

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

Charakterisierung der onkolytischen Parvovirus H-1 induzierten Immunzellaktivierung in den
kanonisch und metabolisch aktiven Subgruppen des kolorektalen Karzinoms
(CMS2 und CMS3)

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

Vorgelegt von

Laura Francesca Kienzler
aus Karlsruhe

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: XXX

2. Gutachter: XXX

Tag der Promotion: 16. April 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Das kolorektale Karzinom.....	3
2.1.1 Epidemiologie	3
2.1.2 Risikofaktoren	4
2.1.3 Pathogenese.....	4
2.1.4 Molekulare Subtypen.....	5
2.1.5 Stadieneinteilung	6
2.1.6 Therapie.....	8
2.2 Onkolytische Virotherapie.....	9
2.2.1 Historie.....	9
2.2.2 Parvovirus H-1	10
2.3 Das humane Immunsystem	11
2.3.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem.....	12
2.3.2 Dendritische Zellen.....	13
2.3.3 Zytokine	14
2.3.4 Allgemeine Tumorimmunologie.....	15
2.3.5 Kolorektales Karzinom und das Immunsystem.....	15
2.3.6 Onkolytische Viren und das Immunsystem.....	16
3 Material	19
3.1 Lösungsmittel und Chemikalien.....	19
3.1.1 Lösungsmittel.....	19
3.1.2 Chemikalien	19
3.2 Zelllinien, PBMCs und Virusstamm	19
3.2.1 Zelllinien.....	19
3.2.2 PBMCs.....	20
3.2.3 Virusstamm.....	20
3.3 Antikörper und Zytokine.....	20
3.3.1 Antikörper	20
3.3.2 Zytokine	21
3.4 Medien, Puffer, Lösungen und Kits	21
3.4.1 Medien für Zellkulturen	21
3.4.2 Puffer und Lösungen	22
3.4.3 Kits	22
3.5 Verbrauchsmaterialien	22
3.6 Geräte	23
4 Methoden.....	25

4.1	Zellbiologische Methoden	25
4.1.1	Kultivierung von Zellen	25
4.1.2	Passagieren adhärenter Zellen	25
4.1.3	Passagieren semi-adhärenter Zellen	25
4.1.4	Bestimmung der Zellkonzentration.....	25
4.1.5	Kryokonservierung.....	26
4.1.6	Auftauen kryokonservierter Zellen	26
4.1.7	Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay.....	26
4.1.8	Kokultur.....	27
4.2	Virologische Methoden	28
4.2.1	Infektion der Tumorzellen.....	28
4.3	Immunologische Methoden.....	28
4.3.1	FACS-Analyse	28
4.3.2	ELISA.....	32
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Effekt von H-1PV auf die Viabilitätsraten von CMS2 und CMS3.....	35
5.2	Effekt von H-1PV auf die Verteilung und Aktivierung ausgewählter Immunzellen ...	38
5.2.1	Natürliche Killerzellen	38
5.2.2	Natürliche Killer-T-Zellen.....	39
5.2.3	CD8 ⁺ T-Zellen	41
5.2.4	CD4 ⁺ T-Zellen	41
5.2.5	Myeloide Suppressorzellen	45
5.3	Analyse der Zytokinkonzentrationen im Kokulturversuch	47
5.3.1	Granzym B.....	47
5.3.2	IFN- γ	48
5.3.3	IL-2.....	49
5.3.4	IL-6.....	50
5.3.5	IL-10.....	51
5.3.6	TGF β	52
6	Diskussion	55
6.1	Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität.....	55
6.1.1	Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität von CMS2	55
6.1.2	Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität von CMS3	56
6.2	Einfluss von CMS2 und CMS3 auf das Immunsystem	57
6.2.1	Verteilung und Aktivierung von Immunzellen.....	57
6.2.2	Produktion von Zytokinen.....	60
6.3	Einfluss von H-1PV auf das Immunsystem	61
6.3.1	Verteilung und Aktivierung von Immunzellen.....	61
6.3.2	Produktion von Zytokinen.....	62
6.4	Diskussion der klinischen Anwendung.....	64
7	Zusammenfassung	67

8	Literaturverzeichnis	69
9	Danksagung.....	77
10	Tabellarischer Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	10 ⁻⁶
5-FU	5-Fluorouracil
Ad-hTERT	Adenovirus humane Telomerase Reverse Transkriptase
AKT1	Alpha-Serin/Threonin-Kinase 1
APC	adenomatöses Polyposis coli, <i>Allophycocyanin</i>
ARHGAP9	<i>Rho GTPase Activating Protein 9</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIMP	<i>CpG-Island-Methylator Phenotype</i>
CIN	chromosomale Instabilität
cm ²	Quadratcentimeter
CMS	<i>consensus molecular subtype</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cy7	<i>cyanine dye Cy7</i>
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>damage associated molecular pattern</i>)
DC	dendritische Zelle
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dMMR	defiziente Mismatch-Reparatur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoassay (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase (<i>extracellular-signal regulated kinase</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	<i>Flow Cytometry Standard</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulich (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm; Gravitation
Gal-1	Galectin-1
GranB	Granzym B
h	Stunde(n)
H-1PV	Parvovirus H-1
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA-DPB1	<i>HLA class II histocompatibility antigen, DP(W2) beta chain</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen - DR isotype</i>

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV-1	Herpes-simplex-Virus 1
iDCs	unreife dendritische Zelle (<i>immature dendritic cell</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptoragonist
iT _{regs}	induzierte regulatorische T-Zellen
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma</i>
KRK	kolorektales Karzinom
l	Liter
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
LAMC1	<i>Laminin Subunit Gamma 1</i>
LP	<i>Longpass</i>
m	Meter; 10 ⁻³
M	Metastasen, Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
mDCs	reife dendritische Zelle (<i>mature dendritic cell</i>)
MDSC	myeloide Suppressorzelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MLH	<i>MutL Homolog</i>
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MSH	<i>MutS Homolog</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	hochgradige Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	niedrige Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYC	Protoonkogen MYC
n	10 ⁻⁹
N	Lymphknoten
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NS	Nichtstrukturprotein
nT _{regs}	natürliche regulatorische T-Zellen
p	10 ⁻¹²
P	Promotor
P/S	Penicillin/Streptomycin
p53	Protein 53
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
PFU	Plaque bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
pMMR	persistierende Mismatch-Reparatur
PMS	<i>postmeiotic segregation increased</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT	selektive interne Radioembolisation

S-Phase	Synthese-Phase
ss	<i>single-stranded</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
STX11	<i>Syntaxin 11</i>
T	Primärtumor
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
<i>T-bet</i>	<i>T-cell-specific T-box transcription factor</i>
<i>TBX21</i>	<i>T-box transcription factor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
T-VEC	Talimogene laherparepvec
TZ	Tumorzelle
U	Unit
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vIL-2	<i>variant Interleukin-2</i>
VP	Kapsidprotein
VSV	vesikuläres Stomatitisvirus
Wnt	<i>wingless/int-1</i>
wt	Wildtyp
ZK	Zellkontrolle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Verteilung der UICC-Stadien I-IV bei Erstdiagnose	3
Abbildung 2.2:	Relatives 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium I-IV	3
Abbildung 2.3:	Adenom-Karzinom-Sequenz	4
Abbildung 2.4:	Taxonomie von H-1PV	10
Abbildung 2.5:	Genom von H-1PV	11
Abbildung 2.6:	Unreife und reife dendritische Zellen	14
Abbildung 2.7:	Der Prozess des Immunoediting	15
Abbildung 2.8:	Immunologische Faktoren, die mit einer ungünstigen Prognose des kolorektalen Karzinoms einhergehen	16
Abbildung 2.9:	Onkolytische Viren und die Antitumor-Immunantwort	17
Abbildung 4.1:	Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in blau-violettes Formazan	27
Abbildung 4.2:	Prinzip von FSC und SSC	29
Abbildung 4.3:	Optisches System eines Durchflusszytometers	29
Abbildung 4.4:	Sandwich-ELISA	32
Abbildung 4.5:	Prinzip des Multiplex Assay	33
Abbildung 5.1:	Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie LS1034 (CMS2)	35
Abbildung 5.2:	Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie NCI-H508 (CMS2)	35
Abbildung 5.3:	Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie CL-34 (CMS3)	36
Abbildung 5.4:	Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie HT115 (CMS3)	36
Abbildung 5.5:	Viabilitätsraten von CMS2 und CMS3 bei einer Inkubationszeit von 48 h	37
Abbildung 5.6:	Anzahl an NK-Zellen	38
Abbildung 5.7:	Anzahl an ausgereiften NK-Zellen	39
Abbildung 5.8:	Anzahl an NKT-Zellen	39
Abbildung 5.9:	Anzahl an ausgereiften NKT-Zellen	40
Abbildung 5.10:	Anzahl an aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen	41
Abbildung 5.11:	Verhältnis von T _{regs} zu T _H -Zellen in der Kokultur mit LS1034 (CMS2)	42
Abbildung 5.12:	Verhältnis von T _{regs} zu T _H -Zellen in der Kokultur mit NCI-H508 (CMS2)	42
Abbildung 5.13:	Verhältnis von T _{regs} zu T _H -Zellen in der Kokultur mit HT115 (CMS3)	43
Abbildung 5.14:	Anzahl an aktivierten T _H -Zellen	43
Abbildung 5.15:	Anzahl an aktivierten T _{regs}	44
Abbildung 5.16:	Anzahl an myeloiden Suppressorzellen (MDSCs)	45
Abbildung 5.17:	Anzahl an monozytischen MDSCs	45
Abbildung 5.18:	Freisetzung von Granzym B durch die TZ von CMS2 und CMS3	47
Abbildung 5.19:	Konzentration von Granzym B in der Kokultur mit TZ	47
Abbildung 5.20:	Freisetzung von IFN- γ durch die TZ von CMS2 und CMS3	48
Abbildung 5.21:	Konzentration von IFN- γ in der Kokultur mit TZ	48
Abbildung 5.22:	Freisetzung von IL-2 durch die TZ von CMS2 und CMS3	49
Abbildung 5.23:	Konzentration von IL-2 in der Kokultur mit TZ	49
Abbildung 5.24:	Freisetzung von IL-6 durch die TZ von CMS2 und CMS3	50
Abbildung 5.25:	Konzentration von IL-6 in der Kokultur mit TZ	50
Abbildung 5.26:	Freisetzung von IL-10 durch die TZ von CMS2 und CMS3	51
Abbildung 5.27:	Konzentration von IL-10 in der Kokultur mit TZ	51
Abbildung 5.28:	Freisetzung von TGF β durch die TZ von CMS2 und CMS3	52
Abbildung 5.29:	Konzentration von TGF β in der Kokultur mit TZ	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Eigenschaften der molekularen Subtypen des kolorektalen Karzinoms	6
Tabelle 2.2: TNM-Klassifikation: Primärtumor (T)	6
Tabelle 2.3: TNM-Klassifikation: Regionäre Lymphknoten (N)	7
Tabelle 2.4: TNM-Klassifikation: Fernmetastasen (M)	7
Tabelle 2.5: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	7
Tabelle 2.6: Typische Behandlungsschemata in der Erstlinienchemotherapie	8
Tabelle 2.7: Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms	9
Tabelle 2.8: Ausgewählte Zytokine, ihr Ursprung und ihre Funktion	14
Tabelle 4.1: Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren jeweiligen Eigenschaften	30
Tabelle 4.2: Durchgeführte FACS-Färbungen	31
Tabelle 5.1: Zusammenfassung des Effekts von H-1PV auf ausgewählte Immunzellen	46
Tabelle 5.2: Zusammenfassung des Effekts von H-1PV auf die Zytokinkonzentration	53

1 Einleitung

In Deutschland zählen Krebserkrankungen zu den zweithäufigsten Todesursachen (1). Aufgrund der hohen Prävalenz sowie in Anbetracht der Tatsache, dass Tumore zunehmend Resistenzen gegen bereits etablierte Therapien entwickeln, wird ständig nach neuen Therapiemöglichkeiten geforscht. Das gilt auch für die Behandlung von Tumoren des Kolons und des Rektums. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom haben bereits zielgerichtete Therapien in Form von monoklonalen Antikörpern Einzug in den klinischen Alltag gefunden (2).

Onkolytische Viren könnten einen vielversprechenden alternativen Therapieansatz darstellen. Zu diesen Viren zählen beispielsweise Adeno-, Herpes- oder Pockenviren. Auch das nicht humanpathogene Parvovirus H1 (H-1PV), das zur Familie der Parvoviridae gehört, verfügt über onkolytische Eigenschaften (3, 4). H-1PV infiziert und lysiert bevorzugt Tumorzellen (5). Im Zuge des lytischen Zelltodes werden tumorspezifische Antigene und proinflammatorische Zytokine freigesetzt. So entsteht ein inflammatorisches Tumormikromilieu, welches eine effektive Antitumor-Immunantwort induziert (6, 7). Sowohl im Glioblastom-Zellmodell als auch im Melanom-Zellmodell konnte die tumorselektive Zytotoxizität und das immunstimulierende Potenzial von H-1PV gezeigt werden (8-10).

In dieser Arbeit soll der Effekt von H-1PV auf Kolonkarzinomzellen untersucht werden. Das kolorektale Karzinom lässt sich in vier molekulare Subtypen (CMS1-4) mit jeweils charakteristischen Eigenschaften einteilen (11-14). Im Rahmen dieser Dissertation wurden Kolonkarzinomzellen der kanonisch (CMS2) und metabolisch (CMS3) aktiven Subgruppen betrachtet und untereinander verglichen. Im ersten Teil der Arbeit wurde mittels MTT-Assay der Effekt von H-1PV auf die Zellviabilität untersucht. Der zweite Teil beleuchtete den Einfluss von H-1PV auf die Anzahl und Aktivierung ausgewählter Immunzellen. Neben natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen, die für die Tumorzelllyse essenziell sind, wurden weitere Immunzellen der Tumormikroumgebung analysiert. Im dritten Teil der Dissertation wurde die Konzentration immunmodulierender Zytokine gemessen.

Die Arbeit trägt zum Verständnis der Interaktion zwischen kolorektalen Tumorzellen, onkolytischen Viren und humanem Immunsystem bei und untersucht H-1PV als therapeutische Option.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Epidemiologie

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (KRK) werden Tumore des Kolons und des Rektums zusammengefasst. Das KRK stellt eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland dar. Bei Frauen ist es nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung, bei Männern belegt es nach dem Prostatakarzinom und dem Bronchialkarzinom den dritten Platz. Insgesamt wurden im Jahr 2020 54.770 Neuerkrankungen gezählt (15). Betrachtet man den Anteil der häufigsten Tumore an den Krebssterbefällen, steht das KRK bei beiden Geschlechtern an dritter Stelle. 2020 starben 10.667 Frauen und 13.120 Männer in Folge dieser Krebserkrankung (16). Das KRK tritt mit zunehmendem Lebensalter gehäuft auf. Bei Frauen beträgt das mittlere Erkrankungsalter 75 Jahre, bei Männern 71 Jahre (15).

Trotz intensivierter Früherkennungsmaßnahmen wird das KRK im Vergleich zu anderen Tumorentitäten nach wie vor eher spät diagnostiziert. Bei 24 % der Frauen und 26 % der Männer erfolgt die Diagnose im Stadium IV der Einteilung der internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC) (siehe Abbildung 2.1). Problematisch ist das vor allem, da auch die Prognose stark vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängt (siehe Abbildung 2.2). Mit einem 5-Jahres-Überleben von unter 20 % ist die Prognose des metastasierten KRK nach wie vor schlecht (15, 17).

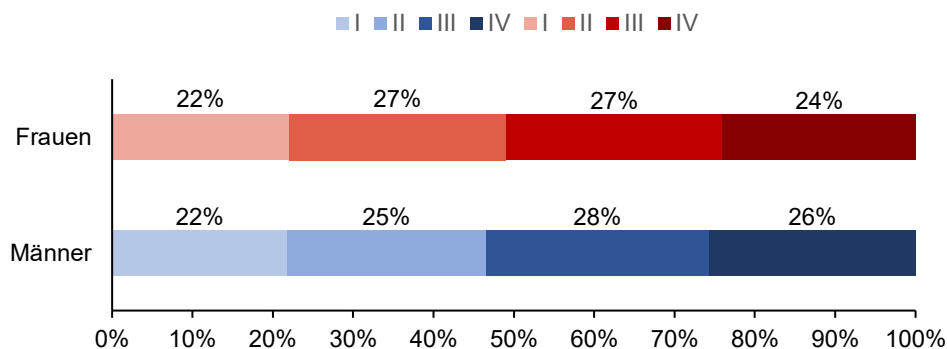


Abbildung 2.1: Verteilung der UICC-Stadien I-IV bei Erstdiagnose nach Geschlecht in Deutschland von 2019-2020. Abkürzung: UICC, „Union internationale contre le cancer“ (18)

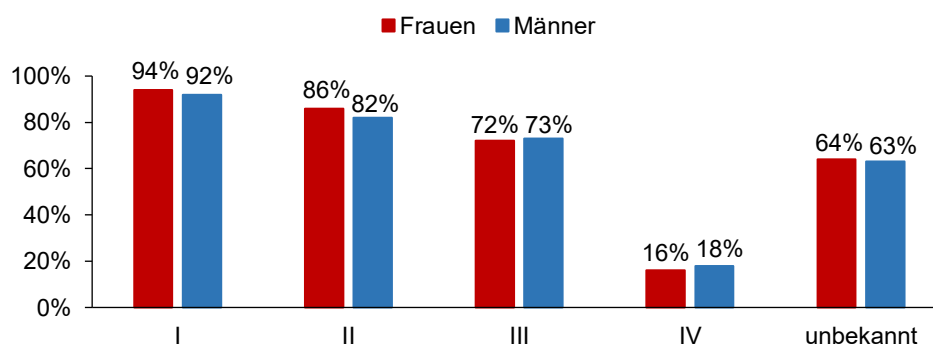


Abbildung 2.2: Relatives 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium I-IV und Geschlecht in Deutschland von 2019-2020 (nach 7. und 8. Auflage TNM). Abkürzungen: T, Tumor; N, Lymphknoten; M, Metastasen (18)

2.1.2 Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren für das KRK zählen das männliche Geschlecht sowie bestehende Vorerkrankungen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2. Auch Übergewicht, Bewegungsmangel, übermäßiger Konsum von rotem und verarbeitetem Fleisch, Nikotinabusus und Alkoholkonsum haben einen negativen Einfluss. Protektiv wirkt der Verzehr von reichlich Obst und Gemüse sowie eine ballaststoffreiche Diät mit einer Ballaststoffaufnahme von etwa 30 g pro Tag (2, 19, 20).

2.1.3 Pathogenese

Das KRK entsteht in 60-65 % der Fälle sporadisch, es liegt also weder eine positive Familienanamnese noch eine vererbte genetische Mutation vor (21). Die meisten Tumore entwickeln sich über Jahre hinweg aus Adenomen, man spricht von der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe Abbildung 2.3) (22). Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen, über die Dysregulation wichtiger Signalkaskaden, zur malignen Entartung von Zellen (11, 23). Auch wenn Modelle für den zeitlichen Ablauf genetischer Veränderungen existieren, ist es vor allem deren progressive Akkumulation, die ausschlaggebend ist (12, 24).

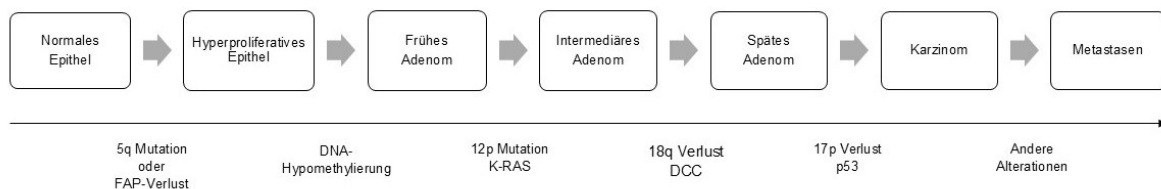


Abbildung 2.3: Adenom-Karzinom-Sequenz. Abkürzungen: DCC, „deleted in colorectal cancer“; DNA, Desoxyribonukleinsäure; FAP, familiäre adenomatöse Polyposis; *KRAS*, „kirsten rat sarcoma“; *p53*, Protein 53 (12)

85 % der sporadisch auftretenden KRK entwickeln sich auf der Basis einer chromosomalen Instabilität (CIN) (11, 23). Gewinne oder Verluste ganzer bzw. großer Teile von Chromosomen führen neben Differenzen in der Chromosomenanzahl auch zu einem Verlust der Heterogenität (25). Assoziiert ist die CIN mit Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *APC* (adenomatöses Polyposis coli) und *p53* (Protein 53) (11, 23).

Bei den übrigen 15 % der sporadisch auftretenden KRK handelt es sich um mikrosatelliteninstabile Tumore (11, 23, 26). Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen, die im gesamten Genom zu finden sind. Wegen ihrer sich wiederholenden Struktur sind sie besonders anfällig gegenüber Replikationsfehlern (27). In der Regel werden Fehler bei der Replikation durch das DNA-Mismatch-Reparatur System beseitigt. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die als Heterodimere agieren. Die wichtigsten Proteinkomplexe sind MutS α (MSH2-MSH6, „MutS Homolog“) und MutS β (MSH2-MSH3), wobei in humanen Zellen das Heterodimer MSH2-MSH6 überwiegt. Während MSH2-MSH6 insbesondere Fehlpaarungen einzelner Basen detektiert, identifiziert MSH2-MSH3 größere Insertionen und Deletionen. Im Rahmen der ersten Mismatch Detektion durch MutS α und MutS β wird auch MutL α rekrutiert, ein Heterodimer aus MLH1 („MutL Homolog“) und PMS2 („postmeiotic segregation increased“) (28). Kommt es in Folge von Mutationen zu Funktionsverlusten von Proteinen, die für die DNA-Mismatch-Reparatur zuständig sind, fehlt die Möglichkeit zur Fehlerbeseitigung. Es resultieren Veränderungen der Mikrosatellitenlänge, was als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet wird (11, 29).

2.1.4 Molekulare Subtypen

Im Jahr 2014 wurde ein genexpressionsbasiertes Klassifikationssystem entwickelt, welches das KRK in vier molekulare Subtypen (CMS1-4, „consensus molecular subtypes“) mit jeweils charakteristischen Eigenschaften unterteilt (siehe Tabelle 2.1) (11-14).

Ein wichtiges Zuordnungsmerkmal stellen genetische Aberrationen dar. Sie ermöglichen zwar keine strenge Zuteilung zu einem bestimmten Subtypus, jedoch sind einige Mutationen bei manchen Subtypen häufiger anzutreffen als bei anderen. So sind CMS1-Tumore oftmals *BRAF*-mutiert („v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“), während CMS3-Tumore häufig eine Mutation im *RAS*-Gen („rat sarcoma“) aufweisen (14). *RAS*-Mutationen fördern die Aufrechterhaltung und Progression von Tumoren und beeinflussen auch die Therapie (2, 30). Weitere molekularbiologische Charakteristika, die je nach Subtyp variieren, sind der Mikrosatellitenstatus und die epigenetische Stabilität. Letztere ist durch unterschiedliche Methylierungsgrade (CIMP, „CpG-Island-Methylator Phenotype“) charakterisiert (11, 13).

