untersuchungen zur Applikation und Handhabung von H-1PV erforderlich, bevor ein sicherer Einsatz gewährleistet werden kann (121). Die aktuelle Datenlage unterstreicht jedoch das therapeutische Potenzial des H-1PV beim KRK.

## Zusammenfassung

Der Einsatz onkolytischer Viren gewinnt in der Tumorforschung zunehmend an Bedeutung. Beispielsweise wird dem H-1-Parvovirus (H-1PV) therapeutisches Potenzial beim kolorektalen Karzinom (KRK) zugesprochen. Das KRK wird anhand der molekularen Eigenschaften der Zellen in Consensus molecular subtypes (CMS) eingeteilt, wobei sich die CMS-1 und -4 durch eine hohe Immunogenität auszeichnen. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse des Effekts der Infektion von CMS-1 und -4 des KRK mit dem H-1PV auf die Differenzierung und Zytokinfreisetzung von Immunzellen.

Hierzu wurden Kokulturrexperimente mit H-1PV infizierten bzw. nicht-infizierten KRK-Zelllinien (CMS1: DLD-1 + HCT-15; CMS-4: SW-480 + CL-11) und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durchgeführt. Die Viabilität der KRK wurde mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethyl-2-triazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) bestimmt. Der Nachweis der Immunzell-Subpopulationen erfolgte mit von Fluorescence-activated cell sorting (FACS) und die Analyse der Zytokin- und Granzym-B-Freisetzung mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Eine Infektion von KRK-Zellen mit dem H-1PV verringerte zeit- und konzentrationsabhängig die Viabilität der Zellen. Die Abnahme der Viabilität war bei CMS-4-Zelllinien deutlicher. In den Kokulturen von CMS-4-Zelllinien und PBMC war ein höherer Anteil an aktivierten regulatorischen T-Zellen (Tregs), natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie ausgereiften NK-Zellen (nur SW-480) und ausgereiften natürlichen Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen) (nur SW-480) als in den Kokulturen mit CMS-1-Zelllinien nachweisbar.

Eine H-1PV-Infektion beeinflusste in den Kokulturen aus CMS-4- bzw. CMS-1-Zellen und PBMC die Differenzierung der Immunzellen sowie die Zytokin-Sekretion. Zu den Effekten auf die Zelldifferenzierung zählten erhöhte Anteile an T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) (CMS-1, CMS-4), aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CTLs) (CMS-4), aktivierten Tregs (CMS-4 und DLD-1 (CMS-1)), NK-Zellen (DLD-1 (CMS-1)) sowie an ausgereiften NK-T-Zellen (CMS-4). Bei den Effekten einer H-1PV-Infektion auf die Zytokin-Produktion fielen eine vermehrte Sekretion von Interleukin-(IL)-2, Interferon-(IFN)- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor-(TNF)- $\alpha$  sowie eine verminderte (CMS-4) bzw. vermehrte (CMS-1) IL-10-Ausschüttung auf. Eine vermehrte Granzym B-Ausschüttung wurden in den Kokulturen mit CMS-1-Zelllinien sowie mit der CMS-4-Zelllinie SW-480 nach H-1PV-Infektion beobachtet, während in der CL-11-Kokultur eine verminderte Granzym-B-Ausschüttung messbar war.

Die von der Infektionsdauer und von der Infektionsstärke abhängige Viabilitätsminderung der KRK-Zellen bei einer H-1PV-Infektion bestätigte das onkolytische Potenzial des Virus. Der Effekt der CMS-1- und -4-Zelllinien auf die Differenzierung von PBMCs zeigte zum Teil

unerwartete Ergebnisse, bestätigte jedoch insgesamt die Immunogenität dieser beiden Subtypen. Eine H-1PV-Infektion der KRK-Zellen führte zu einer deutlichen Immunzellaktivierung, was das Virus als potenzielles Therapeutikum zusätzlich interessant macht. Die Inhomogenität der Ergebnisse innerhalb der CMS erfordert weitere Untersuchungen. Insbesondere die kontrovers diskutierte Rolle der Tregs – im Sinne einer Tumorförderung oder Tumoringibition – sollte in Folgestudien analysiert werden. Auch die unterschiedliche Tendenz bezüglich des NK-Zellanteil in den CMS-1- und CMS-4-Kokulturen gilt es weiter zu untersuchen.