Kennzeichnend für CMS2 ist eine starke Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges (wingless/int-1), der eine treibende Rolle bei der Genese des KRK spielt (14, 31). Typisch sind auch Amplifikationen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) (12, 14, 23, 32, 33). Diese gehen mit einer verbesserten Prognose einher und können zudem mit einer gesteigerten Chemosensitivität assoziiert sein (34). Insgesamt finden sich in CMS2-Tumoren die größten strukturellen Variationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Charakteristisch für CMS3-Tumore sind Dysregulationen in Stoffwechselwegen, zum Beispiel im Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel (12, 14, 23, 32, 33). Diese metabolischen Veränderungen sind wichtige Faktoren für die Tumorprogression (14).

Betrachtet man die Beschaffenheit des Tumorgewebes, zeigen sich auch hier Unterschiede zwischen den einzelnen CMS-Subtypen. Bei CMS1 und CMS4 handelt es sich um undifferenzierte Karzinome. Im Gegensatz dazu weisen sowohl CMS2- als auch CMS3-Tumore starke epitheliale Differenzierungsmerkmale auf (12, 14, 23, 32, 33). Der histologische Differenzierungsgrad hat einen erheblichen Einfluss auf die Prognose. Im Allgemeinen ist das klinische Outcome von differenzierten Karzinomen besser als das von undifferenzierten Karzinomen (35). Eine prognostische Bedeutung hat auch die Tumorklassifikation. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass rechtsseitige Tumore eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen als linksseitige Tumoren. Während sich CMS1- und CMS3-Tumore eher im rechtsseitigen Kolon (Caecum, Colon ascendens, hepatische Flexur, Colon transversum) befinden, sind CMS2-Tumore eher im linksseitigen Kolon (splenische Flexur bis Rektum) ansässig (11, 13, 14, 36). Vergleicht man die Prognose der einzelnen Subtypen, weist CMS2 im metastasierten Status die beste Prognose auf, während CMS4 mit der schlechtesten Prognose einhergeht (11, 14, 23).

Nicht zuletzt unterscheiden sich die molekularen Subtypen in der Antwort des Immunsystems (12). Der CMS2-Subtyp ist durch eine schwache intratumorale Immunantwort gekennzeichnet. Bei den wenigen Immunzellen, die sich in der Tumormikroumgebung befinden, handelt es sich um ruhende natürliche Killerzellen und naive CD4⁺ T-Zellen oder B-Zellen. Eine aktive Antitumor-Immunantwort können diese Zellen nicht vermitteln. Darüber hinaus besitzen CMS2-Tumore nur wenige Transkripte für Gene, die für Chemokine codieren oder an der Prozessierung oder Präsentation von Antigenen beteiligt sind. Der Immunphänotyp von CMS3 ähnelt dem von CMS2. Beim CMS3-Subtyp finden sich jedoch vergleichsweise mehr naive B- und T-Zellen sowie ruhende T-Zellen. Des Weiteren imponiert eine hohe Anzahl an Immunzellen, die das Oberflächenprotein PD-1 („programmed cell death protein 1“) exprimieren (37).

Tabelle 2.1: Eigenschaften der molekularen Subtypen des kolorektalen Karzinoms.
 Abkürzungen: BRAF, „v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1“; CD, „cluster of differentiation“; CIMP, „CpG-Island-Methylator Phenotype“; CIN, chromosomale Instabilität; CMS, „consensus molecular subtypes“; CTLA-4, „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4“; DC, dendritische Zelle; EGFR, epidermaler Wachstumsfaktor; EMT, epithelial-mesenchymale Transition; LAG3, "lymphocyte-activation gene 3"; MDSC, myeloide Suppressorzelle; MSI, Mikrosatelliteninstabilität; MSS, Mikrosatellitenstabilität; MYC, Protoonkogen MYC; NK-Zelle, natürliche Killerzelle; PD-1, „programmed cell death protein 1“; PD-L1, „programmed death ligand 1“; TGF, transformierender Wachstumsfaktor; T_H-Zelle, T-Helferzelle; Wnt, wingless/int-1 Signalweg (11, 23)

	CMS1 immunogen	CMS2 kanonisch	CMS3 metabolisch	CMS4 mesenchymal
Anteil	15 %	40 %	13 %	25 %
Molekularbiologie	BRAF-Mutation, CIMP, MSI, hypermutiert	CIN, MSS, EGFR-Amplifikation, Wnt/MYC-Aktivierung	CIN-MSI gemischt, KRAS-Mutationen, metabolische Dysregulation	CIN, MSS, stromale Infiltration, TGFβ, Angiogenese
Immunzellinfiltration	CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen, T _H 1-Zellen, NK-Zellen, DCs, M1-Makrophagen, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3	CD4 ⁺ T/B-Zellen, ruhende NK-Zellen	hohe Anzahl an PD-1-exprimierenden Zellen, T _H 17-Zellen, T/B-Zellen	regulatorische T-Zellen, MSDCs, wenige CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen, M2-Makrophagen, EMT-Aktivierung
Immunstatus	aktiviert	ruhend	gemischt	supprimiert
Seite	rechts	links	rechts	beide Seiten

In den klinischen Alltag hat die CMS-Klassifikation bislang keinen Einzug gefunden. Das liegt mitunter daran, dass sich innerhalb der einzelnen Subtypen eine hohe Rate an intratumoraler Heterogenität zeigt. In der Praxis wird vor allem nach genetischen Veränderungen gefahndet, die sich für zielgerichtete Therapien eignen. Für die Zukunft stellt die CMS-Klassifikation eine Möglichkeit dar, die personalisierte Therapie zu optimieren (11, 12, 23).

2.1.5 Stadieneinteilung

Das KRK wird anhand der UICC-Klassifikation eingeteilt (siehe Tabelle 2.5). Diese hat sowohl prognostische als auch therapeutische Bedeutung. Berücksichtigt werden die Ausdehnung des Primärtumors (T), der Befall regionärer Lymphknoten (N) sowie das Auftreten von Fernmetastasen (M) (siehe Tabelle 2.2, Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) (38, 39).

Tabelle 2.2: TNM-Klassifikation: Primärtumor (T) (38, 39)

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, intramucosales Karzinom (Beteiligung der Lamina propria ohne Infiltration der Muscularis mucosae)
T1	Tumor infiltriert die Submucosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor perforiert die Muscularis propria und infiltriert das perikolorektale Gewebe

Literaturdiskussion

T4		
T4a		Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
T4b		Tumor infiltriert direkt benachbarte Organe oder Strukturen

Tabelle 2.3: TNM-Klassifikation: Regionale Lymphknoten (N) (38, 39)

Nx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		
	N1a	ein regionärer Lymphknoten ist positiv
	N1b	zwei oder drei regionäre Lymphknoten sind positiv
	N1c	Tumorablagerungen in der Subserosa, im Mesenterium sowie im nicht-peritonealisierten perikolischen oder perirektalen/mesorektalen Gewebe (ohne positive regionäre Lymphknoten)
N2		
	N2a	vier bis sechs regionäre Lymphknoten sind positiv
	N2b	sieben oder mehr regionäre Lymphknoten sind positiv

Tabelle 2.4: TNM-Klassifikation: Fernmetastasen (M) (38, 39)

M0		keine Fernmetastasen
M1		
	M1a	Metastasen auf ein Organ beschränkt (ohne peritoneale Metastasen)
	M1b	Metastasen in zwei oder mehr Organen (ohne peritoneale Metastasen)
	M1c	Metastasen im Peritoneum, mit oder ohne Befall anderer Organe

Tabelle 2.5: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (2)

UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1/N2	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/T4	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

2.1.6 Therapie

Grundsätzlich unterscheidet sich die Therapie des nicht-metastasierten KRK von der Therapie des metastasierten KRK. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Behandlung von rechtsseitigen und linksseitigen Tumoren.

Das nicht-metastasierte Kolonkarzinom wird in kurativer Intention primär chirurgisch behandelt. Die weitere Therapie orientiert sich an der UICC-Klassifikation. Bei einem R0-resezierten Kolonkarzinom im Stadium I wird keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Liegt ein Stadium II vor, soll eine adjuvante Chemotherapie, bevorzugt mit Fluoropyrimidinen als Monotherapie, nur bei Vorliegen bestimmter Risikofaktoren erfolgen. Dazu zählt das Stadium T4, eine stattgehabte Perforation bzw. ein Einriss des Tumors, eine Operation unter Notfallbedingungen sowie eine zu geringe Anzahl an untersuchten Lymphknoten. Zudem soll zuvor der Mikrosatellitenstatus untersucht werden. Bei einer nachgewiesenen MSI soll im Stadium II nur die operative Resektion erfolgen. Eine adjuvante Chemotherapie wird nicht empfohlen. Im Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin in Kombination mit Folinsäure und 5-Fluorouracil (5-FU) indiziert (2).

Auch die Therapie des nicht-metastasierten Rektumkarzinoms ist primär chirurgisch. Im Gegensatz zum Kolonkarzinom ist das Rektumkarzinom sensitiv für die Strahlentherapie (40). Bei den UICC-Stadien II und III ist bei Tumoren des unteren und mittleren Rektumdrittels eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder eine Kurzzeit-Radiotherapie indiziert. Je nach UICC-Stadium und in Abhängigkeit von vorliegenden Risikofaktoren für ein Lokalrezidiv kann im Anschluss an die operative Therapie eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (2).

Primäres Ziel bei der Therapie des metastasierten KRK ist die maximal mögliche Tumorreduktion. Ist die Prognose günstig und handelt es sich um eine primär resektable Metastasierung, wird zunächst die Metastasenresektion angestrebt. Sind diese Voraussetzungen nicht gegeben, wird in erster Linie eine systemische Chemotherapie durchgeführt. Typische Behandlungsschemata zeigt die Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Typische Behandlungsschemata in der Erstlinienchemotherapie.
Abkürzung: 5-FU, 5-Fluorouracil (2)

FOLFOX	Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin
FOLFIRI	Folinsäure, 5-FU und Irinotecan
FOLFOXIRI	Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan
CAPOX	Capecitabin und Oxaliplatin

Ob zusätzlich zielgerichtete Substanzen verabreicht werden, ist abhängig vom Therapieziel, von den molekularbiologischen Eigenschaften des Tumors sowie zum Teil auch von der Lage des Primarius. Alle metastasierten KRK sollen noch vor Einleitung der Therapie molekularbiologisch untersucht werden (2). Gefahndet wird nach Mutationen in den *RAS*-Genen (z.B. *KRAS*) sowie in *BRAF*. Außerdem wird geprüft, ob eine defiziente Mismatch-Reparatur (dMMR) oder eine hochgradige MSI vorliegt (2, 17). Entsprechend werden in der Erstlinie bei gutem Allgemeinzustand unterschiedliche Therapien eingeleitet (siehe Tabelle 2.7). EGFR-Inhibitoren kommen ausschließlich beim *RAS*-Wildtyp zur Anwendung (2). Einige Patientinnen und Patienten profitieren von der zusätzlichen Gabe des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab, der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtet ist und antiangiogenetisch wirkt (41-43). Bei reduziertem Allgemeinzustand werden in der Erstlinientherapie gewöhnlich Fluoropyrimidin-Monotherapien in Kombination mit Bevacizumab eingesetzt (2).

Tabelle 2.7: Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms bei gutem Allgemeinzustand in Abhängigkeit von der Molekularbiologie des Tumors.

Chemotherapie-Doublette: FOLFOX, FOLFIRI oder CAPOX; Chemotherapie-Triplette: FOLFOXIRI. Abkürzungen: HER-2, „human epidermal growth factor receptor 2“; RAS, „rat sarcoma“ (2)

RAS-Wildtyp	linksseitiges Karzinom: Chemotherapie-Doublette plus anti-EGFR-Substanz (Cetuximab oder Panitimumab) rechtsseitiges Karzinom: Chemotherapie-Doublette mit oder ohne Bevacizumab
RAS-Mutation	Chemotherapie-Doublette mit oder ohne Bevacizumab
BRAF-Mutation	Chemotherapie-Triplette mit oder ohne Bevacizumab
HER-2-Amplifikation	Behandlung gemäß RAS- und BRAF-Mutationsstatus

Bei ca. 5 % aller metastasierten KRK handelt es sich um Tumore mit einer dMMR oder einer hochgradigen MSI (MSI-H) (17). Laut aktueller Leitlinie wird in diesen Fällen die Erstlinientherapie gemäß dem RAS-Mutationsstatus empfohlen. Erst in späteren Therapielinien soll geprüft werden, ob Immun-Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt werden können (2). Mittlerweile sind für die Therapie des KRK drei Immun-Checkpoint-Inhibitoren zugelassen: Die PD-1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab sowie der CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab, der in Kombination mit Nivolumab verabreicht wird (29, 44). Durch den Einsatz dieser Substanzen konnte das mediane Überleben deutlich gesteigert werden. In der Phase 2 KEYNOTE-164 Studie erhielten 124 Patientinnen und Patienten mit bereits vorbehandeltem MSI-H/dMMR metastasierten KRK Pembrolizumab. Das mediane Überleben betrug 31,4 Monate (17, 45). Bei der großen Mehrheit der KRK handelt es sich jedoch um Tumore mit pMMR, niedriger MSI (MSI-L) oder MSS. Hier zeigen die bisher bekannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren keine Wirkung (29, 46).

Neben medikamentösen Therapien existieren auch lokal ablativ oder lokoregionär wirksame Verfahren. Als Beispiel ist die selektive interne Radioembolisation (SIRT) zu nennen, die etwa bei der Behandlung disseminierter Lebermetastasen zum Einsatz kommt (2).

2.2 Onkolytische Virotherapie

2.2.1 Historie

Das Potenzial von Viren für die Bekämpfung von Tumoren ist schon lange bekannt. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben Fallberichte Zusammenhänge zwischen natürlichen Virusinfektionen und Regressionen von Krebserkrankungen. Insbesondere bei jungen Leukämie- und Lymphompatientinnen und -patienten mit einem supprimierten Immunsystem wurden nach durchgemachten Virusinfektionen kurzzeitige Remissionen beobachtet (3, 47). Eine konkrete Vorstellung von der wahren Natur der Viren hatte man zu dieser Zeit noch nicht. Erst im Jahr 1939 gelang es, elektronenmikroskopische Bilder von Viren aufzunehmen (3). Bis ins frühe 20. Jahrhundert wurden Tumore chirurgisch behandelt. Schließlich hielten mit der Chemo- und der Radiotherapie neue Behandlungsmöglichkeiten Einzug. Dennoch konnten nicht immer zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Das hatte zur Folge, dass sich die Forschung verstärkt onkolytischen Viren zuwandte (3). Die Etablierung von ex-vivo Zellkulturen im Jahr 1948 ermöglichte es, die onkolytische Wirkung von Viren in Mausmodellen zu untersuchen (3, 48). In den folgenden Jahrzehnten wurden auch zahlreiche klinische Studien mit verschiedenen Viren durchgeführt. Hierzu zählten zum Beispiel Adeno- und Hepatitisviren sowie das Mumpsvirus und das West-Nil-Virus (3, 47). Die onkolytische Wirkung in vivo war nur schwach ausgeprägt, denn das Immunsystem der Patientinnen und Patienten reagierte auf die Infektion mit einer baldigen Viruselimination. Außerdem waren teils

schwerwiegende Nebenwirkungen wie Enzephalitiden zu verzeichnen (3). Einen Aufschwung erlebte die Erforschung onkolytischer Viren mit der standardmäßigen Anwendung rekombinanter DNA-Technologien Anfang der 1990er Jahre. Durch Veränderungen von Virusgenomen konnte eine neue Generation onkolytischer Viren generiert werden, die in der Anwendung sicherer und spezifischer waren. Im Fokus standen dabei vor allem Adeno-, Herpes-, Paramyxo-, Picorna- und Pockenviren (3). Das erste genetisch modifizierte Virus, das beim Menschen Anwendung fand, war das Adenovirus dl1520 (ONYX-015). Es repliziert sich selektiv in Zellen, in denen das Tumorsuppressorgen *p53* inaktiv ist. Mit dl1520 wurde 1998 auch der erste klinische Versuch zur Kombination von onkolytischer Virotherapie und Chemotherapie gestartet. Patientinnen und Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren erhielten neben der intratumoralen Injektion von dl1520 auch intravenöse Injektionen von Cisplatin und 5-FU. Die Ergebnisse waren vielversprechend. Bei einer unveränderten Nebenwirkungsrate zeigte die Kombinationstherapie eine signifikant höhere Ansprechrate als die alleinige Chemotherapie (47). Im Jahr 2005 wurde in China mit dem genetisch modifizierten Adenovirus H101 (Oncorine) das erste onkolytische Virus zugelassen (3, 47, 49, 50). In Kombination mit Chemotherapeutika wird es zur Therapie von Nasopharynxkarzinomen eingesetzt. Oncorine verstärkt die Wirkung des Chemotherapeutikums, ohne zu einer Zunahme zytotoxisch bedingter Nebenwirkungen zu führen. Darüber hinaus stimuliert es die antitumorale Immunantwort. Es gibt Hinweise, dass die Effektivität von Oncorine durch die Kombination mit Immuntherapien noch weiter gesteigert werden kann (50). 2015 erfolgte die Zulassung von Talimogene laherparepvec (T-VEC), einem genetisch modifizierten Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1). Zum Einsatz kommt es bei der Behandlung des malignen Melanoms (51). Das Genom von T-VEC ist so verändert, dass sich das Virus selektiv in Tumorzellen repliziert und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) exprimiert (52). Im Rahmen klinischer Studien sind mittlerweile tausende Krebspatientinnen und -patienten mit verschiedenen onkolytischen Viren behandelt worden. Insgesamt erwies sich die Therapie als sicher und verträglich. Beobachtet wurden lediglich leichte Nebenwirkungen in Form von grippeähnlichen Symptomen (5).

2.2.2 Parvovirus H-1

H-1PV gehört zur Familie der Parvoviridae und zur Unterfamilie der Parvovirinae (siehe Abbildung 2.4).

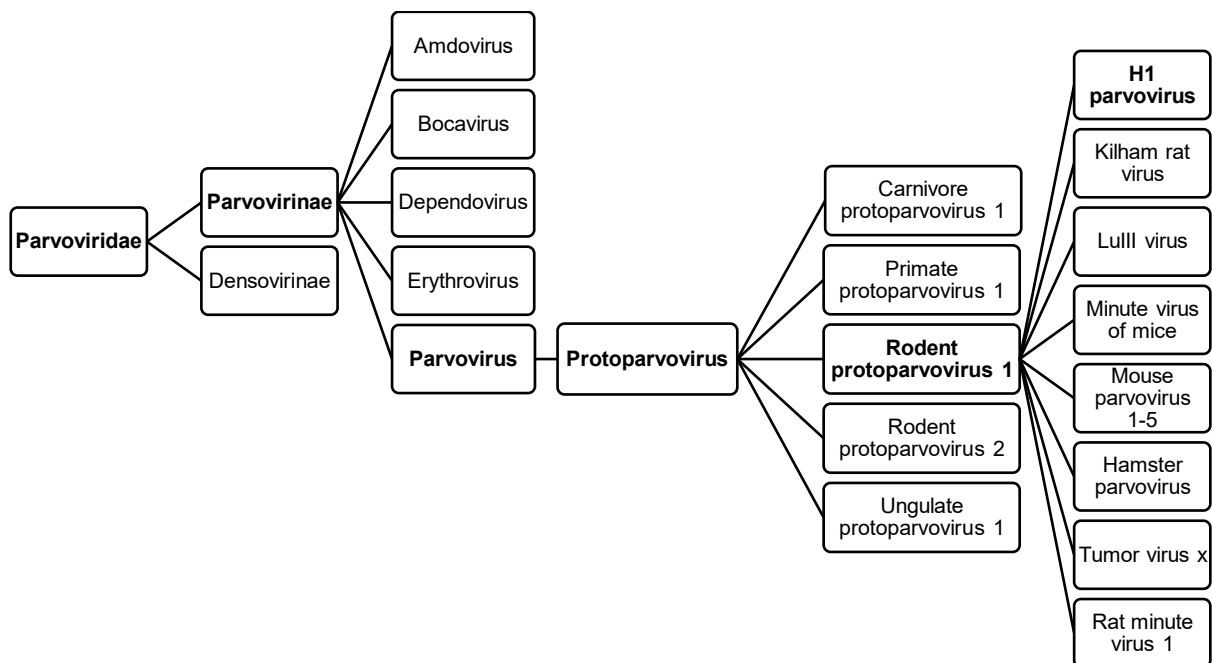


Abbildung 2.4: Taxonomie von H-1PV. Abkürzung: H-1PV, Parvovirus H-1 (4)

H-1PV ist ein unbehülltes, ikosaedrisches Virus mit einem Durchmesser von 23-28 nm. Es weist ein lineares, einzelsträngiges DNA-Genom (ssDNA) mit einer Länge von ca. 5000 Nukleotiden auf (5, 53-57). Das Genom setzt sich aus zwei Transkriptionseinheiten zusammen (siehe Abbildung 2.5). Eine Transkriptionseinheit kodiert für Nichtstrukturproteine (NS), die unter anderem für die Virusreplikation essenziell sind. Die andere Transkriptionseinheit kodiert für Strukturproteine (VP), die das Kapsid formen. Die Expression der viralen Gene wird durch die zwei Promotoren P4 und P38 geregelt. Während der Promotor P4 die Expression der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 kontrolliert, reguliert der Promotor P38 die Produktion der Kapsidproteine VP1 und VP2 (5, 54, 55, 57).

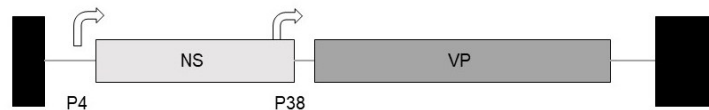


Abbildung 2.5: Genom von H-1PV. Abkürzungen: P, Promotor; NS, Nichtstrukturprotein; VP, Kapsidprotein (55)

Der natürliche Wirt von H-1PV ist die Ratte (5, 58, 59). Das Virus ist nicht humanpathogen, verursacht beim Menschen also keine Krankheitssymptome. Dennoch können humane Zellen infiziert werden (5, 7, 8, 54). Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle wird das virale Genom autonom im Zellkern repliziert. Die Replikation ist dabei von vielen zellulären Faktoren abhängig und kann nur während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus stattfinden (5, 54, 55, 58, 60). Das Virus kann die S-Phase jedoch nicht selbst induzieren (5, 60). Das erklärt, wieso H-1PV sich vor allem in schnell teilenden Zellen, bevorzugt in Tumorzellen, repliziert. Der Onkotropismus beruht auch darauf, dass in Tumorzellen zahlreiche Signalkaskaden dysreguliert sind und so optimale Bedingungen für die Virusreplikation herrschen (7, 54, 55, 60). Im Anschluss an die Replikation und die Morphogenese erfolgt die Freisetzung der neu synthetisierten Viren. Die Wirtszelle wird dabei lysiert. Die freigesetzten Viren infizieren benachbarte Tumorzellen und der lytische Zyklus beginnt erneut (5).

Die Zytotoxizität von H-1PV wird hauptsächlich durch das Nichtstrukturprotein NS1 vermittelt (5, 57). Die alleinige Expression von NS1 ist ausreichend, um über die Ansammlung radikaler Sauerstoffspezies die Apoptose zu induzieren (5, 54, 55). Die onkolytische Aktivität von H-1PV konnte bereits in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden (5, 58). Die Onkolyse funktioniert auch in Tumorzellen, die bereits Resistenzen gegen konventionelle und zielgerichtete Therapien entwickelt haben (7, 55). So kann H-1PV die Apoptose-Resistenz einiger Gliomzellen umgehen, indem es einen alternativen, durch Cathepsine vermittelten Zelltod induziert (5, 55, 61, 62).