Der Effekt der H-1PV-Infektion auf die Zytokin-Sekretion der PBMCs spricht für eine mögliche Beeinflussung der Antitumor-Immunantwort und der Tumor Escape Mechanismen. Insbesondere die vermehrte Ausschüttung von IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  weist auf eine pro-inflammatorische Immunantwort hin, die für eine Antitumor-Wirkung spricht. Auch hier erfordern die nachgewiesenen Unterschiede zwischen den CMS-1 und CMS-4 weitere Untersuchungen hinsichtlich möglicher Tumor Escape Mechanismen.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht Kokulturansatz und FACS-Färbung .....	24
Abbildung 2: Relative Viabilität von DLD-1-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI) .....	29
Abbildung 3: Relative Viabilität von HCT-15-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI) .....	29
Abbildung 4: Relative Viabilität von SW-480-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI) .....	30
Abbildung 5: MTT-Assay (Beispiel) – SW-480-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI).....	30
Abbildung 6: Relative Viabilität von CL-11-Karzinomzellen nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI) .....	31
Abbildung 7: Vergleich der relativen Viabilität der KRK-CMS-1-Zelllinien (DLD-1, HCT-15) nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI). .....	32
Abbildung 8: Vergleich der relativen Viabilität der KRK-CMS-4-Zelllinien (SW-480, CL-11) nach Infektion mit dem Parvovirus H1 (H-1PV) nach 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit bei unterschiedlichen Infektionsstärken (MOI). .....	32
Abbildung 9: Anteil der regulatorischen T-Zellen (Tregs, CD3+CD4+FoxP3+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ) .....	33
Abbildung 10: Anteil aktivierter regulatorischer T-Zellen (Tregs, CD3+CD4+FoxP3+CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ) .....	34
Abbildung 11: Anteil aktivierter T-Helferzellen (CD3+CD4+FoxP3-CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht	

infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)..... 35

Abbildung 12: Anteil aktivierter zytotoxischer T-Zellen (CTLs, CD3+CD8+CD69+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ) ..... 36

Abbildung 13: Anteil Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen, CD3-CD56+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ) ..... 37

Abbildung 14: Anteil ausgereifter Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen, CD3-CD56+CD57+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)..... 38

Abbildung 15: Anteil NK-T-Zellen (CD3+CD56+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ) ..... 39

Abbildung 16: Anteil ausgereifter NK-T-Zellen (CD3+CD56+CD57+) an Peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) in nicht stimulierten (PBMC) und stimulierten (PBMC\*) Monokulturen sowie in Kokulturen (CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) mit nicht infizierten und in mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten kolorektalen Tumorzellen (TZ)..... 40

Abbildung 17: Nachweis von Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)..... 43

Abbildung 18: Nachweis von Interleukin 10 (IL-10) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC\*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)..... 45

Abbildung 19: Nachweis von Interleukin 2 (IL-2) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert

---

(PBMC*) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV).....	46
Abbildung 20: Nachweis von Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV).....	47
Abbildung 21: Nachweis von Granzym B in Zellkulturüberständen von Monokulturen peripherer mononukleärer Zellen (nicht stimuliert (PBMC), stimuliert (PBMC*)) oder kolorektaler Tumorzellen (TZ, CMS-1-Zelllinien blau, CMS-4-Zelllinien grün) sowie von Kokulturen aus PBMC und TZ mit und ohne Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV)..	48

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Zytokine .....	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	13
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien .....	14
Tabelle 4: Verwendete Zytokine .....	14
Tabelle 5: Übersicht Herkunft der untersuchten Antikörper.....	15
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	18
Tabelle 8: Übersicht über die Marker-Konstellation in den Immunzellsubpopulationen in der Fluorescence-activated cell sorting (FACS) Analyse .....	26
Tabelle 9: Übersicht über die Effekte einer Infektion mit dem Parvovirus H-1 (H-1PV) auf die Anteile der Immunzell-Subpopulationen in Kokulturen aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) und mit Parvovirus H-1 (H-1PV) infizierten Kolonkarzinom-Zellen – Consensus molecular subtype (CMS) 1 vs. 4 .....	41