2.3 Das humane Immunsystem

Das humane Immunsystem ist ein komplexes, interaktives Netzwerk aus lymphatischen Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen (63). Es besitzt die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Neben exogenen Krankheitserregern wie Bakterien oder Viren können auch endogene, entartete Zellen wie Tumorzellen erkannt und eliminiert werden (64, 65). Grundsätzlich wird zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort differenziert. Beide Systeme arbeiten eng zusammen und bestehen jeweils aus zellulären und humoralen Komponenten. Unterschiede zeigen sich sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch hinsichtlich der Geschwindigkeit der Immunantwort. Während die angeborene Immunität innerhalb von Minuten reagiert, nimmt die Aktivierung der adaptiven Immunität mit mehreren Stunden bis Tagen deutlich mehr Zeit in Anspruch (63, 65, 66).

2.3.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

2.3.1.1 Angeborenes Immunsystem

Der Mensch ist ständig von potenziellen Pathogenen umgeben. Sie werden inhaliert, verschluckt oder besiedeln Haut und Schleimhäute (63, 67). Ob ein Mikroorganismus eine Erkrankung verursacht, hängt neben der Pathogenität des Erregers auch maßgeblich von der Integrität des Immunsystems ab (63). Es existieren zahlreiche Schutzmechanismen, die das Eindringen von Krankheitserregern verhindern. Eine erste Abwehrlinie stellt die physikalische Barriere von Haut und Schleimhäuten dar. Die Atemwege sind mit einem zilienträgenden Epithel ausgekleidet. Koordinierte Bewegungen der Zilien ermöglichen den Abtransport von potenziellen Krankheitserregern. Oberflächenepithelien bilden aber auch eine chemische Barriere gegen Infektionen, indem sie antimikrobiell wirksame Substanzen produzieren. Dazu zählen neben Enzymen wie Lysozym, das die Zellwände von Bakterien abbaut, auch Peptide wie Defensine, die die Zellmembranen von Bakterien lysieren. Unterstützend wird das Komplementsystem aktiviert. Ziel ist auch hier das Abtöten von Krankheitserregern – durch die Lyse von Membranen, die Unterstützung der Phagozytose durch Opsonisierung sowie das Auslösen einer Entzündungsreaktion.

Auf der nächsten Ebene der Abwehr werden die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Sie exprimieren Mustererkennungsrezeptoren, welche pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen. PAMPs sind charakteristisch für zahlreiche Mikroorganismen, auf körpereigenen Zellen sind sie hingegen nicht zu finden. Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort zählen dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und NK-Zellen. Als umfangreichste und wichtigste Zellpopulation gelten neutrophile Granulozyten. Sie phagozytieren Mikroorganismen und zerstören diese in intrazellulären Vesikeln. Auch Makrophagen zählen zu den phagozytierenden Zellen. Sie produzieren zudem zahlreiche Entzündungsmediatoren, die wiederum andere Immunzellen aktivieren. Eosinophile und basophile Granulozyten spielen neben Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten (65). Eine weitere wichtige Zellpopulation der angeborenen Immunität sind große granulierte NK-Zellen, die den Lymphozyten ähneln, im Gegensatz zu diesen aber keine antigenspezifischen Rezeptoren exprimieren (65). Sie erkennen und eliminieren sowohl virusinfizierte Zellen als auch Tumorzellen. Reguliert wird ihre Aktivität vom Wechselspiel zwischen keimbahnkodierten aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren (65, 67). Letztere dienen dem Schutz gesunder, körpereigener Zellen. Die Interaktion zwischen inhibierenden Rezeptoren und MHC-Klasse-I-Molekülen verhindert, dass eine NK-Zelle ihre Zielzelle lysiert. Infektionen und maligne Entartungen führen in der Regel zu einer verringerten Präsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen („missing self“). Daraus resultiert eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass die NK-Zelle ihre Zielzelle zerstört. Die aktivierenden Oberflächenrezeptoren erkennen durch metabolischen Stress induzierte Oberflächenproteine auf der Zielzelle („stress-induced self“). Die Stimulation der aktivierenden Oberflächenrezeptoren führt dazu, dass die NK-Zelle zytotoxische Granula freisetzt und damit den Tod der Zielzelle herbeiführt (63, 65-67). Darüber hinaus sezernieren aktivierte NK-Zellen proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ (Interferon- γ), TNF α (Tumornekrosefaktor α) und GM-CSF (65, 66).

2.3.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem richtet sich gezielt gegen spezifische Pathogene und verfügt darüber hinaus über ein immunologisches Gedächtnis. Der erneute Kontakt mit einem bereits bekannten Antigen induziert eine schnellere und effektivere Immunantwort. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen B- und T-Lymphozyten (64, 67).

B-Lymphozyten sind Teil der humoralen Komponente der adaptiven Immunantwort. Nach ihrer Aktivierung durch T-Helferzellen differenzieren sie sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (65, 67). Antikörper neutralisieren und opsonisieren Krankheitserreger und aktivieren das Komplementsystem (63, 65).

T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen spezifischen Rezeptor, den sog. T-Zell-Rezeptor (TCR). Dabei handelt es sich um ein Heterodimer, welches meist aus einer α - und einer β -Kette besteht und einen Komplex mit CD3-Molekülen bildet (68). Der TCR-Komplex erkennt und bindet Antigene, die über MHC-Moleküle präsentiert werden. Zu Beginn ihrer Ausreifung im Thymus exprimieren T-Zellen die als Korezeptoren fungierenden Oberflächenmoleküle CD4 und CD8. Im weiteren Verlauf findet eine Differenzierung in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen statt. T-Zellen, die mit ihrem TCR MHC-Klasse-I-Moleküle binden, entwickeln sich zu CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. T-Zellen, die MHC-Klasse-II-Moleküle erkennen, werden zu CD4⁺ T-Helferzellen (63, 67). CD8⁺ T-Zellen eliminieren sowohl virusinfizierte als auch entartete Zellen, indem sie durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula die Apoptose induzieren. CD4⁺ T-Helferzellen (T_H-Zellen) übernehmen vor allem Koordinationsaufgaben (67). Sie lassen sich anhand der Zytokine, die sie produzieren, in T_H1- und T_H2-Zellen einteilen. T_H-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort, indem sie B-Zellen aktivieren (63). Eine Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen sind regulatorische T-Zellen (T_{regs}) (69). Phänotypisch sind sie durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box P3) gekennzeichnet (67, 70, 71). T_{regs} spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz des Immunsystems (69). Sie unterdrücken physiologische und pathologische Immunantworten gegen körpereigene und körperfremde Strukturen. Damit verhindern sie die Entstehung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen (72). T_{regs} werden entweder im Thymus gebildet (nT_{regs}) oder entstehen in der Peripherie aus naïven T-Zellen (iT_{regs}) (67, 72, 73). Sie sezernieren immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF β und inhibieren die Produktion immunstimulierender Zytokine wie IL-2 und IFN- γ (72). Eine weitere Subpopulation der T-Zellen sind NKT-Zellen. Sie spielen eine wichtige verbindende Rolle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Früher wurden NKT-Zellen über die Expression des Zellmarkers NK1.1 definiert. Mittlerweile weiß man, dass NK1.1 nicht von allen NKT-Zellen exprimiert wird. Auch konnte der Zellmarker bei vielen T-Zellen als Aktivierungsmarker nachgewiesen werden. Heutzutage werden NKT-Zellen darüber definiert, dass sie mit ihrem TCR Lipide erkennen, die vom MHC-I-ähnlichen Molekül CD1d präsentiert werden (74).

2.3.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind Teil des angeborenen Immunsystems und zählen zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Sie nehmen Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie über MHC-Klasse-II-Moleküle an CD4⁺ T-Zellen (75, 76). In peripheren Geweben finden sich vor allem unreife dendritische Zellen (iDCs). Ihre Ausreifung wird insbesondere durch die Erkennung und Phagozytose von Pathogenen induziert, aber auch proinflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle. Reife dendritische Zellen (mDCs) wandern aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten ein. Ihre Aufgaben sind vielfältig – sie regeln die Phagozytose herab, steigern die Produktion von Zytokinen und erhöhen neben der Expression der antigenpräsentierenden MHC-Moleküle auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. MDCs aktivieren naïve T-Zellen und leiten so die adaptive Immunantwort ein. Damit sind sie Vermittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (67, 76, 77).

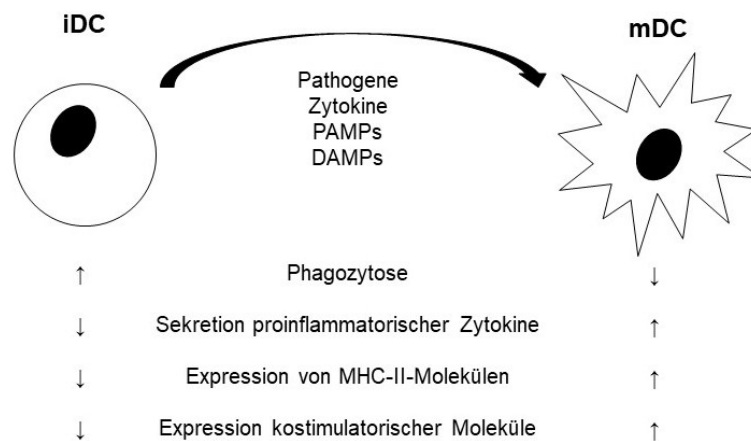


Abbildung 2.6: Unreife und reife dendritische Zellen. Abkürzungen: iDC, unreife dendritische Zelle; mDC, reife dendritische Zelle; MHC, „major histocompatibility complex“; DAMPs, Schaden-assoziierte molekulare Muster; PAMPs, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (78)

2.3.3 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe löslicher Proteine, die von vielen verschiedenen Immunzellen sezerniert werden. Sie sind als Mediatoren an der Immunantwort beteiligt, indem sie die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen dynamisch regulieren (79). Zu den Zytokinen zählen unter anderem Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF) und transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) (79, 80). Anhand ihres zellulären Ursprungs kann zwischen Typ1- und Typ2-Zytokinen differenziert werden. Zu den Typ1-Zytokinen, die von $CD4^+$ T_H1 -Zellen produziert werden, zählen IL-2, IL-12, IFN- γ und TGF β . Typ2-Zytokine werden von $CD4^+$ T_H2 -Zellen sekretiert. Hierzu gehören IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Eine weitere Einteilung beruht auf der Funktion der Zytokine (siehe Tabelle 2.8). Während einige proinflammatorisch wirken, weisen andere antiinflammatorische Eigenschaften auf. Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählen Interferone, IL-1 β , IL-8, IL-12 und TNF α . Antiinflammatorisch wirken IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, IL-1RA (IL-1 Rezeptoragonist) und TGF β . Daneben gibt es einige Zytokine, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen aufweisen. Als Beispiel sind IL-6 und TNF α anzuführen (79).

Tabelle 2.8: Ausgewählte Zytokine, ihr Ursprung und ihre Funktion. Abkürzungen: IFN, Interferon; IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor (67, 79)

	Zytokintyp	Ursprung	Funktion
IFN-γ	proinflammatorisch	Makrophagen, T_H1 -Zellen, B-Zellen, NK-Zellen	fördert die T_H1 vermittelte Immunantwort und die zelluläre Immunität, aktiviert Makrophagen
TNFα	proinflammatorisch	Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen, T- und B-Zellen	aktiviert neutrophile Granulozyten, Akutphase
IL-2	proinflammatorisch	T-Zellen	T-Zell-Proliferation
IL-6	proinflammatorisch und antiinflammatorisch	T- und B-Zellen, Monozyten	induziert Akute-Phase Antwort und adaptive Immunantwort, inhibiert TNF und IL-1 Produktion von Makrophagen

Literaturdiskussion

IL-10	antiinflammatorisch	Monozyten/Makrophagen, T- und B-Zellen	inhibiert Monozyten/Makrophagen, inhibiert T _H -1 Antwort
TGFβ	antiinflammatorisch	T-Zellen, NK-Zellen, DCs	inhibiert Wachstum und Aktivität von Leukozyten, induziert T _{regs}

2.3.4 Allgemeine Tumorimmunologie

Die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem wird als Immunoediting bezeichnet und kann in die drei Phasen Eliminierung, Gleichgewicht und Entkommen unterteilt werden (siehe Abbildung 2.7). In der Eliminierungsphase arbeiten angeborenes und adaptives Immunsystem gemeinsam an der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen (81). Für die Antitumor-Immunantwort sind insbesondere zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen verantwortlich. CD8⁺ T-Zellen erkennen von Tumorzellen exprimierte MHC-I-Moleküle und leiten über verschiedene Mechanismen die Zerstörung entarteter Zellen ein. CD4⁺ T-Helferzellen fördern die Aktivierung, Proliferation und Gedächtnisfunktion zytotoxischer T-Zellen. Darüber hinaus erhöhen sie die Antigenpräsentation von DCs. Neben den Effektor-T-Zellen zählen auch DCs, NK-Zellen und NKT-Zellen zu den Zellen der antitumoralen Immunantwort (69, 81). Im Rahmen des Untergangs von Tumorzellen werden Gefahrensignale ausgeschüttet, die durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine proinflammatorische Immunantwort induzieren können. Bis zu einem gewissen Grad sind Entzündungsreaktionen von Vorteil für die Eradikation von Tumorzellen. Zu starke Entzündungsreaktionen führen jedoch dazu, dass in einer Art negativer Rückkopplung die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine stimuliert und somit die Tumorprogression gefördert wird (81). Gelingt die Eliminierung der Tumorzellen nicht vollständig, kommt es zur sogenannten Gleichgewichtsphase. In dieser Phase, die mehrere Jahre andauern kann, verhindert das adaptive Immunsystem ein Tumorwachstum (64). In der dritten Phase, der Entkommensphase, verliert das Immunsystem schließlich die Kontrolle und der Tumor wird klinisch erkennbar (6, 64, 81, 82).

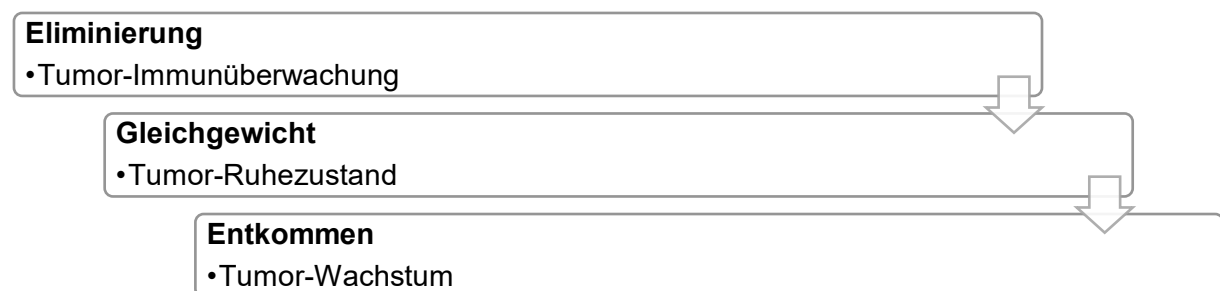


Abbildung 2.7: Der Prozess des Immunoediting (64)

2.3.5 Kolorektales Karzinom und das Immunsystem

Wie viele andere Tumorentitäten, schafft auch das KRK ein immunsuppressives Mikromilieu (siehe Abbildung 2.8). Die Immunantwort wird in Richtung von CD4⁺ T_H2-Zellen verlagert, die für die humorale Abwehr verantwortlich sind. In der Konsequenz werden vermehrt Zytokine mit immunsuppressiven Eigenschaften sezerniert. Der Anteil an CD4⁺ T_H1-Zellen, die für die zelluläre Immunabwehr zuständig sind, ist hingegen reduziert. Das hat zur Folge, dass über eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine weniger NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden. Einen großen Teil zur

tumorinduzierten Immunsuppression tragen auch MDSCs und T_{regs} bei (83). Im Rahmen der Progression von Tumorerkrankungen wird eine Zunahme dieser suppressiven Immunzellen beobachtet (84, 85).

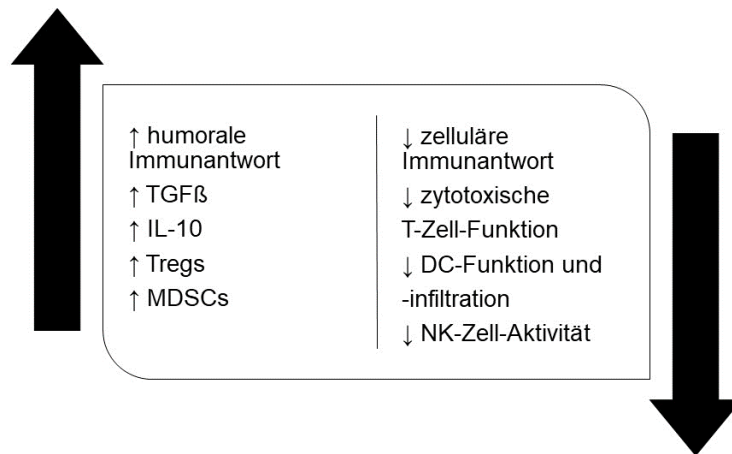


Abbildung 2.8: Immunologische Faktoren, die mit einer ungünstigen Prognose des kolorektalen Karzinoms einhergehen. Abkürzung: T_{regs}, regulatorische T-Zellen (83)

Beim KRK beruhen die immunsuppressiven Eigenschaften von MDSCs insbesondere auf ihrer Fähigkeit, die T-Zell-Proliferation zu inhibieren und die Entwicklung von T_{regs} zu stimulieren (84). T_{regs} können die Antitumor-Immunantwort durch verschiedene Mechanismen supprimieren. Sie sekretieren antiinflammatorische Zytokine, Perforine und Granzyme, welche antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen und T-Zellen inhibieren oder abtöten. Durch die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors entziehen sie das proinflammatorische Zytokin IL-2 aus dem Tumormikromilieu (86). Darüber hinaus exprimieren T_{regs} hohe Levels an CTLA-4 und PD-1 auf ihrer Oberfläche. Die Interaktion von CTLA-4 mit seinen Liganden CD80 und CD86 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen bewirkt eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung. Auch PD-1 fungiert als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung. Die Bindung von PD-L1 an PD-1 inhibiert die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen, induziert die Apoptose tumorinfiltrierender T-Zellen und fördert die Differenzierung von T_{regs}. Mit Ipilimumab (CTLA-4-Inhibitor) und Nivolumab (PD-1-Inhibitor) existieren bereits Immuntherapien, die in die Steuerung der T-Zell-Aktivierung eingreifen (85). Die beiden Checkpoint-Inhibitoren sind mittlerweile für die Behandlung von zahlreichen fortgeschrittenen Tumorentitäten zugelassen. Auch beim metastasierten KRK kommen sie zum Einsatz, sofern entweder eine defiziente Mismatch-Reparatur (dMMR) oder eine hohe MSI (MSI-H) vorliegt (87). Insbesondere CMS1-Tumore, die durch eine stark immunogene Tumormikroumgebung und eine Hochregulierung von CTLA-4, PD-1 und PD-L1 gekennzeichnet sind, stellen optimale Kandidaten für eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren dar (88).

2.3.6 Onkolytische Viren und das Immunsystem

Onkolytische Viren besitzen immunstimulierende Eigenschaften. Sie sind dazu befähigt, den immunogenen Zelltod hervorzurufen, eine spezielle Form der Apoptose. Im Rahmen der Lyse von Tumorzellen werden neben tumorassozierten Antigenen (TAAs) auch DAMPs freigesetzt. Diese werden von antigenpräsentierenden Zellen erkannt und eine effektive Antitumor-Immunantwort wird induziert. Des Weiteren zieht die Infektion mit onkolytischen Viren eine Entzündungsreaktion nach sich, in deren Folge es zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen kommt (siehe Abbildung 2.9). Insgesamt können so systemische und langanhaltende Immunantworten hervorgerufen werden, auch bei fortgeschrittenen Tumoren (6).

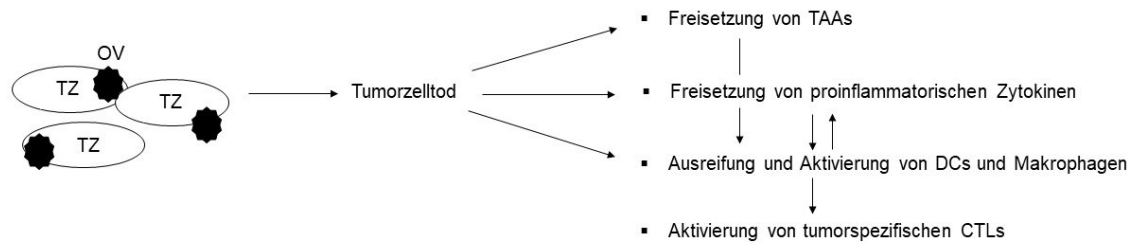


Abbildung 2.9: Onkolytische Viren und die Antitumor-Immunantwort. Abkürzungen: CTL, zytotoxischer T-Lymphozyt; OV, onkolytisches Virus; TAA, Tumor-assoziierte Antigene; TZ, Tumorzelle (7)

Die immunmodulatorischen Eigenschaften onkolytischer Viren konnten bereits in einigen klinischen Studien gezeigt werden. Ein Beispiel ist das bereits erwähnte modifizierte Herpes-simplex-Virus T-VEC. In einer Phase-III-Studie mit Melanompatientinnen und -patienten erhöhte T-VEC die Anzahl melanomspezifischer $CD8^+$ T-Zellen. Gleichzeitig nahm die Zahl an T_{regs} und MDSCs ab (6, 51, 52). Ähnliches konnte auch für H-1PV gezeigt werden. In der Kokultur von Melanomzellen mit DCs stimulierte die H-1PV induzierte Zelllyse die Ausreifung und Aktivierung von DCs. Daneben wurden vermehrt Zytokine wie IL-6 und $TNF\alpha$ produziert. Reife DCs waren dazu in der Lage, antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren, was wiederum in einer erhöhten Freisetzung von $IFN-\gamma$ resultierte (5, 89). In klinischen Studien mit Patientinnen und Patienten mit Glioblastom konnte, anhand der Serumspiegel von Zytokinen, gezeigt werden, dass H-1PV die Aktivität von T_{regs} supprimiert. Gleichzeitig wurde die Aktivierung von $CD8^+$ - und $CD4^+$ T-Zellen sowie von tumorassoziierten Makrophagen gefördert (10, 85).

3 Material

3.1 Lösungsmittel und Chemikalien

3.1.1 Lösungsmittel

Ampuwa Spüllösung (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi Deutschland
DMSO	Roth, Karlsruhe

3.1.2 Chemikalien

Desderman Desinfektionsmittel	Schülke, Norderstedt
DMEM + GlutaMAX	Gibco Life Technologies, UK
FBS	Gibco Life Technologies, UK
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
Ham's F-12 Medium	Biochrom GmbH, Berlin
HCl	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco Life Technologies, UK
MTT	Biomol GmbH, Hamburg
PBS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, UK
RPMI Medium 1640	Gibco Life Technologies, UK
SDS	Roth, Karlsruhe
Terralin Liquid Desinfektionsmittel	Schülke, Norderstedt
TMB	Thermo Fisher Scientific, USA
Trypanblau	Gibco Life Technologies, UK
Trypsin	Gibco Life Technologies, UK
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

3.2 Zelllinien, PBMCs und Virusstamm

3.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Ursprung	Medium
LS1034 (CMS2)	Dukes' Typ C Kolon Adenokarzinom	ATCC, USA isoliert aus dem Tumorgewebe eines 54-jährigen kaukasischen Mannes (1989)	RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S

Material

NCI-H508 (CMS2)	Kolon Adenokarzinom	ATCC, USA isoliert aus dem Tumorgewebe eines 55-jährigen kaukasischen Mannes	RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S
CL-34 (CMS3)	Kolon Adenokarzinom	DSMZ, Braunschweig isoliert aus dem Tumorgewebe einer Frau mit einem moderat differen- zierten primären Adenokarzinom des rechten Kolons (TNM-Stadium 2)	40 % DMEM + 40 % Ham's + 20 % FBS + 1 % P/S
HT115 (CMS3)	Kolon Adenokarzinom	Sigma-Aldrich, USA	DMEM + 15 % FBS + 1 % L- Glutamin + 1 % P/S

3.2.2 PBMCs

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

3.2.3 Virusstamm

wt Parvovirus H1

DKFZ Heidelberg

Prof. J. Rommelaere

3.3 Antikörper und Zytokine

3.3.1 Antikörper

Anti-CD3	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Anti-CD28	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Anti-CD3, FITC-konjugiert (SK7)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD3, PerCP-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD4, PE-Cy7-konjugiert (RPA-T4)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD4, PerCP-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD8, FITC-konjugiert (HIT8A)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD8, PE-konjugiert	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD11b, APC-konjugiert (ICRF44)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD14, FITC-konjugiert (M5E2)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD33, PE-Cy7-konjugiert (P67.6)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD56, PE-konjugiert (NCAM16.2)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD57, APC-konjugiert (NK-1)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD69, APC-konjugiert (FN50)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Material

Anti-FoxP3, PE-konjugiert (259D/C7)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-GranB, FITC-konjugiert (GB11)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-HLA-DR, PE-konjugiert (G46-6)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

3.3.2 Zytokine

IL-2	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
------	-------------------------------------

3.4 Medien, Puffer, Lösungen und Kits

3.4.1 Medien für Zellkulturen

Sämtliche Medien wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. FBS wurde vor seiner Verwendung für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Medium für LS1034 und NCI-H508

RPMI Medium 1640	500 ml
FBS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium für CL-34

DMEM + GlutaMAX	250 ml
Ham's F-12 Medium	250 ml
FBS	20 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Medium für HT115

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FBS	15 %
L-Glutamin	1 % (200 mM)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Einfriermedium für Zellen

FBS	90 %
DMSO	10 %

3.4.2 Puffer und Lösungen

Stopp-Lösung (MTT)

SDS	10%
in 0,01 M HCl	

FACS-Puffer (FACS)

1x PBS	
FBS	5 %

Waschpuffer (ELISA)

Destilliertes Wasser	90 %
10x PBS	10 %
Tween 20	0,05 %

Coating-Puffer (ELISA)

Destilliertes Wasser	90 %
10x Coating Puffer	10 %

Elispot (ELISA)

Destilliertes Wasser	80 %
5x Elispot Lösung	20 %

3.4.3 Kits

„Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set“ (FACS)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
ELISA Kits	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
„ProcartaPlex Multiplex Immunoassay“ Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific

3.5 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 96-Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips (5 ml, 20 ml, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Costar Assay Platte, 96-Well	Corning, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

Material

Glaspasteurpipetten	Hand-Magnetplattenwaschgerät
VWR, Darmstadt	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Kryoröhrchen (1 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrilhandschuhe	Abena, Zörbig
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	A. Hartenstein, Würzburg
	Eppendorf, Hamburg
SealPlate Film	Sigma-Aldrich, USA
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	SPL Life Sciences, Korea

3.6 Geräte

Autoklav Systec V-75	Systec, Linden
Binokular Mikroskop	Buddeberg, Mannheim
CO ₂ -Inkubator	Hereaus, München
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Hamburg
ELISA-Reader X-Fluor	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Gefrier- und Kühlschränke -20/4 °C	Bauchknecht, Stuttgart
	Liebherr, Bulle
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, USA
Sicherheitsschrank FWF90	Köttermann
Platten-Waschgerät	Tecan Trading AG, Schweiz
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette (für 8 Spitzen)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten 10 µl – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Limburg
	VWR, Darmstadt
Pipettierhelfer	Accu-jet Pro, Brand, Wertheim
	Hirschmann, Eberstadt

Material

Rollschüttler	A. Hartenstein, Würzburg
Sterilwerkbank	Clean Air, Deutschland
Stickstoffbehälter Arpego 40	Air Liquide, Marne-la-Vallée
Vakuum-Absauganlage	KNF Neuberger, Freiburg
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Sigma 3-18 K, Fisher Bioblock Scientific Hereaus, München

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Durchführung sämtlicher Zellkulturarbeiten erfolgte an einer sterilen Werkbank und unter sterilen Bedingungen. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank mit 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Zum Einsatz kamen dabei Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm². In der Regel wurden die Zellen alle 3 bis 4 Tage passagiert und im Anschluss mit frischem Zellkulturmedium weiter kultiviert.

4.1.2 Passagieren adhärenter Zellen

Vorab wurden alle erforderlichen Kulturmedien im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und verworfen. Es folgte die Zugabe von 7 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), welche in den Zellkulturflaschen verteilt und sodann wieder abgesaugt wurde. Dieser Waschgang diente neben der Entfernung toter bzw. nicht mehr adhärenter Zellen auch der Entfernung von Medienresten. Danach wurde 4 ml 1%ige Trypsinlösung in die Zellkulturflaschen pipettiert und 3 bis 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen abgelöst hatten. War das der Fall, erfolgte die Zugabe von 8 ml des jeweiligen Zellkulturmediums. Die Zellsuspension wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung mit neuem Medium ausgesät.

4.1.3 Passagieren semi-adhärenter Zellen

Im Prinzip erfolgte die Passage der semi-adhärenter Zellen genauso wie bei den adhärenter Zellen. Der einzige Unterschied bestand darin, dass das alte Zellkulturmedium nicht verworfen, sondern in ein Falcon überführt wurde. Später wurde es dazu verwendet, den durch Trypsin induzierten Ablöseprozess abzustoppen. So war es möglich, die nicht-adhärenter Zellen bei der Passage nicht zu verlieren.

4.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration

Im Anschluss an die Zentrifugation im Rahmen der Passage der Zellen erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau gefärbt. Nach einer ca. einminütigen Inkubation wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension auf das Zählkammerfeld einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe eines binokularen Mikroskops wurden alle vitalen Zellen innerhalb der vier Großquadrate gezählt. Tote Zellen waren zuvor durch das Trypanblau eingefärbt worden, sodass sie von vitalen Zellen differenziert und bei der Zählung vernachlässigt werden konnten. Nach der Auszählung erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration mittels folgender Formel: $\text{Zellen/ml} = (\text{Zellzahl der 4 Großquadrate}/4) \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$.

4.1.5 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung stellt eine Möglichkeit zur längerfristigen Lagerung von Zellen dar. Im Rahmen des Einfrierprozesses können sich Eiskristalle bilden, sowohl in den Zellen selbst als auch im umgebenden Medium. Um solche kältebedingten Zellschäden zu vermeiden, wurde ein bestimmtes Einfriermedium verwendet. Dieses setzte sich aus 90 % inaktiviertem fetalen Kälberserum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), einer kryoprotektiven Substanz, zusammen (90).

Die kolorektalen Tumorzellen wurden nach dem Ablösen gezählt (siehe 4.1.4). Anschließend wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Für mindestens 24 Stunden wurden diese in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierkammer bei -80 °C gelagert. So konnte sichergestellt werden, dass die Zellen gleichmäßig und kontrolliert einfrieren, ohne dass sich zellschädigende Kristalle bildeten. Die dauerhafte Lagerung der Tumorzellen erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

4.1.6 Auftauen kryokonservierter Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und zunächst schonend in der Hand angewärmt. Die kryoprotektive Substanz DMSO wirkt bei Temperaturen über 4 °C zytotoxisch (91). Daher wurde die Zellsuspension schon kurz vor der Vollendung des Auftauprozesses in 5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums aufgenommen und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet im jeweiligen Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Eine Besonderheit galt dabei für die Zelllinie CL-34. Hier wurden die Zellkulturflaschen vor der Zugabe der aufgetauten Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden 15 μl Poly-L-Lysin (10 mg/ml) in 10 ml destilliertes Wasser pipettiert, in die Zellkulturflasche gegeben und für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgten zwei Waschgänge mit destilliertem Wasser. Dann erst wurden die Zellen sowie das entsprechende Zellkulturmedium zugegeben. Bei allen kolorektalen Tumorzellen erfolgte 24 Stunden nach dem Auftauen ein erster Mediumwechsel.

4.1.7 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay kann die metabolische Aktivität von Zellen gemessen werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde so untersucht, welchen Effekt die Infektion mit H-1PV auf die Viabilität der Kolonkarzinomzellen der Subgruppen CMS2 und CMS3 hat.

Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan (siehe Abbildung 4.1). Diese enzymatische Reaktion findet nur in vitalen Zellen statt. Geschädigte oder tote Zellen hingegen bilden kaum bzw. kein Formazan. Das wiederum bedeutet, dass die optische Dichte der Formazankristalle direkt proportional zur Anzahl und zur Stoffwechselaktivität vitaler Zellen ist (92, 93).

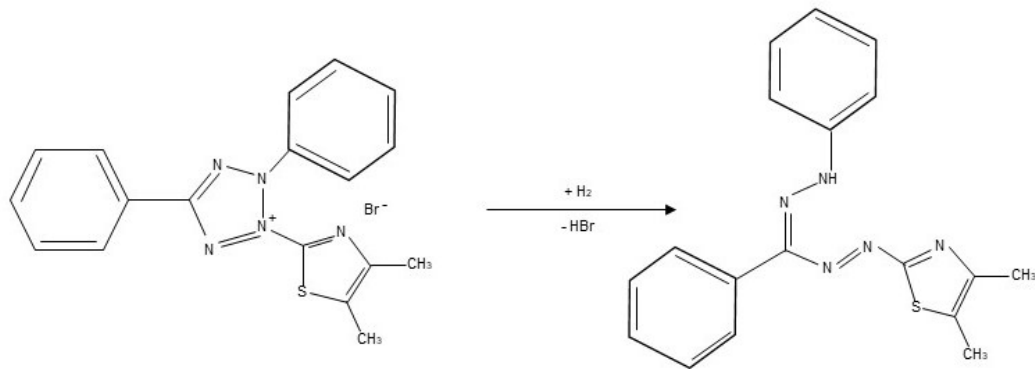


Abbildung 4.1: Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in blau-violettes Formazan. Abkürzung: MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (93)

Eingesetzte Lösungen:

MTT-Lösung: 5 mg/ml

SDS-Lösung: 10 ml 0,01 M HCl + 1 g SDS = 125 µl 4 M HCl + 50 ml H₂O + 5 g SDS

An Tag 1 des MTT-Assays wurden die kolorektalen Tumorzellen abgelöst und gezählt (siehe 4.1.4). Die äußeren Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden mit je 200 µl PBS befüllt, was sowohl dem Verdunstungs- als auch dem Kontaminationsschutz diente. Es folgte die Aussaat von 10.000 Zellen pro Well in je 100 µl Medium. Die letzte Reihe der Platte wurde freigelassen, hier erfolgte zur Kontrolle lediglich die Zugabe von 100 µl Zellkulturmedium. Anschließend wurde die Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte zunächst die Vorbereitung der zu testenden Virus-MOIs (Multiplizität der Infektion). Danach wurde das alte Medium aus den Wells abgesaugt und durch die entsprechenden Viruskonzentrationen (MOI 1, MOI 5, MOI 10, MOI 15 und MOI 20) ersetzt (siehe 4.2.1). Zur Kontrolle wurde jede Zelllinie auch unbehandelt mitgeführt. Im Anschluss wurde die Platte erneut im Brutschrank inkubiert.

Je nach Versuchsansatz wurde an Tag 3 (24 h Inkubationszeit) oder an Tag 4 (48 h Inkubationszeit) jeweils 10 µl MTT-Lösung pro Well zugegeben. Es folgte eine vierstündige Inkubation im Brutschrank, dann wurde pro Well jeweils 100 µl SDS-Lösung hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubation im Brutschrank über Nacht erfolgte am nächsten Tag die Messung der optischen Dichte bei 550 nm.

4.1.8 Kokultur

In Vorbereitung zur Durchführung der Kokultur wurden die kolorektalen Tumorzellen an Tag 1 zunächst gezählt (siehe 4.1.4). Pro Well einer 12-Well Mikrotiterplatte wurden 2 x 10⁵ Zellen in jeweils 1 ml Zellkulturmedium ausgesät.

Nach der Inkubation im Brutschrank über Nacht erfolgte am nächsten Tag die Infektion der Zellen mit H-1PV MOI 1 und MOI 5 (siehe 4.2.1). Zusätzlich wurden Zellkontrollen mitgeführt. Dann fand eine erneute Inkubation im Brutschrank statt.

Am dritten Tag der Kokulturversuche wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) schonend in der Hand angetaut, gezählt und zu je 2 x 10⁶ Zellen/Well in jeweils 1 ml Medium zu den Tumorzellen gegeben. Darüber hinaus wurden auch nicht in Kokultur gesetzte PBMCs mitgeführt, sowohl unstimuliert als auch stimuliert. Die Stimulierung induzierte die Aktivierung von T-Zellen und erfolgte mit 100 U/ml IL-2 und jeweils 1 µg/ml der monoklonalen Antikörper

(mAK) anti-CD3 und anti-CD28. Anschließend wurde die Platte für drei Tage im Brutschrank inkubiert.

An Tag 6 erfolgte die Durchführung der entsprechenden fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS) (siehe 4.3.1).

4.2 Virologische Methoden

4.2.1 Infektion der Tumorzellen

Einen Tag vor der geplanten Infektion mit H-1PV wurden die kolorektalen Tumorzellen in der gewünschten Anzahl in einer 12-Well Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Tag der Infektion wurden die gewünschten Viruskonzentrationen vorbereitet. Dabei wurde das Virus pro Well in 50 µl Medium (MTT-Assay) bzw. in 200 µl Medium (Kokultur) aufgenommen. Die Berechnung der MOI erfolgte unter Berücksichtigung der plaquebildenden Einheit (PFU) nach der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times \text{MOI}}{\text{PFU}}$$

Zur Infektion wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt. Es folgte die Zugabe der vorbereiteten Virus-MOIs. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Wells mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Im Rahmen des MTT-Assays erfolgte dabei die Zugabe von 50 µl Medium, im Rahmen der Kokultur wurde pro Well jeweils 1,8 ml Medium hinzugefügt. Hiernach wurden die infizierten Tumorzellen bis auf Weiteres im Brutschrank inkubiert.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 FACS-Analyse

4.3.1.1 Grundlagen

Die Durchflussszytometrie ist ein Verfahren, mit dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrom gezählt und hinsichtlich ihrer molekularen und physikalischen Eigenschaften analysiert werden können. Ein Durchflussszytometer setzt sich aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System sowie einem elektronischen System zusammen.

Für die FACS-Analyse werden Oberflächenantigene und/oder intrazelluläre Antigene der zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Zur Messung werden die Zellen einzeln in einem laminaren Probenstrom durch einen gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge geleitet. Dabei kommt es durch die im Probenstrom enthaltenen Bestandteile zu einer Lichtstreuung, wobei zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC) zu differenzieren ist. Während das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe der Zellen darstellt, gilt das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität der Zellen (siehe Abbildung 4.2).

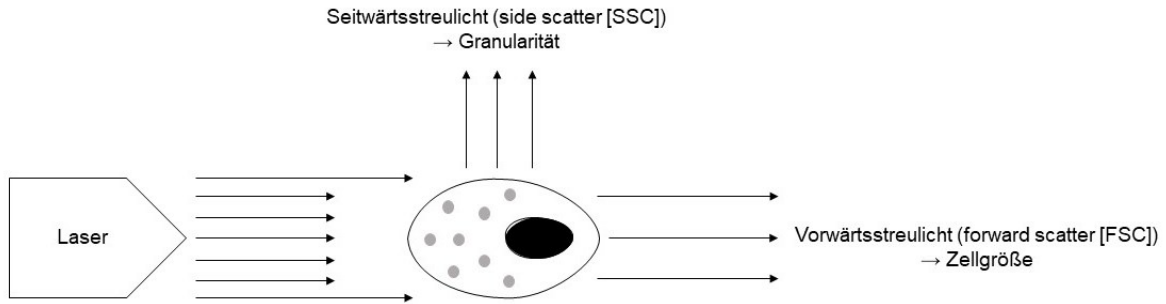


Abbildung 4.2: Prinzip von FSC und SSC (94)

Des Weiteren regt der Laserstrahl die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe an, die in Folge Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das optische System des Durchflusszytometers setzt sich aus verschiedenen Filtern und Spiegeln zusammen, die das Licht seiner Wellenlänge entsprechend auftrennen und die Lichtsignale zu den entsprechenden Detektoren leiten (siehe Abbildung 4.3). Die Detektoren wandeln die optischen Signale in elektronische Signale um, die von einem Computerprogramm gespeichert werden. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich direkt proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Daten werden in einem Standardformat, dem Flow Cytometry Standard (FCS), gespeichert. Die Darstellung der Messungen erfolgt graphisch (94).

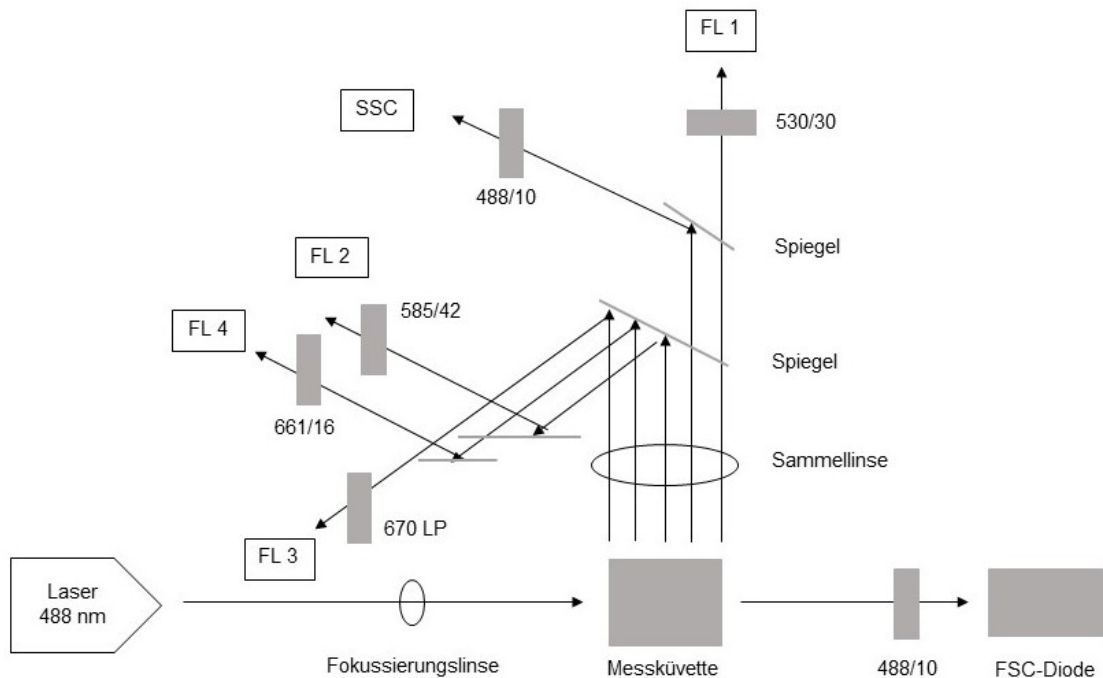


Abbildung 4.3: Optisches System eines Durchflusszytometers. Das Licht des Lasers trifft in der Messküvette auf den Probenstrom und wird anschließend gestreut, reflektiert und durch Bandpassfilter (488/10, 530/30, 585/42, 661/16) und Longpassfilter (670 LP) entsprechend der Wellenlänge aufgeteilt. Neben der Größe (FSC-Diode) und der Granularität (SSC-Diode) von Zellen können bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe (FL 1-4) gemessen werden (94).

Mit der FACS-Analyse können unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. Das ist dadurch zu erklären, dass sich die Farbstoffe zwar bei gemeinsamen Wellenlängen anregen lassen, dabei jedoch über verschiedene Emissionsspektren verfügen (95). Tabelle 4.1 zeigt die in dieser Dissertation verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Tabelle 4.1: Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren jeweiligen Eigenschaften. Abkürzungen: APC, Allophycocyanin; Cy7, „cyanine dye“; FITC, „Fluorescein isothiocyanate“; PE, Phycoerythrin; PerCP, „Peridinin-chlorophyll-protein complex“ (94)

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Anregungswellenlänge (nm)
APC	650	660	635
FITC	495	519	488
PE	480; 565	578	488
PE-Cy7	480; 565	785	488
PerCP	482	678	488

4.3.1.2 Messung der Oberflächenexpression

Mit der FACS-Analyse wurde in dieser Dissertation untersucht, welchen Effekt H-1PV-infizierte kolorektale Tumorzellen auf Immunzellen haben.

Am Tag der FACS-Färbung wurde zunächst der FACS-Puffer vorbereitet, der sich aus PBS + 5 % FBS zusammensetzte. Um die Gefahr der Schädigung zellulärer Oberflächenmoleküle zu minimieren, wurden die nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen, inklusive des FACS-Puffers, kamen stets gekühlt zum Einsatz. Zentrifugiert wurde immer für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C.

Die kokultivierten Tumorzellen sowie die zur Kontrolle mitgeführten unstimulierten und stimulierten PBMCs (siehe 4.1.8) wurden vorsichtig mithilfe eines Zellschabers geerntet. Der Zellschaber wurde nach dem Abschaben jeder Zelllinie sorgfältig gewaschen und getrocknet, um eine Verunreinigung der Proben zu verhindern. Die Zellsuspensionen wurden in zuvor beschriftete FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Unterdessen erfolgte die Zugabe von jeweils 2 ml FACS-Puffer pro Well. Die 12-Well Mikrotiterplatten wurden im Kühlschrank gelagert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Überführung der Überstände aus den FACS-Röhrchen in die zuvor entsprechend beschrifteten Tubes. Für den späteren Nachweis der freigesetzten Zytokine wurden diese eingefroren. Die in den FACS-Röhrchen zurückgebliebenen Zellen wurden mit dem FACS-Puffer aus den jeweiligen Wells resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde ein weiterer Waschgang durchgeführt. Dazu wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und die Zellen gevortext.