## Literaturverzeichnis

1. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registriernummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> abgerufen am 18.05.2023. 2019.
2. Dr. Peter Kaatsch DCS, Prof. Dr. Alexander Katalinic, Dr. Stefan Hentschel, Dr. Sabine Luttmann, Dr. Mechthild Waldeyer-Sauerland, Dr. Annika Waldmann, Monika Christ, Dr. Juliane Folkerts, Dr. Jutta Hansmann, Dr. Stefanie Klein, Dr. Kristine Kranzhöfer, Dr. Beatrice Kunz, Dr. Katrin Manegold, Dr. Andrea Penzkofer, Dr. Kornelia Treml, Dr. Grit Vollmer, Dr. Susanne Weg-Remers, Dr. Benjamin Barnes, Nina Buttman-Schweiger, Dr. Stefan Dahm, Julia Fiebig, Manuela Franke, Ina Gurung-Schönfeld, Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Antje Wienecke. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV (Hrsg)2015/2016. p. 1-163.
3. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):79-92.
4. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
5. Marchini A, Daeffler L, Pozdeev VI, Angelova A, Rommelaere J. Immune Conversion of Tumor Microenvironment by Oncolytic Viruses: The Protoparvovirus H-1PV Case Study. *Front Immunol*. 2019;10:1848.
6. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, Waldner MJ, Bindea G, Mlecnik B, Galon J, Trajanoski Z. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol*. 2015;16(1):64.
7. Moehler M, Goepfert K, Heinrich B, Breitbach CJ, Delic M, Galle PR, Rommelaere J. Oncolytic virotherapy as emerging immunotherapeutic modality: potential of parvovirus h-1. *Front Oncol*. 2014;4:92.
8. Geletneky K, Hajda J, Angelova AL, Leuchs B, Capper D, Bartsch AJ, Neumann JO, 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):2620-34.
9. Bretscher C, Marchini A. H-1 Parvovirus as a Cancer-Killing Agent: Past, Present, and Future. *Viruses*. 2019;11(6):562
10. Angelova A, Ferreira T, Bretscher C, Rommelaere J, Marchini A. Parvovirus-Based Combinatorial Immunotherapy: A Reinforced Therapeutic Strategy against Poor-Prognosis Solid Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2):342
11. Ciardiello D, Vitiello PP, Cardone C, Martini G, Troiani T, Martinelli E, Ciardiello F. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy. *Cancer Treat Rev*. 2019;76:22-32.
12. Gurung-Schönfeld I Kraywinkel K. Krebsregistrierung heute: zwischen Epidemiologie, Qualitätssicherung und Forschung. *Epid Bull* 2021;4:3-9 DOI 1025646/7847. 2021;ZfKD- Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut.
13. Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ*. 2010;341:c5504.

14. Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*. 2001;48(6):812-5.
15. T. Kucharzik<sup>1\*</sup> A Dignass, R. Atreya, B. Bokemeyer, P. Esters, K. Herrlinger, K. Kannengiesser, P. Kienle, J. Langhorst, A. Lügering, S. Schreiber, A. Stallmach, J. Stein, A. Sturm, N. Teich, B. Siegmund<sup>14</sup>. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa (Version 6.1) Februar 2023 – AWMF-Registriernummer: 021-009. 2023. [zitiert am 01.11.2023]. URL: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/021-009I\\_S3\\_Colitis-ulcerosa\\_2023-03.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/021-009I_S3_Colitis-ulcerosa_2023-03.pdf)
16. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967-76.
17. Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeyer A, Von Stillfried D, Schmiegel W. Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1460-7.e2.
18. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Wayne JD. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*. 2012;366(8):687-96.
19. Roelands J, Kuppen PJK, Vermeulen L, Maccalli C, Decock J, Wang E, Marincola FM, Bedognetti D, Hendrickx W. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2229.
20. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, Selves J, Sautès-Fridman C, Laurent-Puig P, Fridman WH. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4057-66.
21. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
22. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998;10(5):351-3.
23. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49.
24. Kenneth Murphy CW. Janeway Immunologie 9. Auflage. Heidelberg. Spektrum S, editor. Berlin: Springer Spektrum; 2019.
25. Goepfert K, Dinsart C, Rommelaere J, Foerster F, Moehler M. Rational Combination of Parvovirus H1 With CTLA-4 and PD-1 Checkpoint Inhibitors Dampens the Tumor Induced Immune Silencing. *Front Oncol*. 2019;9:425.
26. Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):157-67.
27. Zhuo C, Xu Y, Ying M, Li Q, Huang L, Li D, Cai S, Li B. FOXP3<sup>+</sup> Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *Immunol Res*. 2015;61(3):338-47.
28. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:1-7.
29. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 23):5591-6.
30. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010;127(4):759-67.
31. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):186-92.
32. Kato T, Noma K, Ohara T, Kashima H, Katsura Y, Sato H, Komoto S, Katsube R, Ninomiya T, Tazawa H, Shirakawa Y, Fujiwara T. Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8(+) and FoxP3(+) T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4820-33.
33. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, Salehi E, Solhjoo S, Toolee H, Kharazinejad E, Mortezaee K. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5700-21.

34. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
35. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, Imamura M. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7322-7.
36. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 Suppl):S460-75.
37. Shen J, Xiao Z, Zhao Q, Li M, Wu X, Zhang L, Hu W, Cho CH. Anti-cancer therapy with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ : A comprehensive review. *Cell Prolif*. 2018;51(4):e12441.
38. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(1):6-21.
39. Heinrich B, Goepfert K, Delic M, Galle PR, 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;6:1119-27.
40. Toh JWT, Ferguson AL, Spring KJ, Mahajan H, Palendira U. Cytotoxic CD8+ T cells and tissue resident memory cells in colorectal cancer based on microsatellite instability and BRAF status. *World J Clin Oncol*. 2021;12(4):238-48.
41. Nettelbeck DM, Leber MF, Altomonte J, Angelova A, Beil J, Berchtold S, Delic M, Eberle J, Ehrhardt A, Engeland CE, Fechner H, Geletneky K, Goepfert K, Holm PS, Kochanek S, Kreppel F, Krutzke L, Kühnel F, Lang KS, Marchini A, Moehler M, Mühlebach MD, Naumann U, Nawroth R, Nüesch J, Rommelaere J, Lauer UM, Ungerechts G. Virotherapy in Germany-Recent Activities in Virus Engineering, Preclinical Development, and Clinical Studies. *Viruses*. 2021;13(8).1420
42. Gebremeskel S, Nelson A, Walker B, Oliphant T, Lobert L, Mahoney D, Johnston B. Natural killer T cell immunotherapy combined with oncolytic vesicular stomatitis virus or reovirus treatments differentially increases survival in mouse models of ovarian and breast cancer metastasis. *J Immunother Cancer*. 2021;9(3).e002096
43. Hartley A, Kavishwar G, Salvato I, Marchini A. A Roadmap for the Success of Oncolytic Parvovirus-Based Anticancer Therapies. *Annu Rev Virol*. 2020;7(1):537-57.
44. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, Mami-Chouaib F. Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:14.
45. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;690:42-9.
46. Munn DH, Bronte V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:1-6.
47. Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, Kato T, Lucarelli E, Donati D, Polito L, Bolognesi A, Ricci F, Salvi S, Gargaglione V, Mantero S, Alberghini M, Ferrara GB, Pistillo MP. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer*. 2005;117(4):538-50.
48. Russell L, Peng KW, Russell SJ, Diaz RM. Oncolytic Viruses: Priming Time for Cancer Immunotherapy. *BioDrugs*. 2019;33(5):485-501.
49. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1136-51.
50. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. 2007;15(4):651-9.
51. Gao Y, Wu Y, Huan T, Wang X, Xu J, Xu Q, Yu F, Shi H. The application of oncolytic viruses in cancer therapy. *Biotechnol Lett*. 2021;43(10):1945-54.
52. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(8):498-513.
53. Kana SI, Essani K. Immuno-Oncolytic Viruses: Emerging Options in the Treatment of Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2021;25(3):301-13.
54. Moehler M, Zeidler M, Schede J, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ, 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):477-80.
55. Moehler M, Göpfert K, Lenz HJ. Outlook: Immunotherapy in Gastrointestinal Carcinoma - Innovative Strategies. *Oncol Res Treat.* 2018;41(5):313-5.
56. Toolan HW. A virus associated with transplantable human tumors. *Bull N Y Acad Med.* 1961;37(5):305-10.
57. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* 2014;159(5):1239-47.
58. Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, Krebs O, von Knebel Doeberitz M, Huber B, Hajda J. Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC Cancer.* 2012;12:99.
59. Marchini A, Bonifati S, Scott EM, Angelova AL, Rommelaere J. Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virol J.* 2015;12:6.
60. Ferreira T, Kulkarni A, Bretscher C, Richter K, Ehrlich M, Marchini A. Oncolytic H-1 Parvovirus Enters Cancer Cells through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Viruses.* 2020;12(10):1199
61. Toolan HW. Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters. *Nature.* 1967;214(5092):1036.
62. Rommelaere J, Cornelis JJ. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods.* 1991;33(3):233-51.
63. Hristov G, Krämer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A. Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol.* 2010;84(12):5909-22.
64. Moralès O, Richard A, Martin N, Mrizak D, Sénéchal M, Miroux C, Pancré V, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P, de Launoit Y, Delhem N. Activation of a helper and not regulatory human CD4+ T cell response by oncolytic H-1 parvovirus. *PLoS One.* 2012;7(2):e32197.
65. Newman SJ, McCallin PF, Sever JL. Attempts to isolate H-1 virus from spontaneous human abortions: a negative report. *Teratology.* 1970;3(3):279-81.
66. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero YCM, Deleu L, Sommer C, Thomas N, Rommelaere J, Schlehofer JR. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol.* 2010;12(8):804-14.
67. Malerba M, Daeffler L, Rommelaere J, Iggo RD. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol.* 2003;77(12):6683-91.
68. Bhat R, Rommelaere J. NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells. *BMC Cancer.* 2013;13:367.
69. Moehler MH, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, Rommelaere J, Galle PR, 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.
70. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol.* 2007;81(8):4186-98.
71. Angelova A, Rommelaere J. Immune System Stimulation by Oncolytic Rodent Protoparvoviruses. *Viruses.* 2019;11(5):415
72. Sieben M. Analyse der Beteiligung von Toll-like-Rezeptoren an der DC-Aktivierung nach Parvovirus-H-1-Infektion. doi:10.25358/openscience-4676. Dissertation Mainz: Universität; 2012.
73. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

74. Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ. Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther.* 2001;8(3):158-67.
75. Moehler M, Sieben M, Roth S, Springsguth F, Leuchs B, Zeidler M, Dinsart C, Rommelaere J, Galle PR. Activation of the human immune system by chemotherapeutic or targeted agents combined with the oncolytic parvovirus H-1. *BMC Cancer.* 2011;11:464.
76. Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR, Raykov Z. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(2-3):185-95.
77. Malerba M, Nikolova D, Cornelis J, Iggo R. Targeting of autonomous parvoviruses to colon cancer by insertion of Tcf sites in the P4 promoter. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(3):273-80.
78. 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;10:2389-401.
79. Kulkarni A, Ferreira T, Bretscher C, Grewenig A, El-Andaloussi N, Bonifati S, Marttila T, Palissot V, Hossain JA, Azuaje F, Miletic H, Ystaas LAR, Golebiewska A, Niclou SP, Roeth R, Niesler B, Weiss A, Brino L, Marchini A. Oncolytic H-1 parvovirus binds to sialic acid on laminins for cell attachment and entry. *Nat Commun.* 2021;12(1):3834.
80. Ros C, Bayat N, Wolfisberg R, Almendral JM. Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses.* 2017;9(11):313
81. Dienstmann R, Villacampa G, Sveen A, Mason MJ, Niedzwiecki D, Nesbakken A, Moreno V, Warren RS, Lothe RA, Guinney J. Relative contribution of clinicopathological variables, genomic markers, transcriptomic subtyping and microenvironment features for outcome prediction in stage II/III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1622-9.
82. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960-4.
83. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(25):2654-66.
84. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 2012;10:205.
85. Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, Specht S, Antolovic D, Galindo L, Schmitz-Winnenthal FH, Schirmacher V, Büchler MW, Weitz J. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann Surg.* 2006;244(6):986-92; discussion 92-3.
86. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 2013;39(1):11-26.

87. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pagès F, Speicher MR, Trajanoski Z, Galon J. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782-95.
88. Ten Hoorn S, de Back TR, Sommeijer DW, Vermeulen L. Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2022;114(4):503-16.
89. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
90. Li Y, Li Y, Xia Z, Zhang D, Chen X, Wang X, Liao J, Yi W, Chen J. Identification of a novel immune signature for optimizing prognosis and treatment prediction in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(23):25518-49.
91. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D. In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med*. 2006;4:52.
92. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263-71.
93. Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y, Matsui H, Shindo Y, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Iida M, Tsunedomi R, Takeda S, Yoshino S, Okayama N, Suehiro Y, Yamasaki T, Fujita T, Kawakami Y, Ueno T, Nagano H. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2019;121(8):659-65.
94. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
95. Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(12):711-9.
96. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesboué R, Laurent M, Berthet P, Mauillon J, Di Fiore F, Sabourin JC, Michel P, Tosi M, Frébourg T, Latouche JB. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol*. 2009;22(9):1186-95.
97. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10(9):942-9.
98. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014-22.
99. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, Gajewski TF. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*. 2013;5(200):200ra116.
100. Albin A, Bruno A, Noonan DM, Mortara L. Contribution to Tumor Angiogenesis From Innate Immune Cells Within the Tumor Microenvironment: Implications for Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:527.
101. Della Chiesa M, Pesce S, Muccio L, Carlomagno S, Sivori S, Moretta A, Marcenaro E. Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol*. 2016;7:351.
102. Moreno M, Molling JW, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, Hooijberg E, Kramer D, Reurs AW, van den Eertwegh AJ, von Blumberg BM, Scheper RJ, Bontkes HJ. IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses. *J Immunol*. 2008;181(4):2446-54.

103. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol.* 2000;1(6):515-20.
104. Grekova S, Aprahamian M, Giese N, Schmitt S, Giese T, Falk CS, Daeffler L, Cziepluch C, Rommelaere J, Raykov Z. Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(12):1280-9.
105. Boozari B, Mundt B, Woller N, Strüver N, Gürlevik E, Schache P, Kloos A, Knocke S, Manns MP, Wirth TC, Kubicka S, Kühnel F. Antitumoural immunity by virus-mediated immunogenic apoptosis inhibits metastatic growth of hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2010;59(10):1416-26.
106. Bhat R, Dempe S, Dinsart C, Rommelaere J. Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *Int J Cancer.* 2011;128(4):908-19.
107. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1903-8.
108. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Eninger M. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol.* 2009;39(4):1088-97.
109. Delic M, Boeswald V, Goepfert K, Pabst P, Moehler M. In vitro Characterization of Enhanced Human Immune Responses by GM-CSF Encoding HSV-1-Induced Melanoma Cells. *Onco Targets Ther.* 2022;15:1291-307.
110. Kaimala S, Al-Sbiei A, Cabral-Marques O, Fernandez-Cabezudo MJ, Al-Ramadi BK. Attenuated Bacteria as Immunotherapeutic Tools for Cancer Treatment. *Front Oncol.* 2018;8:136.
111. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(4):271-85.
112. Moehler M, Delic M, Goepfert K, Aust D, Grabsch HI, Halama N, Heinrich B, Julie C, Lordick F, Lutz MP, Mauer M, Alsina Maqueda M, Schild H, Schimanski CC, Wagner AD, Roth A, Ducreux M. Immunotherapy in gastrointestinal cancer: Recent results, current studies and future perspectives. *Eur J Cancer.* 2016;59:160-70.
113. Reissfelder C, Stamova S, Gossmann C, Braun M, Bonertz A, Walliczek U, Grimm M, Rahbari NN, Koch M, Saadati M, Benner A, Büchler MW, Jäger D, Halama N, Khazaie K, Weitz J, Beckhove P. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *J Clin Invest.* 2015;125(2):739-51.
114. Chen A, Sceneay J, Gödde N, Kinwel T, Ham S, Thompson EW, Humbert PO, Möller A. Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene.* 2018;37(31):4214-25.
115. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(4):295-307.
116. Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine.* 2004;25(1):31-5.
117. Geletneky K, Nüesch JP, Angelova A, Kiprianova I, Rommelaere J. Double-faceted mechanism of parvoviral oncosuppression. *Curr Opin Virol.* 2015;13:17-24.
118. Alloume X, El-Andaloussi N, Leuchs B, Bonifati S, Kulkarni A, Marttila T, Kaufmann JK, Nettelbeck DM, Kleinschmidt J, Rommelaere J, Marchini A. Retargeting of rat parvovirus H-1PV to cancer cells through genetic engineering of the viral capsid. *J Virol.* 2012;86(7):3452-65.
119. Angelova AL, Grekova SP, 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 NA. Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer. *J Virol.* 2014;88(10):5263-76.