In der Zwischenzeit waren die Antikörpermixe für die geplanten extrazellulären Färbungen vorbereitet worden (siehe Tabelle 4.2). Von jedem Antikörper wurden jeweils 5 µl verwendet. Bis zum Gebrauch wurden die Mixe lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 4.2: Durchgeführte FACS-Färbungen. Innerhalb der Färbungen waren die Antikörper jeweils an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (siehe Tabelle 4.1) gekoppelt. Abkürzungen: FoxP3, „Forkhead-Box-Protein P3“; HLA-DR, „Human Leukocyte Antigen – DR isotype“

Extrazellulär	Intrazellulär
<u>Färbung 1:</u> CD3/CD4/CD69	FoxP3
<u>Färbung 2:</u> CD3/CD8/CD69	Granzym B
<u>Färbung 3:</u> CD11b/CD14/CD33/HLA-DR	
<u>Färbung 4:</u> CD3/CD8/CD56/CD57	

Für die Einzelfärbungen bzw. Kontrollfärbungen wurde ein Mix aus unstimulierten und stimulierten PBMCs gewählt. Die Einzelfärbungen wurden mit allen im Antikörpermix enthaltenen Antikörpern durchgeführt, verwendet wurden jeweils 5 µl. Zur Kontrolle und Einstellung des Durchflusszytometers wurden die PBMCs auch ungefärbt mitgeführt. Die Einzelfärbungen dienten der Zuordnung der im Rahmen der Messung entstehenden Signale. Im Anschluss folgte die Durchführung der eigentlichen Färbungen. Dazu wurden die verschiedenen Antikörpermixe bei den Färbungen 1 und 2 zu jeweils 15 µl und bei den Färbungen 3 und 4 zu jeweils 20 µl zu den Versuchsansätzen gegeben. Nach der Zugabe des jeweiligen Antikörpers bzw. der jeweiligen Antikörpermixe wurden die Zellen gevortext und 45 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zunächst ein Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer durchgeführt, um ungebundene Antikörper zu entfernen und damit für die Messung störende Hintergrundgeräusche zu reduzieren. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen gevortext. Dann erfolgte die Zugabe von je 200 µl Fixierungspuffer. Die Zellen wurden gevortext und bis zur Messung mit Parafilm abgedeckt im Kühlschrank gelagert.

4.3.1.3 Messung der intrazellulären Expression

Im Rahmen der Kokultur wurden auch intrazelluläre Färbungen durchgeführt (siehe Tabelle 4.2). Verwendet wurde hierzu das „Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set“ von Invitrogen. Das Kit enthielt neben einem Fixierungspuffer, der Zellen fixiert und Proteine miteinander vernetzt, auch einen Permeabilisierungspuffer, der Löcher in Membranen erzeugt und das Eindringen der Antikörper ermöglicht (96). Der Permeabilisierungspuffer (10x) wurde vor dem Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das entsprechende Färbeprotokoll für die intrazellulären Färbungen schloss sich direkt an das Protokoll für die extrazellulären Färbungen an. Auch hier wurde auf Eis und mit gekühlten Lösungen gearbeitet. Zentrifugiert wurde ebenfalls für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C.

Nach der 45-minütigen Inkubation der Oberflächenfärbungen im Kühlschrank wurde zunächst ein Waschgang mit 1 ml FACS-Puffer durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen gevortext und jeweils 100 µl Fixierungspuffer zugegeben. Im Anschluss wurde erneut gevortext, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation im Kühlschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Der erste Waschgang wurde mit 1 ml, der zweite mit 500 µl durchgeführt. Der Überstand wurde entsorgt und die Zellen gevortext. Anschließend folgte die Färbung der Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene. Dabei wurden Einzelfärbungen mit jeweils 5 µl FoxP3 oder 5 µl Granzym B durchgeführt. Nach der Zugabe der Antikörper wurden die Zellen gevortext und für 45 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Hiernach wurden zwei Waschgänge mit jeweils 1 ml Permeabilisierungspuffer durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen gevortext. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe

von jeweils 100 µl FACS-Puffer. Bis zur Messung wurden die FACS-Röhrchen mit Parafilm abgedeckt im Kühlschrank gelagert.

4.3.2 ELISA

4.3.2.1 Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“) ist ein häufig angewendeter quantitativer Immunoassay, dessen Prinzip auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht (siehe Abbildung 4.4).

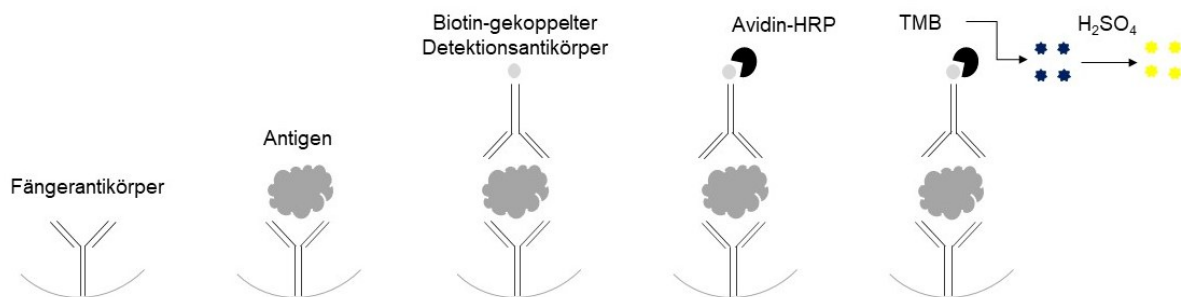


Abbildung 4.4: Sandwich-ELISA. Fängerantikörper und Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper binden das Antigen. Avidin-HRP bindet an den Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper. Die Reaktion der Peroxidase mit TMB führt zu einer Farbreaktion, die photometrisch gemessen werden kann. Abkürzungen: H₂SO₄, Schwefelsäure; HRP, Meerrettichperoxidase; TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (97)

In dieser Dissertation kam der Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis der Zytokine Granzym B, IFN- γ , IL-2, IL-6 und IL-10 zum Einsatz. Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine erfolgte aus den im Rahmen der Kokultur gewonnenen Überständen. Verwendet wurden ELISA-Kits von Thermo Fisher Scientific. Sie enthielten neben sämtlichen Materialien und Reagenzien auch die beachteten Protokolle zur Durchführung. An dieser Stelle soll lediglich der allgemeine Ablauf des Sandwich-ELISA beschrieben werden.

Am ersten Tag wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit einem Antikörper gegen das nachzuweisende Zytokin beschichtet. Dazu wurde der sogenannte Fängerantikörper (capture antibody) 1:250 in 1x Coating-Puffer verdünnt und zu je 100 µl/Well aufgetragen. Es folgte eine Inkubation im Kühlschrank über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der Platteninhalt abgekippt und dreimal gewaschen. Die Waschgänge wurden stets mit 200 µl Waschpuffer/Well durchgeführt. Nach dem Auftragen von 200 µl Elispot/Well erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Dieser Schritt diente dem Abblocken der Proteinbindestellen, die ansonsten unspezifisch Antigene binden würden. Die Inkubationszeit wurde zur Vorbereitung der Standardverdünnungsreihe genutzt. Im Anschluss wurde der Platteninhalt abgekippt und einmal gewaschen. Dann erfolgte das Auftragen der Proben als Doppelwerte. Als Nächstes wurde der Standard, ebenfalls doppelt, zu jeweils 100 µl/Well pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Kühlschrank über Nacht.

An Tag 3 wurde der Platteninhalt zunächst abgekippt, anschließend wurden drei Waschgänge durchgeführt. Hiernach wurde der zuvor 1:250 in Elispot verdünnte Detektionsantikörper, ein Biotin-gekoppelter Antikörper gegen das jeweils nachzuweisende Zytokin, zu je 100 µl/Well zugegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Platteninhalt abgekippt und dreimal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des enzymgekoppelten Antikörpers Avidin-HRP („horseradish peroxidase“), der den Biotin-gekoppelten Antikörper band. Dazu wurde das HRP-konjugierte Avidin 1:250 in Elispot verdünnt und zu je 100 µl/Well aufgetragen. Es folgte eine 30-minütige

Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde der Platteninhalt abgekippt und fünf Waschgänge durchgeführt. Dann wurden pro Well 100 µl der Substratlösung TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zugegeben und erneut bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei TMB handelt es sich um ein Chromogen, das mit HRP reagiert. Als Resultat entsteht ein blaues Reaktionsprodukt, wobei die Intensität der Farbreaktion mit der Zytokinkonzentration korreliert (98). So konnte eine Aussage über den Zytokingehalt der jeweiligen Probe getroffen werden. Die Standardverdünnungsreihe ermöglichte die Quantifizierung der aufgetragenen Proben. Je nach Farbentwicklung, vor allem der Standardreihe, wurde die Substratreaktion nach durchschnittlich 15 Minuten abgestoppt. Dazu wurden pro Well 50 µl Schwefelsäure (1 M H₂SO₄) zugegeben. Die Säure stoppt die Farbreaktion und bewirkt einen Farbwechsel von blau nach gelb (98). Möglichst zeitnah erfolgte dann die Messung mit einem ELISA-Reader bei 450 und 550 nm.

4.3.2.2 Multiplex-Assay

Zum quantitativen Nachweis der Zytokine kam auch der Multiplex-Assay zum Einsatz. Diese Technologie ermöglicht die gleichzeitige Messung mehrerer Zytokine. Beim Multiplex-Assay wird der Fängerantikörper an magnetische, fluoreszierende Kügelchen, sogenannte „beads“, gebunden (siehe Abbildung 4.5). Das MAGPIX-System registriert die unterschiedlichen Zytokine, ermittelt die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und berechnet anhand von Standardkurven die Zytokinkonzentrationen in pg/ml (99).

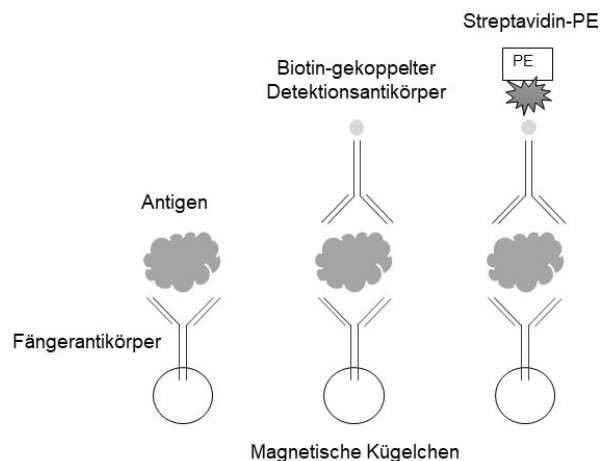


Abbildung 4.5: Prinzip des Multiplex Assay. Die magnetischen Kügelchen binden den Fängerantikörper, dieser bindet wiederum sein spezifisches Antigen. Durch die Zugabe des Biotin-gekoppelten Detektionsantikörpers entsteht ein Antikörper-Antigen-Sandwich. Streptavidin-PE bindet an den Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper (99).

Der Multiplex-Assay wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Verwendet wurde das „ProcartaPlex Multiplex Immunoassay“ Kit von Thermo Fisher Scientific, welches alle erforderlichen Materialien sowie das detaillierte Protokoll zur Durchführung enthält. Die Waschgänge wurden stets mit 150 µl Waschpuffer/Well durchgeführt. Um dabei ein Auswaschen der magnetischen Kügelchen zu verhindern, wurde die Platte auf einer speziellen magnetischen Halterung (Hand-Magnetplattenwaschgerät) befestigt. Vor der Zugabe des Waschpuffers wurde durch eine zweiminütige Wartezeit sichergestellt, dass sich die Kügelchen am Boden der Wells sammelten. Dann erst erfolgte die Zugabe des Waschpuffers. Nach einer halben Minute Wartezeit wurde der Platteninhalt abgekippt, die Platte gut auf Papier ausgeklöpft und aus der Halterung entfernt.

Am ersten Tag der Durchführung des Multiplex-Assays erfolgte zunächst die Vorbereitung der Standardverdünnungsreihe. Bis zum Gebrauch wurde diese im Kühlschrank aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte vorbereitet, indem pro Well jeweils 50 µl der Bead-Lösung pipettiert wurden. Es folgte ein Waschgang, in dessen Anschluss die Standardverdünnungsreihe doppelt aufgetragen wurde. Hiernach erfolgte das Auftragen der Proben als Doppelwerte zu jeweils 100 µl/Well. Die Platte kam für 30 Minuten bei 121 rpm auf einen Plattenschüttler und wurde dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

An Tag 2 wurde die Platte zunächst für 30 Minuten auf den Plattenschüttler gestellt. Anschließend wurde der Platteninhalt abgekippt und zweimal gewaschen. Dann wurden pro Well jeweils 25 µl Detektionsantikörper aufgetragen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Platteninhalt abgekippt und zweimal gewaschen. Anschließend wurden pro Well jeweils 50 µl Streptavidin-PE zugegeben. Wieder folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, danach wurden zwei Waschgänge durchgeführt. Schließlich wurden in jedes Well 120 µl Reading-Puffer pipettiert und mindestens 5 Minuten auf dem Plattenschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte mittels MAGPIX ausgelesen.

5 Ergebnisse

5.1 Effekt von H-1PV auf die Viabilitätsraten von CMS2 und CMS3

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Kolonkarzinomzellen von CMS2 (LS1034 und NCI-H508) und CMS3 (CL-34 und HT115).

Hierzu wurden die Tumorzellen ausplattiert und mit verschiedenen Virus-MOIs infiziert (siehe 4.2.1). Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h erfolgte die Bestimmung der metabolischen Aktivität (siehe 4.1.7). Die Viabilitätsraten wurden sowohl in Abhängigkeit von der Viruskonzentration als auch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Der Einfluss von H-1PV wurde als relative Veränderung des Lebendzellanteils infizierter Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Zellkontrolle (= 100 % Viabilität) angegeben.

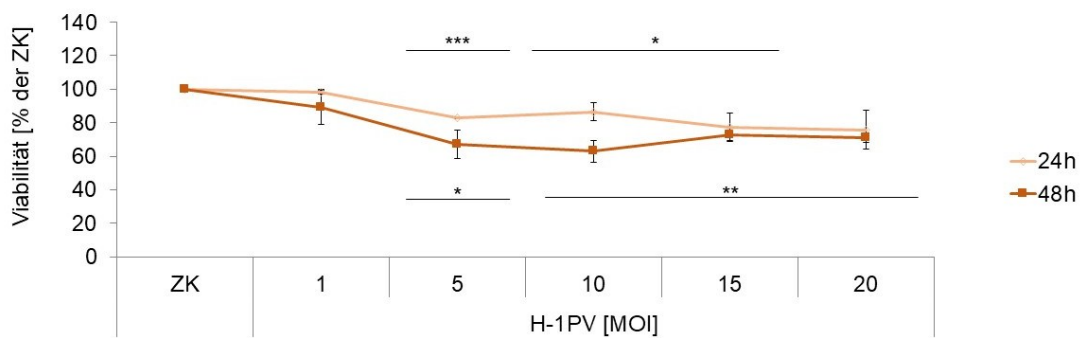


Abbildung 5.1: Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie LS1034 (CMS2). Mit dem MTT-Assay wurde die Viabilität bei verschiedenen Viruskonzentrationen (MOI 1, 5, 10, 15, 20) und Inkubationszeiten (24 h, 48 h) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Abkürzungen: MOI, „multiplicity of infection“; ZK, Zellkontrolle

Bei der Zelllinie LS1034 resultierte die Infektion mit H-1PV in einer statistisch signifikanten Viabilitätsminderung. Bei einer Inkubationszeit von 24 h reduzierte H-1PV (MOI 20) den Lebendzellanteil auf 76 %. Bei einer Inkubationszeit von 48 h wurde die maximale Reduktion der Zellviabilität auf 63 % mit einer MOI von 10 erreicht (siehe Abbildung 5.1).

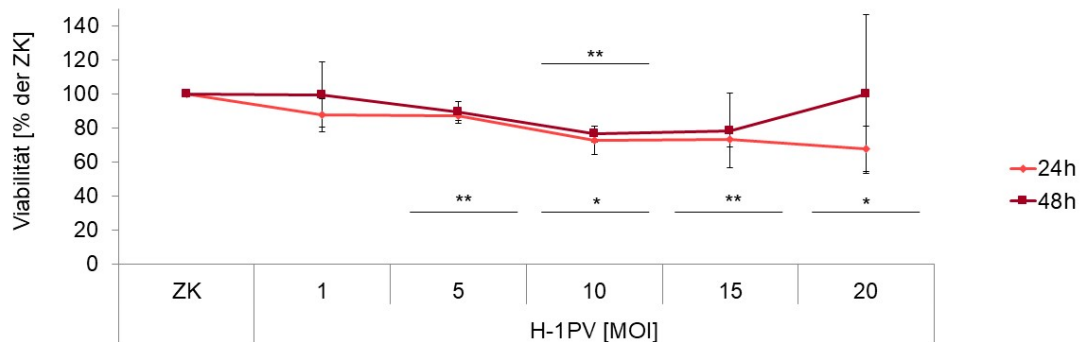


Abbildung 5.2: Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie NCI-H508 (CMS2). Mit dem MTT-Assay wurde die Viabilität bei verschiedenen Viruskonzentrationen (MOI 1, 5, 10, 15, 20) und Inkubationszeiten (24 h, 48 h) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Auch bei NCI-H508 induzierte H-1PV bei einer 24-stündigen Inkubationszeit mit steigender Virus-MOI eine zunehmende Viabilitätsminderung. Die maximale Reduktion der Zelllebensfähigkeit auf 68 % bewirkte H-1PV bei einer Infektion mit MOI 20. Ein ähnlicher Effekt konnte bei einer Inkubationszeit von 48 h beobachtet werden. Als statistisch signifikant erwies sich hier jedoch nur die Infektion mit H-1PV (MOI 10), die eine Abnahme des Lebendzellanteils auf 76 % nach sich zog (siehe Abbildung 5.2).

Zusammenfassend erzielte H-1PV mit einer MOI von 10 bei beiden CMS2-Tumorzellen die deutlichste Verringerung der Viabilität. Dabei war die onkolytische Wirkung bei LS1034 stärker ausgeprägt als bei NCI-H508. Bei einer Inkubationszeit von 48 h reduzierte H-1PV (MOI 10) die Lebensfähigkeit von LS1034 um 37 %. Bei NCI-H508 wurde unter denselben Bedingungen eine Abnahme des Lebendzellanteils um 24 % detektiert. Eine vollständige Hemmung der Viabilität konnte H-1PV bei den Kolonkarzinomzellen des CMS2-Subtyps nicht induzieren.

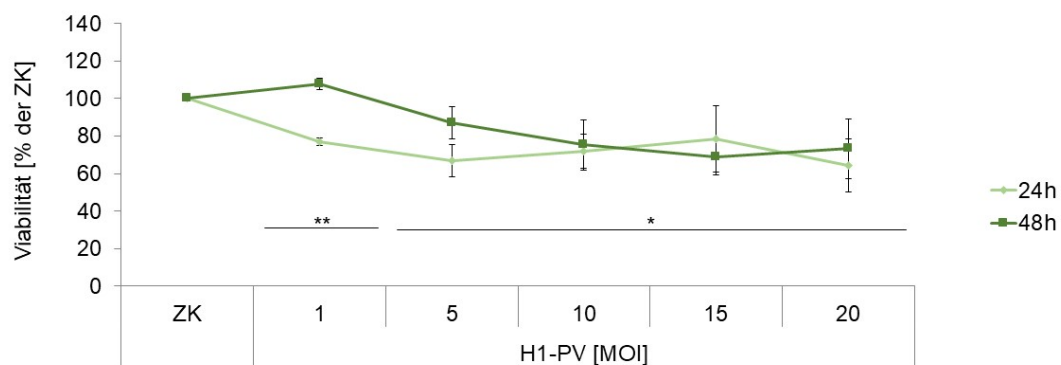


Abbildung 5.3: Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie CL-34 (CMS3). Mit dem MTT-Assay wurde die Viabilität bei verschiedenen Viruskonzentrationen (MOI 1, 5, 10, 15, 20) und Inkubationszeiten (24 h, 48 h) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Bei der Zelllinie CL-34 führte die Infektion mit H-1PV (MOI 1, 5, 10 und 20) bei einer Inkubationszeit von 24 h zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellviabilität. H-1PV (MOI 20) verringerte den Lebendzellanteil auf 64 %. Bei einer Inkubationszeit von 48 h wurde die maximale Reduktion der Viabilität auf 68 % mit einer MOI von 15 erreicht (siehe Abbildung 5.3).

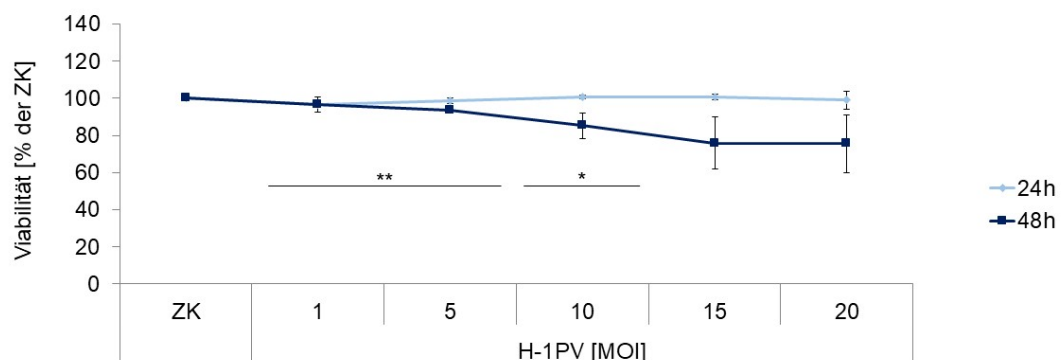


Abbildung 5.4: Effekt von H-1PV auf die Viabilität der Zelllinie HT115 (CMS3). Mit dem MTT-Assay wurde die Viabilität bei verschiedenen Viruskonzentrationen (MOI 1, 5, 10, 15, 20) und Inkubationszeiten (24 h, 48 h) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Bei einer Inkubationszeit von 24 h zeigte H-1PV keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zelllinie HT115. Bei einer Inkubationszeit von 48 h induzierte H-1PV mit einer MOI von 1, 5 und 10 eine statistisch signifikante Minderung der Zellviabilität. Die Infektion mit H-1PV (MOI 10) reduzierte den Lebendzellanteil auf 85 %. Mit steigender MOI nahm die Viabilität tendenziell weiter ab und erreichte bei einer MOI von 15 und 20 mit 76 % eine Plateauphase (siehe Abbildung 5.4).

Vergleicht man die beiden Zelllinien von CMS3 untereinander, wies H-1PV bei CL-34 einen deutlicheren onkolytischen Effekt auf. Hier induzierte H-1PV (MOI 15) bei einer Inkubationszeit von 48 h eine Viabilitätsminderung um 32 %. Bei der Zelllinie HT115 bewirkte H-1PV (MOI 20) die maximale Abnahme der Zellebensfähigkeit um 24 %. Zu einer vollständigen Hemmung des Lebendzellanteils konnte H-1PV auch bei den getesteten CMS3-Subtypen nicht führen.

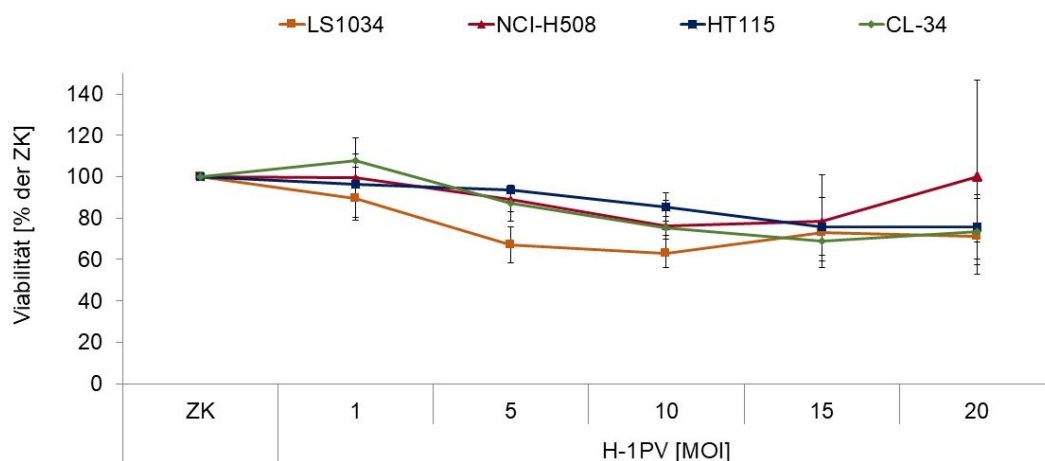


Abbildung 5.5: Viabilitätsraten von CMS2 (LS1034 und NCI-H508) und CMS3 (CL-34 und HT115) bei einer Inkubationszeit von 48 h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Versuche inklusive Standardabweichungen.

Zusammenfassend ließ sich ein zytotoxischer Effekt von H-1PV auf die untersuchten Kolonkarzinomzellen beider molekularer Subtypen nachweisen. Eine Inkubationszeit von 48 h resultierte bei allen vier kolorektalen Tumorzelllinien in einer MOI-abhängigen Reduktion des Lebendzellanteils. Durch die onkolytische Virusbehandlung mit H-1PV konnte weder bei CMS2 (LS1034 und NCI-H508) noch bei CMS3 (CL-34 und HT115) eine vollständige Hemmung der Zellviabilität induziert werden. Die Infektion mit H-1PV (MOI 15) resultierte bei beiden molekularen Subtypen in einer Plateauphase, bei der eine Viabilitätsminderung um etwa 30% erreicht wurde. Den größten zytotoxischen Effekt erzielte H-1PV bei LS1034 (CMS2) mit einer Abnahme der Zellebensfähigkeit um 37 %. Am wenigsten sensitiv reagierte die Zelllinie HT115 (CMS3). Hier reduzierte H-1PV die Viabilität um 24 % (siehe Abbildung 5.5).

Da sich bei einer Inkubationszeit von 48 h auch bei geringen Viruskonzentrationen ein zytotoxischer Effekt zeigte, wurden die nachfolgenden Versuche mit H-1PV (MOI 1 und 5) durchgeführt.

5.2 Effekt von H-1PV auf die Verteilung und Aktivierung ausgewählter Immunzellen

Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von H-1PV auf die Verteilung und Aktivierung verschiedener Immunzellen untersucht. Betrachtet wurden NK-Zellen, NKT-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie MDSCs.

Dazu wurden zunächst unbehandelte und H-1PV (MOI 1 und 5)-infizierte Kolonkarzinomzellen der Subtypen CMS2 (LS1034 und NCI-H508) und CMS3 (HT115) mit PBMCs kokultiviert. Zusätzlich wurden nicht in Kokultur gesetzte PBMCs als Kontrollen mitgeführt, sowohl unstimuliert als auch stimuliert durch einen Mix aus IL-2, anti-CD3 mAK und anti-CD28 mAK (siehe 4.1.8). Der Mix induzierte die Aktivierung von T-Zellen. Damit dienten die stimulierten PBMCs als Aktivierungskontrolle und repräsentierten das aktivierte Immunsystem. Mit den unstimulierten PBMCs ließ sich quantifizieren, wie viele Immunzellen im Blut der PBMC-Spender vorhanden waren und wie sich deren Verhältnis durch die Kokultivierung mit den kolorektalen Tumorzellen veränderte. Mittels FACS-Analyse wurde die Expression der jeweiligen zellulären Marker gemessen und so der Effekt von H-1PV dargestellt.

Die Kokulturversuche konnten mit der Zelllinie CL-34 (CMS3) nicht durchgeführt werden, da die Anzucht der Zellen zum Zeitpunkt der Durchführung nicht möglich war.

5.2.1 Natürliche Killerzellen

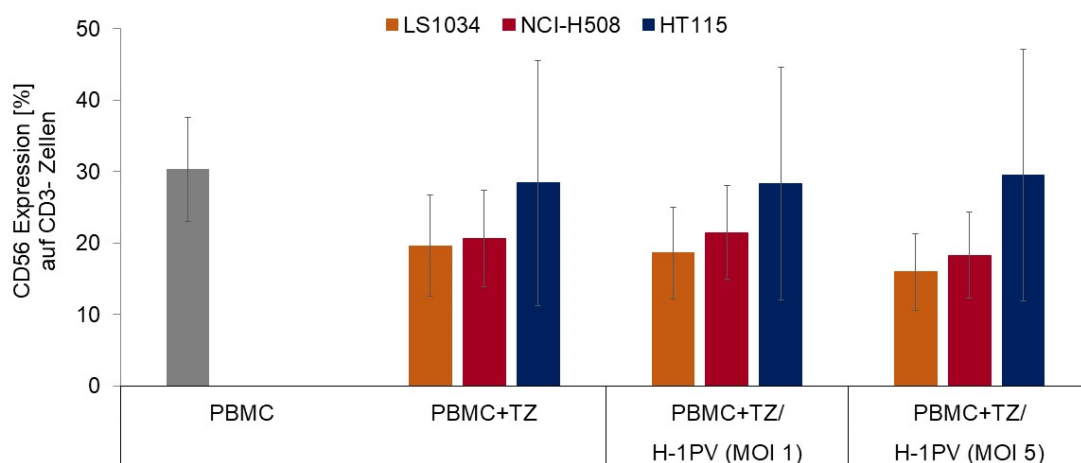


Abbildung 5.6: Anzahl an NK-Zellen (CD3⁺CD56⁺). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten Tumorzellen (TZ) die Expression von CD56 auf CD3⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen. Abkürzung: PBMC, „peripheral blood mononuclear cell“

NK-Zellen sind definiert als CD3⁺CD56⁺ Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Abtötung von virusinfizierten und entarteten Zellen. Im Blut der PBMC-Spender lagen 30 % der mononukleären Blutzellen als NK-Zellen vor.

Während CMS2-Tumorzellen (LS1034 und NCI-H508) den Anteil an NK-Zellen auf 20 % reduzierten, zeigten die Tumorzellen der CMS3-Subgruppe (HT115) keinen Effekt.

Die Infektion mit H-1PV hatte weder bei CMS2 noch bei CMS3 einen Einfluss auf das Level an NK-Zellen (siehe Abbildung 5.6).

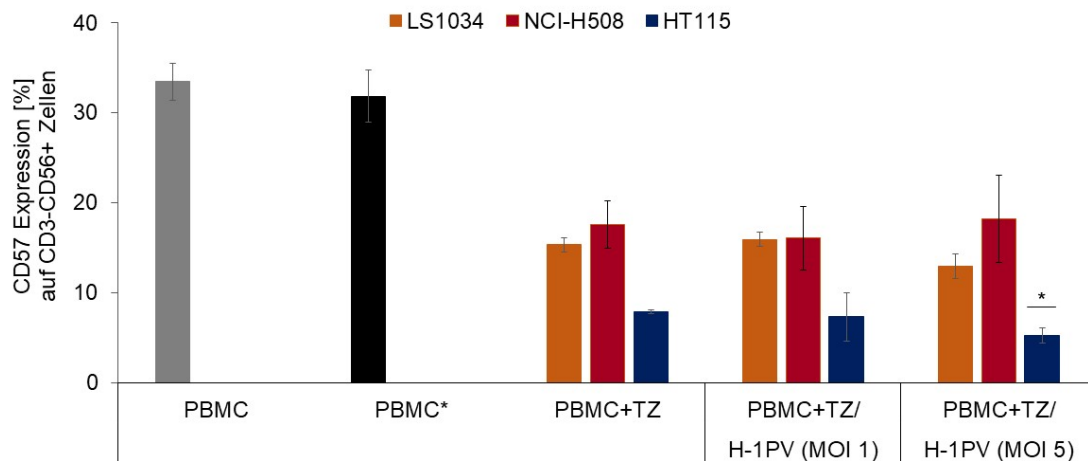


Abbildung 5.7: Anzahl an ausgereiften NK-Zellen (CD3⁺CD56⁺CD57⁺). Mittels FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Expression von CD57 auf CD3⁺CD56⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* p ≤ 0.05).

Der Oberflächenmarker CD57 kennzeichnet ausgereifte NK-Zellen. In der PBMC-Kontrolle lag ihr Anteil bei 33 %, in der Aktivierungskontrolle bei 32 %.

Die Tumorzellen von CMS2 (LS1034 und NCI-H508) und CMS3 (HT115) supprimierten die Ausreifung von NK-Zellen. Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle reduzierte sich das Level ausgereifter NK-Zellen in der Kokultur bei LS1034 auf 15 %, bei NCI-H508 auf 18 % und bei HT115 auf 8 %.

H-1PV hatte beim CMS2-Subtyp keinen Effekt auf die Ausreifung von NK-Zellen. Beim CMS3-Subtyp reduzierte H-1PV bei einer Infektion mit MOI 5 den Anteil ausgereifter NK-Zellen auf 5 % (siehe Abbildung 5.7).

5.2.2 Natürliche Killer-T-Zellen

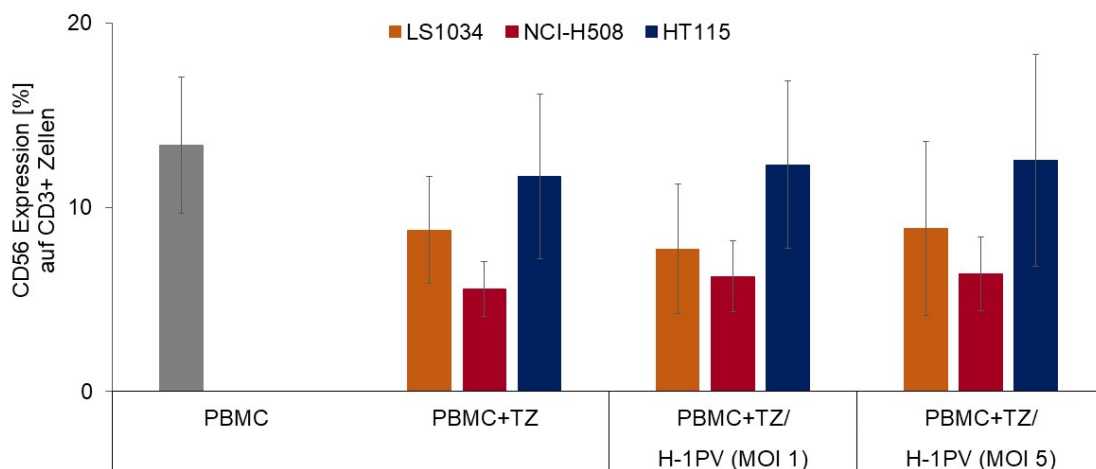


Abbildung 5.8: Anzahl an NKT-Zellen (CD3⁺CD56⁺). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Expression von CD56 auf CD3⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

NKT-Zellen, die als $CD3^+CD56^+$ definiert sind, übernehmen wichtige verbindende Aufgaben zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. In der PBMC-Kontrolle handelte es sich bei 13 % der mononukleären Blutzellen um NKT-Zellen.

Die CMS2-Tumorzellen (LS1034 und NCI-H508) dezimierten das Level an NKT-Zellen. In der Kokultur mit LS1034 wurden 9 % NKT-Zellen registriert, in der Kokultur mit NCI-H508 nahm ihr Anteil im Vergleich zur PBMC-Kontrolle um die Hälfte (auf 6 %) ab. Die HT115-Tumorzellen (CMS3) beeinflussten den Anteil an NKT-Zellen nicht.

Die Infektion mit H-1PV führte weder bei CMS2 noch bei CMS3 zu einem veränderten Anteil an NKT-Zellen. Es wurden ähnliche Werte wie in der Kokultur mit unbehandelten Tumorzellen detektiert (siehe Abbildung 5.8).

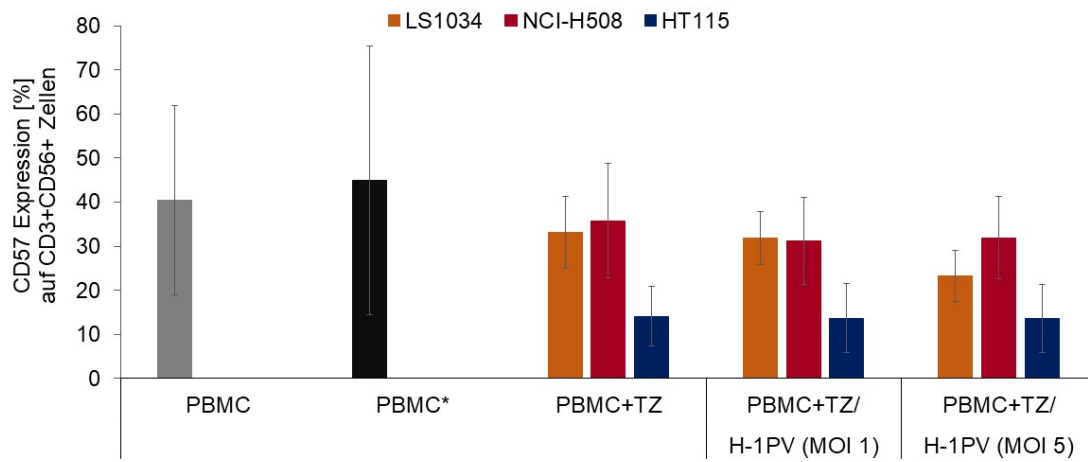


Abbildung 5.9: Anzahl an ausgereiften NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+CD57^+$). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Expression von CD57 auf $CD3^+CD56^+$ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

Der Oberflächenmarker CD57 charakterisiert ausgereifte NKT-Zellen. Im Blut der PBMC-Spender lag ihr Anteil bei 40 %. In der Aktivierungskontrolle stieg das Level an ausgereiften NKT-Zellen auf 45 %.

Sowohl die CMS2- (LS1034 und NCI-H508) als auch die CMS3-Tumorzellen (HT115) reduzierten die Ausreifung von NKT-Zellen. Beim CMS2-Subtyp war der Effekt gering ausgeprägt. In der Kokultur mit LS1034 wurden 33 % ausgereifte NKT-Zellen registriert, in der Kokultur mit NCI-H508 36 %. Ein deutlicher Effekt konnte bei HT115 beobachtet werden. Hier verringerten die kolorektalen Tumorzellen das Level ausgereifter NKT-Zellen auf 14 %.

Die Infektion mit H-1PV hatte weder bei CMS2 noch bei CMS3 einen Einfluss auf die Ausreifung von NKT-Zellen (siehe Abbildung 5.9).

5.2.3 CD8⁺ T-Zellen

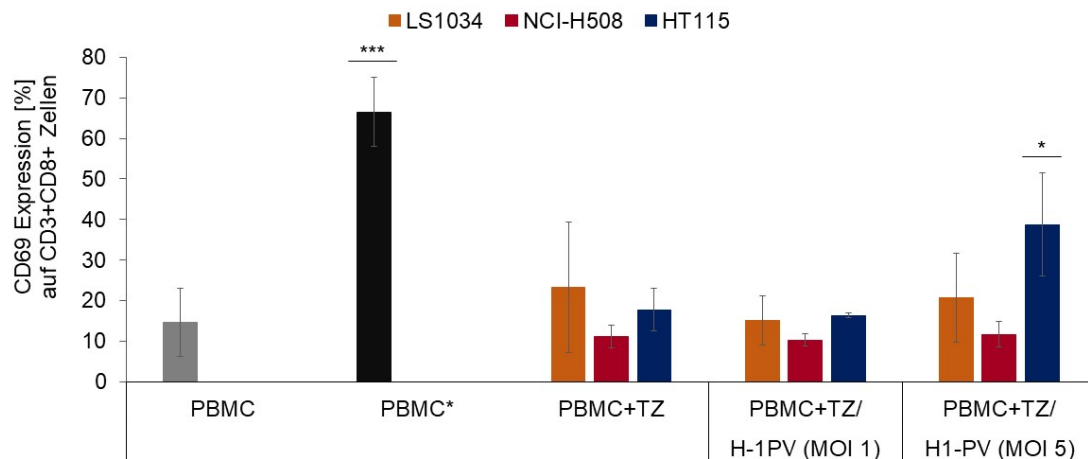


Abbildung 5.10: Anzahl an aktivierten CD8⁺ Zellen (CD3⁺CD8⁺CD69⁺). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Oberflächenexpression von CD69 auf CD3⁺CD8⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* p ≤ 0.05; *** p ≤ 0.001).

Aktivierte CD8⁺ T-Zellen sind definiert als CD3⁺CD8⁺CD69⁺. Neben NK-Zellen spielen sie eine zentrale Rolle in der Eliminierung von virusinfizierten und entarteten Zellen. Während ihr Anteil in der unstimulierten PBMC-Kontrolle bei 15 % lag, wurde in der Aktivierungskontrolle ein Wert von 67 % gemessen.

In der Kokultur mit LS1034-Zellen (CMS2) nahm die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen auf 23 % zu. Die Relevanz ist begrenzt, da der Wert der Aktivierungskontrolle bei Weitem nicht erreicht wurde. Bei den Zelllinien NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) hatte die Kokultivierung keinen Einfluss auf den Anteil aktivierter CD8⁺ T-Zellen.

Die Infektion mit H-1PV zeigte bei CMS2 keinen Effekt. Beim CMS3-Subtyp HT115 führte H-1PV bei einer MOI von 5 zu einem statistisch signifikanten Anstieg der aktivierten CD8⁺ T-Zellen auf 39 % (siehe Abbildung 5.10).

5.2.4 CD4⁺ T-Zellen

Im Rahmen der Kokultur wurde auch der Effekt von H-1PV auf die Verteilung und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Betrachtet wurden T_H-Zellen und T_{regs}. Letztere stellen eine Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen dar und exprimieren charakteristischerweise den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3). T_{regs} supprimieren die Aktivierung des Immunsystems und leisten damit eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. T_H-Zellen sind definiert als FoxP3⁻ Zellen. Sie sind sowohl an der zellulären als auch an der humoralen Immunabwehr beteiligt.

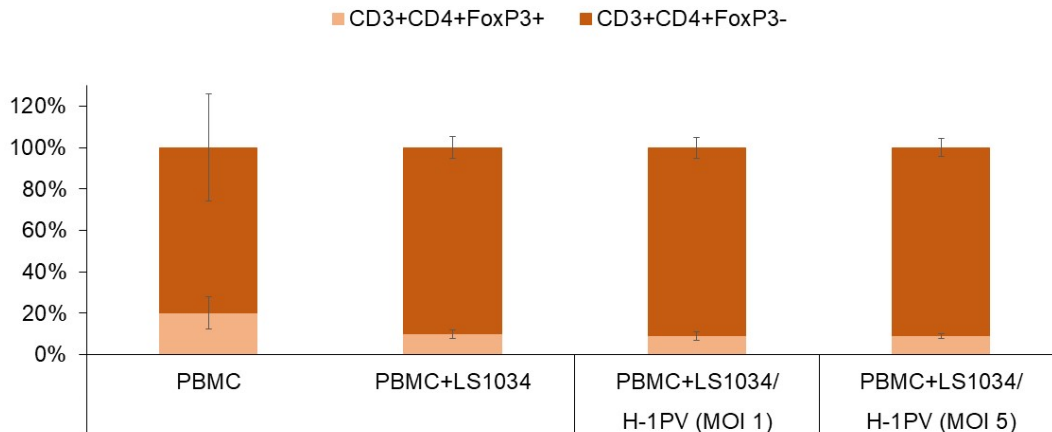


Abbildung 5.11: Verhältnis von T_{regs} (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺) zu T_H-Zellen (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻) in der Kokultur mit LS1034 (CMS2). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die intrazelluläre FoxP3 Expression von CD3⁺CD4⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

Im Blut der PBMC-Spender lagen die CD4⁺ T-Zellen zu 10 % als T_{regs} und zu 38 % als T_H-Zellen vor.

Die Kokultivierung mit LS1034 (CMS2) zeigte keinen Effekt auf den Anteil an T_{regs}. Die LS1034-Zellen erhöhten das Level von T_H-Zellen auf 92 %. Damit lagen in der Kokultur mit LS1034 ca. 10-mal so viele T_H-Zellen wie T_{regs} vor.

Die Infektion mit H-1PV hatte in der Kokultur mit LS1034 keinen Einfluss auf das Verhältnis von T_{regs} zu T_H-Zellen (siehe Abbildung 5.11).

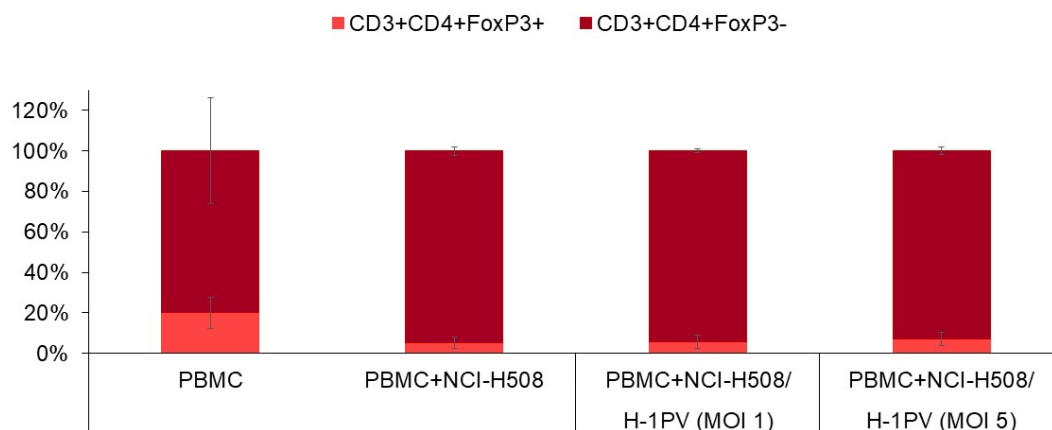


Abbildung 5.12: Verhältnis von T_{regs} (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺) zu T_H-Zellen (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻) in der Kokultur mit NCI-H508 (CMS2). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die intrazelluläre FoxP3 Expression von CD3⁺CD4⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

In der Kokultur mit NCI-H508 (CMS2) sank das Level an T_{regs} auf 6 % ab, während der Anteil an T_H-Zellen auf 97 % anstieg. Im Verhältnis lagen in der Kokultur ca. 16-mal so viele T_H-Zellen wie T_{regs} vor.

H-1PV zeigte in der Kokultur mit NCI-H508 keinen Effekt auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 5.12).

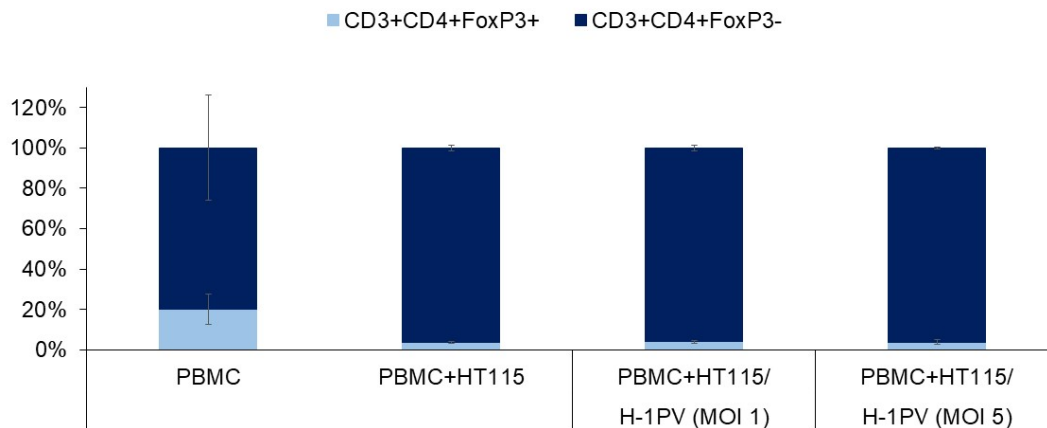


Abbildung 5.13: Verhältnis von T_{regs} (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺) zu T_H-Zellen (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻) in der Kokultur mit HT115 (CMS3). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die intrazelluläre FoxP3 Expression von CD3⁺CD4⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle verringerte die Kokultivierung mit HT115 (CMS3) den Anteil an T_{regs} auf 4 %. Das Level an T_H-Zellen stieg auf 97 %. Im Verhältnis lagen in der Kokultur mit unbehandelten Tumorzellen ca. 24-mal so viele T_H-Zellen wie T_{regs} vor.