120. de Graaf JF, de Vor L, Fouchier RAM, van den Hoogen BG. Armed oncolytic viruses: A kick-start for anti-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;41:28-39.
121. Frehtman V, Wohlfarth D, Müller M, Krebs O, Leuchs B. Stability and safety key factors of the oncolytic protoparvovirus H-1 from manufacturing to human application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2023;107(15):4777-87.

## Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BRAF	Serin/Threonin-Kinase B-Raf
C°	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIMP	CpG island methylator phenotype
CMS	Consensus molecular subtype
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4
DAMPs	Danger associated molecular patterns
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
et al.	et alii
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting)
FasL	Fas-Ligand
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein
FOX P3	Forkhead box P3
g	Gramm
GranB	Granzym B
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
H-1PV	Parvovirus H-1
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSP	Heat shock Protein
IDO-1	Indolamin-2,3-Dioxygenase 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I.U.	International Unit

i.v.	intravenös
KRAS	Kirsten rat sarcoma
l	Liter
Min.	Minute(n)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
μ	10 <sup>-6</sup>
MDSCs	Myeloid-derived-suppressor cells
MOI	Infektionsmultiplizität (Multiplicity of infection)
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-triazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NOTCH VEGFR	
NS1-Protein	Nicht-Strukturprotein 1
OV	Onkolytisches Virus
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	Potenzial des Wasserstoffs
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TAA	Tumorassoziierte Antigene (TAAs)
TCLs	Tumorzelllysate
TGF-β	Transforming growth factor β
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TME	Tumormikroumgebung
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Treg	regulatorische T-Zelle
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
z.B.	zum Beispiel
%	Prozentangabe

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mich bei der Umsetzung dieser Dissertation unterstützt haben, einen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn xxx für die Bereitstellung des interessanten Themas und die fachlich sowie menschlich kompetente Betreuung.

Für die Zweitbegutachtung meiner Dissertation danke ich Frau xxx.

Bei meiner Betreuerin xxx möchte ich mich für die umfangreiche Anleitung, die guten Gespräche sowie die hervorragende praktische und fachliche Betreuung sehr herzlich bedanken.

Auch xxx möchte ich für ihre Mithilfe und Begleitung meinen Dank aussprechen.

Für die große Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten danke ich besonders xxx.

Für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Atmosphäre danke ich der gesamten Arbeitsgruppe.

Der Universitätsmedizin Mainz danke ich für die Bereitstellung der Materialien sowie der Räumlichkeiten.

Meinen Eltern danke ich von Herzen nicht nur für die Ermöglichung des Studiums, sondern vor allem für die aufbauenden Gespräche und die emotionale Unterstützung. Meinen Geschwistern danke ich für die Begleitung, die Motivation und das stets „offene Ohr“.

Auch meiner Großmutter, meinem Onkel, meinen Schwiegereltern sowie weiteren Verwandten und Freunden möchte ich an dieser Stelle meinen Dank zukommen lassen.

Über die Gesellschaft meiner Hunde habe ich mich beim Verfassen der Dissertation ebenfalls sehr gefreut.

Zuletzt möchte ich meinem Mann xxx für die Begleitung durch Höhen und Tiefen, die Geduld und die Stütze, die er mir jederzeit ist, von ganzem Herzen danken.