Bei HT115 hatte die Infektion mit H-1PV keine Auswirkung auf die CD4⁺ T-Zell-Differenzierung (siehe Abbildung 5.13).

Zusammenfassend veränderte H-1PV bei keiner der untersuchten CMS-Subgruppen das Verhältnis von T_{regs} zu T_H-Zellen. Die CD4⁺ T-Zellen lagen zu einem hohen Anteil als T_H-Zellen vor.

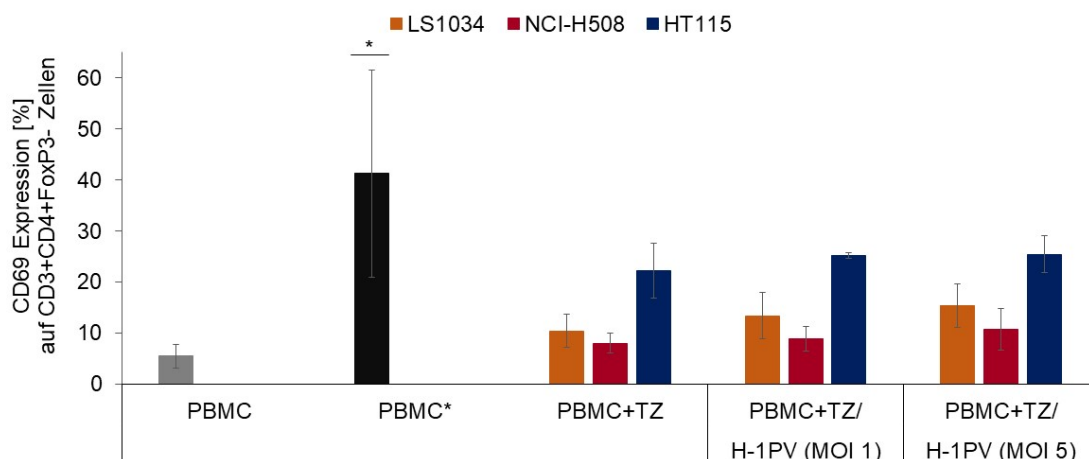


Abbildung 5.14: Anzahl an aktivierten T_H-Zellen (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻CD69⁺). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Oberflächenexpression von CD69 auf CD3⁺CD4⁺FoxP3⁻ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* p ≤ 0.05).

Aktiviert T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung antigenpräsentierender dendritischer Zellen.

Ergebnisse

In der PBMC-Kontrolle wurden 6 % aktivierte T_H -Zellen registriert. In der Aktivierungskontrolle lag ihr Anteil bei 41 %.

Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle bedingten die CMS2-Tumorzellen (LS1034 und NCI-H508) keine verstärkte Aktivierung von T_H -Zellen. Die Kokultivierung mit HT115 (CMS3) resultierte in einer Aktivierung von T_H -Zellen auf 22 %.

Die Infektion mit H-1PV induzierte bei beiden CMS-Subgruppen tendenziell eine Aktivierung von T_H -Zellen. Bei LS1034 wurden 15 % aktivierte T_H -Zellen detektiert, bei NCI-H508 11 % und bei HT115 25 %. Eine vollständige Aktivierung wurde weder bei CMS2 noch bei CMS3 erreicht (siehe Abbildung 5.14).

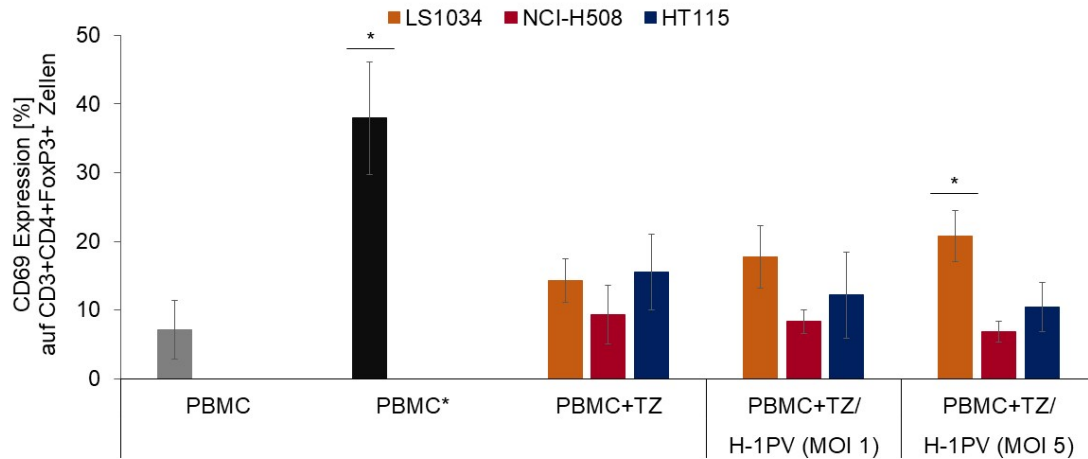


Abbildung 5.15: Anzahl an aktivierten T_{regs} ($CD3^+CD4^+FoxP3^+CD69^+$). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Oberflächenexpression von CD69 auf $CD3^+CD4^+FoxP3^+$ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$).

Aktiviert T_{regs} exprimieren unter anderem den Oberflächenmarker CD69. In der PBMC-Kontrolle fanden sich 7 % aktivierte T_{regs} , in der Aktivierungskontrolle stieg ihr Level auf 38 %.

Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle führte sowohl die Kokultivierung mit LS1034-Tumorzellen (CMS2) als auch die Kokultivierung mit HT115-Tumorzellen (CMS3) zu einer Aktivierung von T_{regs} . Bei LS1034 erhöhte sich ihr Anteil auf 14 %, bei HT115 auf 16 %. Bei der Zelllinie NCI-H508 (CMS2) konnte kein Effekt dargestellt werden.

Die Infektion mit H-1PV (MOI 5) resultierte bei LS1034 in einer statistisch signifikanten Aktivierung von T_{regs} auf 21 %. Bei NCI-H508 und HT115 führte die Infektion zu einer reduzierten Aktivierung von T_{regs} auf 7 % bzw. auf 10 %, die jedoch statistisch nicht signifikant war (siehe Abbildung 5.15).

5.2.5 Myeloide Suppressorzellen

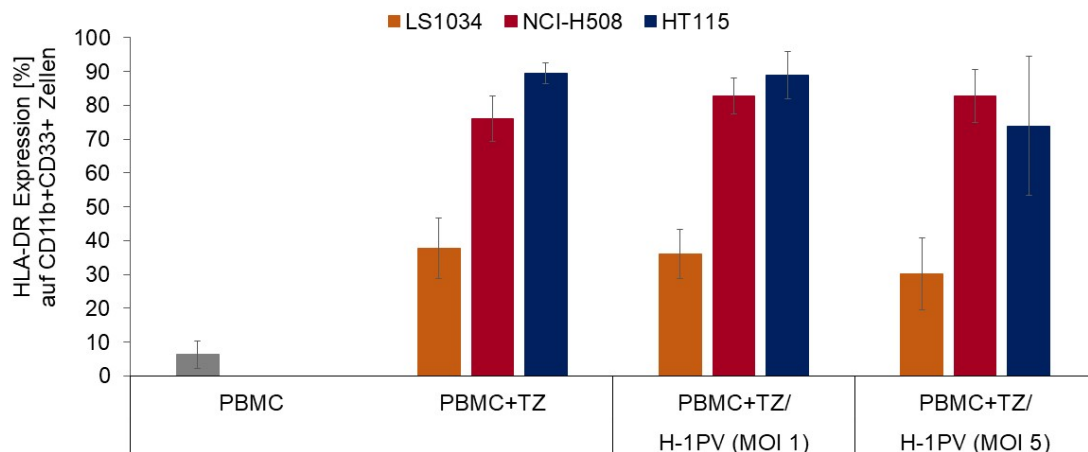


Abbildung 5.16: Anzahl an myeloiden Suppressorzellen (MDSCs). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Expression von HLA-DR auf CD11b⁺CD33⁺ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen.

MDSCs sind immunsuppressive Zellen, die durch die Oberflächenmarker CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁺ gekennzeichnet sind. In der PBMC-Kontrolle umfassten sie 6 % der CD11b⁺CD33⁺ Zellen.

Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle erhöhten alle untersuchten Tumorzellen das Level an MDSCs. Bei LS1034 (CMS2) wurde ein Wert von 38 %, bei NCI-H508 (CMS2) von 76 % und bei HT115 (CMS3) von 89 % erreicht.

Die Infektion mit H-1PV hatte weder bei CMS2 noch bei CMS3 eine Auswirkung auf den Anteil an MDSCs (siehe Abbildung 5.16).

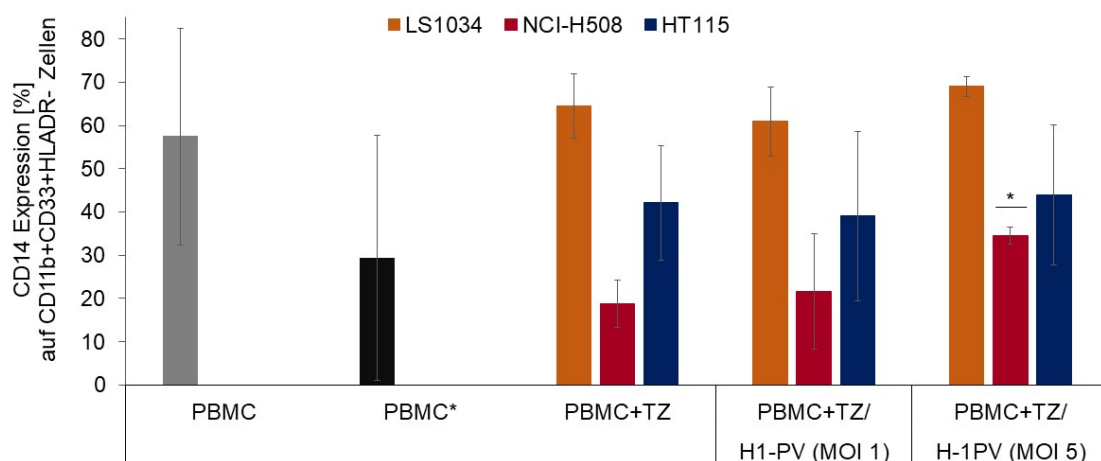


Abbildung 5.17: Anzahl an monozytischen MDSCs (M-MDSCs). Mit der FACS-Analyse wurde in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ die Oberflächenexpression von CD14 auf CD11b⁺CD33⁺HLA-DR⁻ PBMCs gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* p ≤ 0,05).

Ergebnisse

Monozytische MDSCs (M-MDSCs) stellen eine Untergruppe der MDSCs dar. Sie exprimieren den Oberflächenmarker CD14. 57 % der MDSCs lagen in der PBMC-Kontrolle als M-MDSCs vor. In der Aktivierungskontrolle reduzierte sich ihr Anteil auf 29 %.

In der Kokultur mit LS1034-Zellen (CMS2) konnte eine Zunahme der M-MDSCs auf 65 % beobachtet werden. Die Kokultivierung mit NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) reduzierte den Anteil an M-MDSCs auf 19 % bzw. auf 42 %.

Die Infektion mit H-1PV zeigte bei LS1034 und HT115 keine Auswirkung auf das Level an M-MDSCs. Bei der Zelllinie NCI-H508 führte die Infektion mit H-1PV (MOI 5) zu einer statistisch signifikanten Zunahme der M-MDSCs auf 35 % (siehe Abbildung 5.17).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung des Effekts von H-1PV auf ausgewählte Immunzellen. Statistisch signifikante Ergebnisse (* $p \leq 0,05$) sind entsprechend gekennzeichnet.

	LS1034 (CMS2)	NCI-H508 (CMS2)	HT115 (CMS3)
NK-Zellen	↔	↔	↔
Ausgereifte NK-Zellen	↔	↔	↓*
NKT-Zellen	↔	↔	↔
Ausgereifte NKT-Zellen	↔	↔	↔
Aktivierte zytotoxische T-Zellen	↔	↔	↑*
T _H -Zellen	↔	↔	↔
Aktivierte T _H -Zellen	↑	↑	↑
T _{regs}	↔	↔	↔
Aktivierte T _{regs}	↑*	↓	↓
MDSCs	↔	↔	↔
M-MDSCs	↔	↑*	↔

Tabelle 5.1 fasst den Effekt von H-1PV auf die untersuchten Immunzellen zusammen. Bei den CMS2-Tumorzellen führte die Infektion mit H-1PV zu einer Zunahme immunsuppressiver Immunzellen. Bei LS1034 nahm der Anteil an aktivierten T_{regs}, bei NCI-H508 der Anteil an M-MDSCs zu.

Bei den CMS3-Tumorzellen (HT115) zeigte sich ein heterogenes Bild, was den Effekt von H-1PV auf immunstimulierende Immunzellen anging. Während die Infektion mit dem onkolytischen Virus eine Abnahme von NK-Zellen bedingte, induzierte H-1PV die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen.

Sowohl bei CMS2 als auch bei CMS3 resultierte die Infektion mit H-1PV tendenziell in einer Aktivierung von T_H-Zellen.

5.3 Analyse der Zytokinkonzentrationen im Kokulturversuch

Im Anschluss an die Kokulturversuche wurde in den gesammelten Überständen mittels ELISA die Konzentration der Zytokine Granzym B (GranB), IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-6 und TGF β ermittelt. Wie auch in den Kokulturversuchen dienen die unstimulierten PBMCs als Referenz für das ruhende Immunsystem, während die stimulierten PBMCs als Aktivierungskontrolle fungierten.

5.3.1 Granzym B

GranB ist eine Serinprotease, die sich hauptsächlich in den intrazellulären Granula von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen befindet. Die Aktivierung dieser Zellen führt zur Ausschüttung von GranB, was wiederum die Apoptose in virusinfizierten und entarteten Zellen induziert.

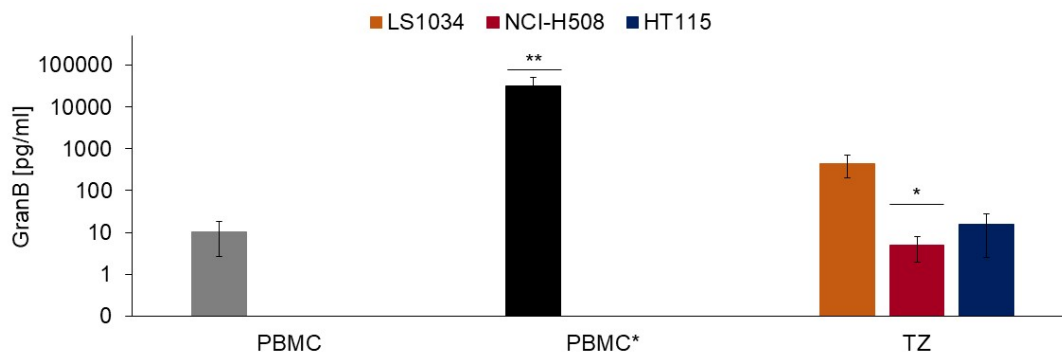


Abbildung 5.18: Freisetzung von Granzym B durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$). Logarithmische Darstellung.

Infolge der T-Zell-Aktivierung wird vermehrt GranB freigesetzt. In der Aktivierungskontrolle wurde eine Konzentration von 32.270 pg/ml gemessen. Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle (11 pg/ml) sezernierte die Zelllinie LS1034 (CMS2) deutlich mehr GranB (450 pg/ml). NCI-H508 (CMS2) setzte hingegen mit 5 pg/ml signifikant weniger bzw. kaum GranB frei. Bei HT115 (CMS3) war das Level an GranB mit 15 pg/ml ähnlich hoch wie in der PBMC-Kontrolle (siehe Abbildung 5.18).

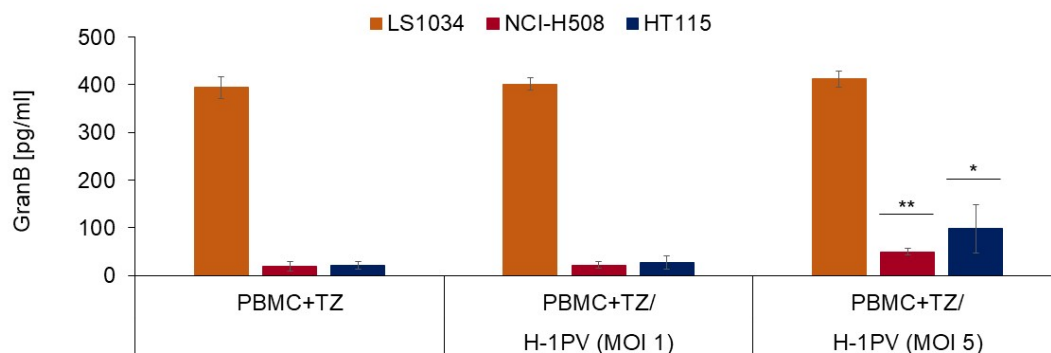


Abbildung 5.19: Konzentration von Granzym B in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$)

Im Vergleich zur Tumorzell-Kontrolle wurde in den Überständen der Kokultur mit LS1034 (CMS2) mit 395 pg/ml ein geringeres Level an GranB detektiert. Die Infektion mit H-1PV (MOI 5) induzierte eine leichte Erhöhung der GranB-Freisetzung auf 410 pg/ml. Damit war der Effekt

von H-1PV so gering ausgeprägt, dass er vernachlässigt werden kann. In den Überständen der Kokultur von NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) fand sich ein höheres Level an GranB als in der Tumorzell-Kontrolle. Bei NCI-H508 wurde mit 20 pg/ml eine 4-fach höhere Konzentration gemessen. Ein ähnlicher, wenngleich nicht ganz so deutlicher Effekt, konnte auch für HT115 gezeigt werden. Hier stieg die GranB-Freisetzung von 15 pg/ml auf 22 pg/ml an. H-1PV (MOI 5) infizierte NCI-H508- und HT115-Zellen induzierten in der Kokultur eine verstärkte Sekretion von GranB, die auch statistisch signifikant war. Bei NCI-H508 wurde ein Wert von 50 pg/ml, bei HT115 ein Wert von 100 pg/ml erzielt. Damit stieg das Level an GranB um das 2,5-fache bzw. um das 4,5-fache an (siehe Abbildung 5.19).

Zusammenfassend führte die Infektion mit H-1PV bei NCI-H508 und HT115 zu einer gesteigerten Sezernierung von GranB. Bei LS1034 konnte kein Effekt dargestellt werden.

5.3.2 IFN- γ

Bei IFN- γ handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem von NK-Zellen, T_H-Zellen und CD8⁺ T-Zellen freigesetzt wird. Eine vermehrte IFN- γ -Ausschüttung korreliert mit einer gesteigerten Immunzellaktivierung.

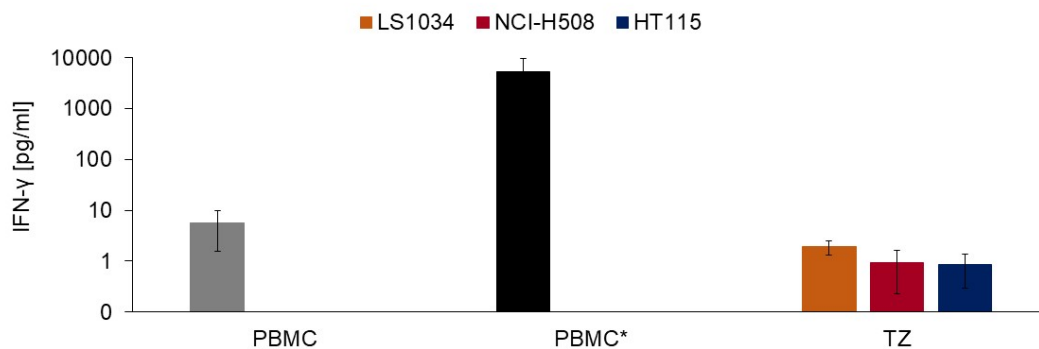


Abbildung 5.20: Freisetzung von IFN- γ durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen. Logarithmische Darstellung.

Während die Immunzellen in der PBMC-Kontrolle 6 pg/ml IFN- γ sezernierten, wurde in der Aktivierungskontrolle ein Level von 5.280 pg/ml detektiert. Von den getesteten kolorektalen Tumorzellen setzte keine das proinflammatorische Zytokin IFN- γ frei (siehe Abbildung 5.20).

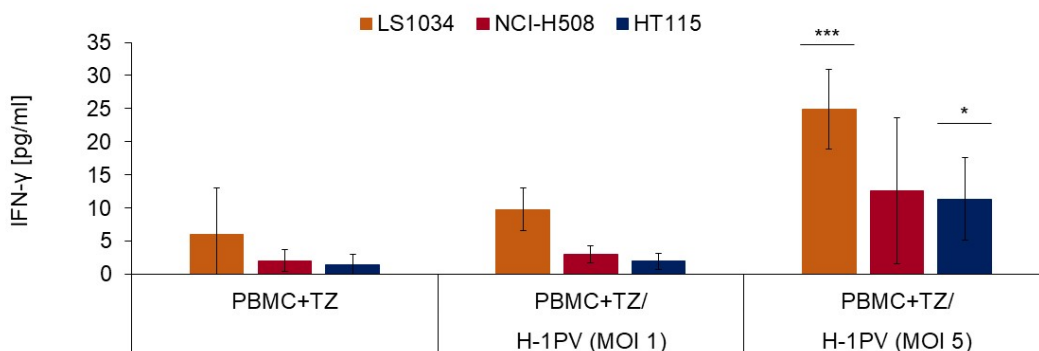


Abbildung 5.21: Konzentration von IFN- γ in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$).

In den gesammelten Überständen der Kokultur mit LS1034 (CMS2) zeigte sich mit 6 pg/ml eine ähnlich niedrige Konzentration von IFN- γ wie in den Überständen der PBMC-Kontrolle. Die Infektion mit H-1PV (MOI 5) führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des IFN- γ -Levels um das 4-fache auf 25 pg/ml. Bei NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) wurde sowohl in der Tumorzell-Kontrolle als auch in der Kokultur kaum IFN- γ freigesetzt. H-1PV führte bei einer Infektion mit MOI 5 bei beiden Zelllinien zu einer gesteigerten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins. Bei NCI-H508 wurde im Vergleich zur Kokultur eine ca. 6,5-fache Sekretion auf 13 pg/ml detektiert, bei HT115 eine ca. 8-fache Freisetzung auf 11 pg/ml (siehe Abbildung 5.21).

H-1PV induzierte somit bei allen untersuchten kolorektalen Tumorzellen eine erhöhte IFN- γ -Ausschüttung, wobei der deutlichste Effekt bei LS1034 zu beobachten war.

5.3.3 IL-2

IL-2 ist ein Zytokin mit proinflammatorischer Wirkung, welches von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und die T-Zell-Proliferation fördert (siehe Tabelle 2.8).

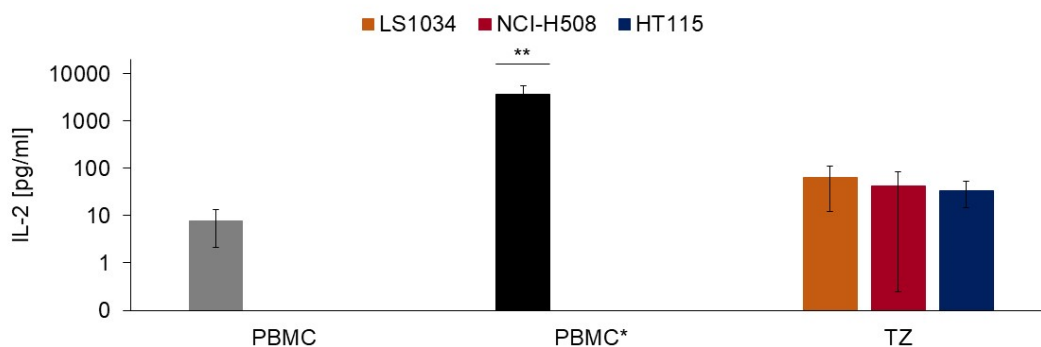


Abbildung 5.22: Freisetzung von IL-2 durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (** $p \leq 0.01$). Logarithmische Darstellung.

Die CMS2- und CMS3-Tumorzellen setzten, im Vergleich zur PBMC-Kontrolle (8 pg/ml), mehr IL-2 frei. In den Überständen mit LS1034 (CMS2) wurde ein Wert von 63 pg/ml gemessen, mit NCI-H508 (CMS2) von 43 pg/ml und mit HT115 (CMS3) von 34 pg/ml. In den Überständen der Aktivierungskontrolle lag die IL-2-Konzentration bei 3.700 pg/ml (siehe Abbildung 5.22).

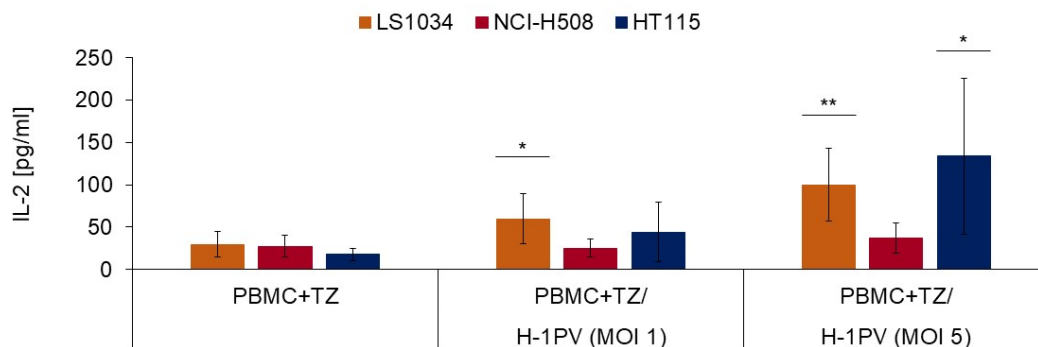


Abbildung 5.23: Konzentration von IL-2 in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Im Vergleich zu den Überständen der Tumorzell-Kontrolle fanden sich in den Überständen der Kokulturen bei allen Tumorzellen ein geringeres Level an IL-2. Bei LS1034 (CMS2) wurde in der Kokultur eine Konzentration von 29 pg/ml, bei NCI-H508 (CMS2) von 27 pg/ml und bei HT115 (CMS3) von 18 pg/ml detektiert. H-1PV-infizierte LS1034-Zellen verstärkten in der Kokultur die Freisetzung von IL-2. Bei einer MOI von 5 stieg die Konzentration um das 3,4-fache auf 100 pg/ml an. Derselbe Effekt wurde auch bei der Zelllinie HT115 beobachtet. Hier bewirkte die Infektion mit H-1PV (MOI 5) eine statistisch signifikante Erhöhung der IL-2-Konzentration um das 5-fache auf 134 pg/ml. Bei H-1PV (MOI 5) -infizierten NCI-H508-Zellen wurde ein IL-2-Level von 37 pg/ml gemessen. Damit induzierte H-1PV hier nur eine geringfügig höhere Sezernierung des Zytokins. Der Wert der Tumorzell-Kontrolle wurde nicht erreicht (siehe Abbildung 5.23).

Die Infektion mit H-1PV zog bei LS1034 und HT115 eine vermehrte Sekretion von IL-2 nach sich. Bei NCI-H508 konnte H-1PV keine erhöhte Ausschüttung von IL-2 induzieren.

5.3.4 IL-6

IL-6 verfügt sowohl über proinflammatorische als auch über antiinflammatorische Eigenschaften.

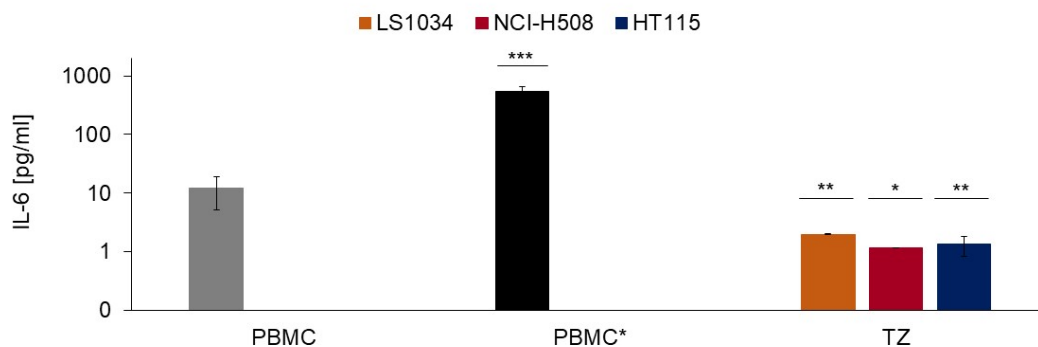


Abbildung 5.24: Freisetzung von IL-6 durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Logarithmische Darstellung.

Während in der PBMC-Kontrolle ein IL-6-Wert von 12 pg/ml detektiert wurde, lag die Konzentration in der Aktivierungskontrolle bei 536 pg/ml. Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle setzten die CMS2- und CMS3-Tumorzellen weniger IL-6 frei (siehe Abbildung 5.24).

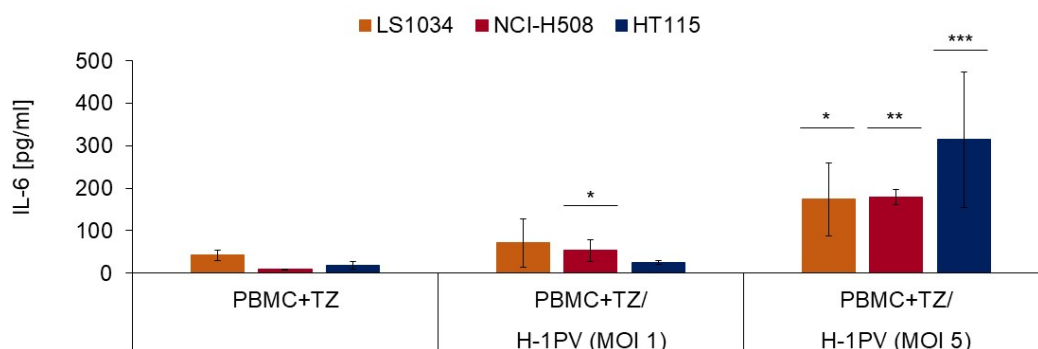


Abbildung 5.25: Konzentration von IL-6 in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Im Vergleich zur Tumorzell-Kontrolle führte die Kokultivierung bei allen untersuchten Tumorzellen eine gesteigerte Freisetzung von IL-6 herbei. Bei LS1034 (CMS2) stieg die Konzentration auf 43 pg/ml an, bei NCI-H508 (CMS2) auf 9 pg/ml und bei HT115 (CMS3) auf 18 pg/ml an. H-1PV (MOI 5) -infizierte Tumorzellen bedingten in der Kokultur eine statistisch signifikante Zunahme der IL-6-Ausschüttung. Bei LS1034 wurde der Anteil um das 4-fache auf 174 pg/ml erhöht, bei NCI-H508 um das 20-fache auf 180 pg/ml und bei HT115 um das 17,5-fache auf 315 pg/ml (siehe Abbildung 5.25).

Betrachtet man die Konzentration des Zytokins IL-6, führte H-1PV sowohl bei CMS2 als auch bei CMS3 zu einer deutlich erhöhten Freisetzung.

5.3.5 IL-10

IL-10 ist ein immunsuppressives Zytokin, das neben Monozyten und Makrophagen auch von T-Zellen sezerniert wird.

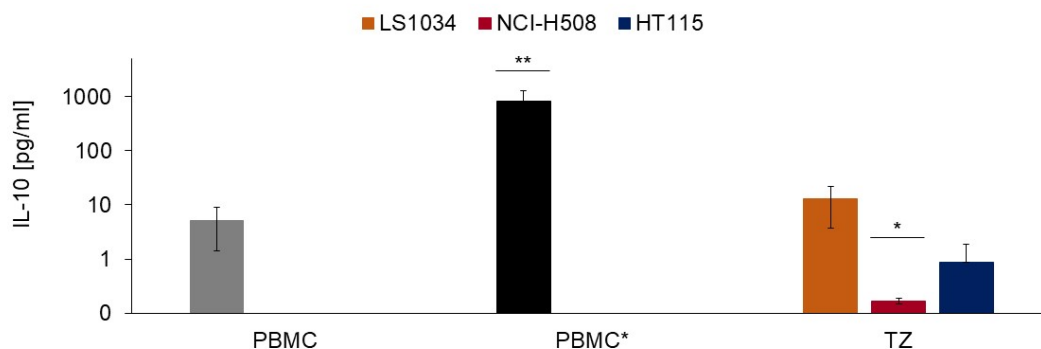


Abbildung 5.26: Freisetzung von IL-10 durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* $p \leq 0.05$). Logarithmische Darstellung.

Die Aktivierung von T-Zellen resultiert in einer vermehrten Freisetzung von IL-10 (835 pg/ml in der Aktivierungskontrolle). Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle (5 pg/ml) zeigte sich in den Überständen der Tumorzellen der Zelllinie LS1034 (CMS2) mit 13 pg/ml eine tendenziell erhöhte IL-10-Sekretion. In den Überständen von NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) wurde weniger IL-10 nachgewiesen (siehe Abbildung 5.26).

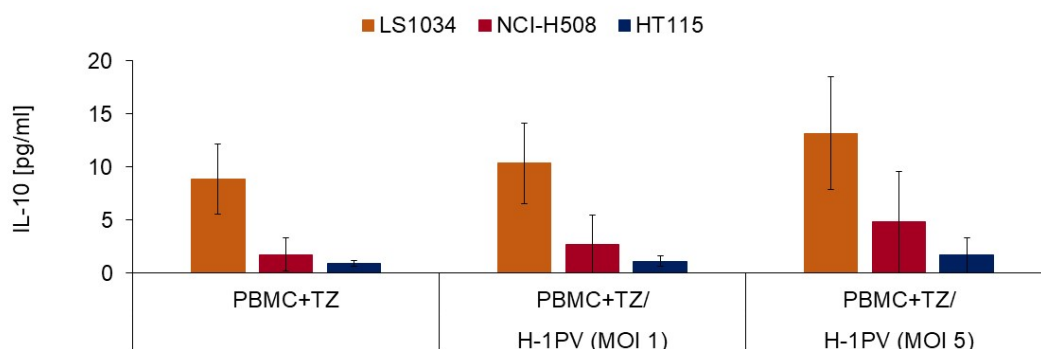


Abbildung 5.27: Konzentration von IL-10 in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen.

Bei den untersuchten CMS2- und CMS3-Tumorzellen hatte weder die Kokultivierung noch die Infektion mit H-1PV eine Änderung der IL-10-Konzentration zur Folge. Die gemessenen Werte entsprachen jeweils der Tumorzell-Kontrolle (siehe Abbildung 5.27).

5.3.6 TGFβ

Bei TGFβ handelt es sich um ein immunsuppressives Zytokin, das unter anderem T_{regs} induziert und von diesen auch sekretiert wird (s. Tabelle 2.8).

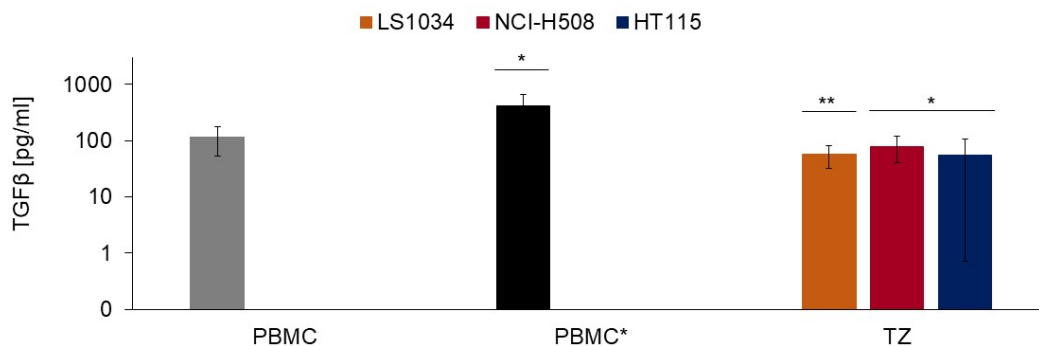


Abbildung 5.28: Freisetzung von TGFβ durch die TZ von CMS2 und CMS3. Abgebildet sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen und statistischer Signifikanz (* p ≤ 0.05; *** p ≤ 0.001). Logarithmische Darstellung.

Im Vergleich zur unstimulierten PBMC-Kontrolle, bei der ein TGFβ-Level von 115 pg/ml detektiert wurde, setzten die CMS2- und CMS3-Tumorzellen weniger TGFβ frei. Bei LS1034 (CMS2) lag die Konzentration in den Überständen bei 58 pg/ml, bei NCI-H508 (CMS2) bei 80 pg/ml und bei HT115 (CMS3) bei 54 pg/ml. Die Aktivierungskontrolle erreichte eine TGFβ-Ausschüttung von 423 pg/ml (siehe Abbildung 5.28).

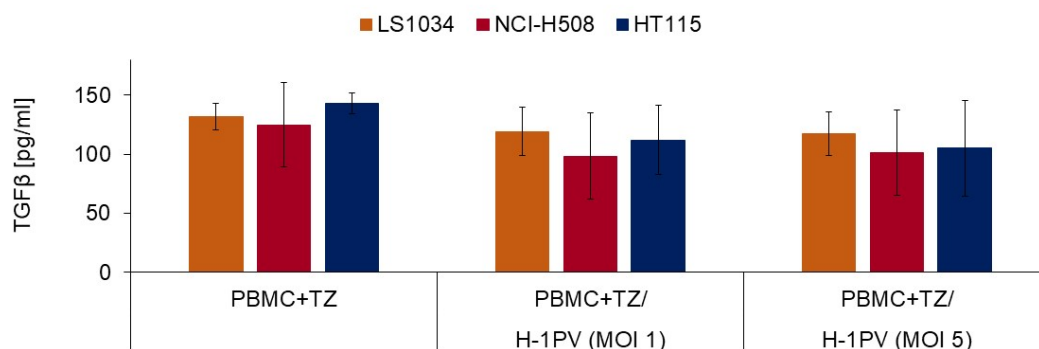


Abbildung 5.29: Konzentration von TGFβ in der Kokultur mit unbehandelten und infizierten TZ. Gemessen wurde die Zytokinkonzentration mit dem ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei ELISAs inklusive Standardabweichungen.

Im Vergleich zur Tumorzell-Kontrolle zeigte sich in den gesammelten Überständen der Kokultur bei allen getesteten Tumorzellen eine gesteigerte Sezernierung von TGFβ, die auch den Wert der unstimulierten PBMC-Kontrolle (ca. 115 pg/ml) übertraf. Bei LS1034 (CMS2) wurde ein Wert von 132 pg/ml gemessen, bei NCI-H508 (CMS2) von 125 pg/ml und bei HT115 (CMS3) von 143 pg/ml. H-1PV (MOI 5) induzierte in der Kokultur bei allen Tumorzellen eine reduzierte Ausschüttung von TGFβ. Bei LS1034 wurden 118 pg/ml freigesetzt, bei NCI-H508 101 pg/ml und bei HT115 105 pg/ml (siehe Abbildung 5.29).

Ergebnisse

Damit resultierte die Infektion mit H-1PV bei allen Zelllinien in einer reduzierten, wenngleich statistisch nicht signifikanten Sekretion des immunsuppressiven Zytokins TGF β . Am deutlichsten war der Effekt bei der Zelllinie HT115.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung des Effekts von H-1PV auf die Konzentrationen verschiedener Zytokine. Statistisch signifikante Ergebnisse (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) sind entsprechend gekennzeichnet.

	LS1034 (CMS2)	NCI-H508 (CMS2)	HT115 (CMS3)
GranB	↔	↑ **	↑ *
IFN- γ	↑ **	↑	↑ *
IL-2	↑ **	↔	↑ *
IL-6	↑ *	↑ **	↑ ***
IL-10	↔	↔	↔
TGF β	↓	↓	↓

Zusammenfassend induzierte H-1PV sowohl bei CMS2 als auch bei CMS3 eine vermehrte Sezernierung der Zytokine IFN- γ und IL-6 durch Immunzellen. Gleichzeitig resultierte die Infektion mit dem onkolytischen Virus tendenziell in einer reduzierten Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins TGF β . Bei NCI-H508 und HT115 induzierte H-1PV die Ausschüttung der proinflammatorischen Serinprotease GranB, während bei LS1034 und HT115 ein erhöhtes Level des proinflammatorischen Zytokins IL-2 gemessen wurde (siehe Tabelle 5.2).

6 Diskussion

Das KRK zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen in Deutschland. Die klassischen Behandlungsmöglichkeiten umfassen Operationen, Chemo- und Radiotherapien. In Abhängigkeit von der Molekularbiologie des Tumors haben inzwischen auch Kombinationstherapien mit monoklonalen Antikörpern, die eine zielgerichtete und damit nebenwirkungsärmere Behandlung ermöglichen, Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Hierzu zählen zum Beispiel der EGFR-Inhibitor Cetuximab oder der VEGF-Inhibitor Bevacizumab (2). Trotz verbesserter und multimodaler Therapiekonzepte ist die Prognose des KRK weiterhin ungünstig. Da Tumore komplexe Strategien zur Umgehung des Immunsystems entwickeln und zunehmend Resistenzen gegen klassische Therapien ausbilden, ist es notwendig, neue Therapiestrategien zu entwickeln (7). Während CMS1-Tumore geeignete Kandidaten für die Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren darstellen, zeigt diese Form der immunzellaktivierenden Therapie bei den wenig immunogenen CMS2- und CMS3-Tumoren keinen Effekt (88). Die vorliegende Dissertation untersuchte das therapeutische Potenzial von H-1PV. Betrachtet wurde sowohl der direkte onkolytische Effekt auf die kolorektalen Tumorzellen des CMS2- (LS1034 und NCI-H508) und CMS3-Subtyps (CL-34 und HT115) als auch der indirekte Einfluss auf ausgewählte Immunzellen. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Identifizierung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen den beiden molekularen Subgruppen des KRK.

6.1 Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität

Der zytotoxische Effekt von H-1PV auf kolorektale Tumorzellen konnte bereits in einer früheren Arbeit dargestellt werden. Bei der Zelllinie SW480, die dem CMS4-Subtyp zuzuordnen ist, reduzierte H-1PV (MOI 20) die Zellviabilität auf weniger als 40 % (100). Im Zellmodell mit Kolonkarzinomzellen von CMS2 (LS1034 und NCI-H508) und CMS3 (CL-34 und HT115) bestätigte sich die virusvermittelte Onkolyse. Die Infektion mit H-1PV führte bei beiden molekularen Subtypen zu einer Reduktion der Zellviabilität. Erwartungsgemäß war die Zytotoxizität zum einen von der Inkubationszeit, zum anderen von der Viruskonzentration abhängig. Differenzen in der onkolytischen Wirksamkeit von H-1PV zeigten sich sowohl zwischen den verschiedenen molekularen Subtypen als auch innerhalb dieser.

6.1.1 Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität von CMS2

Vergleicht man die beiden Zelllinien der kanonisch aktiven Subgruppe des KRK untereinander, war der zytotoxische Effekt von H-1PV bei LS1034 stärker ausgeprägt als bei NCI-H508. Während H-1PV (MOI 10) bei LS1034-Tumorzellen eine maximale Reduktion der Zellviabilität auf 63 % erzielte, sank die Viabilität der NCI-H508-Tumorzellen bei der gleichen Viruskonzentration auf 76 % ab. In Anbetracht der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Zellen hätte man eher erwartet, dass die H-1PV induzierten Viabilitätseffekte bei der semi-adhären Zelllinie NCI-H508 stärker ausfallen als bei der adhären Zelllinie LS1034 (101, 102). Schließlich hat das onkolytische Virus bei semi-adhären Zellen eine größere Angriffsfläche zur Penetration. Die Diskrepanz kann jedoch auch auf das hohe Maß an Heterogenität innerhalb der CMS-Subgruppe zurückzuführen sein. Für beide CMS2-Zelllinien konnten jeweils typische Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen identifiziert werden. So unterscheiden sich LS1034 und NCI-H508 hinsichtlich des *KRAS*-Mutationsstatus. Während LS1034 durch eine Mutation des Onkogens *KRAS* gekennzeichnet ist, findet sich diese Mutation bei NCI-508 nicht (33). Für das onkolytische Reovirus konnte gezeigt werden, dass es sich vorzugsweise in *KRAS*-mutierten Zellen repliziert und diese lysiert (103-105). Damit könnte der *KRAS*-Mutationsstatus die größere onkolytische Wirksamkeit von H-1PV bei LS1034 erklären. Unterstützt wird diese These dadurch, dass auch bei den untersuchten CMS3-Tumorzellen CL-34 und HT115 keine *KRAS*-Mutation vorliegt. Betrachtet man die Abbildung 5.5, so induzierte H-1PV (MOI 1, 5 und 10) bei der *KRAS*-mutierten Zelllinie LS1034

eine deutlichere Viabilitätsminderung als bei den *KRAS*-Wildtypen NCI-H508, CL-34 und HT115. Bei der Analyse weiterer molekularer Differenzen fällt auf, dass die Zelllinie NCI-508 durch eine Mutation des Gens *AKT1* (Alpha-Serin/Threonin Kinase 1) charakterisiert ist (33). In einer Studie, bei welcher der onkolytische Effekt des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) auf kolorektale Tumorzellen untersucht wurde, zeigte sich bei resistenten Zellen eine signifikant höhere *AKT1*-Expression (106). Auch auf dieser Grundlage lässt sich der unterschiedliche Viabilitätseffekt von H-1PV innerhalb der CMS2-Subgruppe begründen. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass der kanonisch aktive Subtyp von allen CMS-Subgruppen am heterogensten ist (107). Guinney et al. wiesen bei CMS2 eine größere Zunahme an Genkopien von Onkogenen und eine größere Abnahme an Genkopien von Tumorsuppressorgenen als bei jedem anderen CMS-Subtyp nach (14). Vor diesem Hintergrund wäre es sicherlich sinnvoll, noch weitere CMS2-Zelllinien auf die onkolytische Wirksamkeit von H-1PV zu untersuchen und zu prüfen, ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse auch für diese reproduzierbar sind.

6.1.2 Einfluss von H-1PV auf die Zellviabilität von CMS3

Die Zelllinien CL-34 und HT115 sind der metabolisch aktiven Subgruppe des KRK zugeordnet. Beides sind epitheliale und adhärente Zellen (108, 109). Im direkten Vergleich wiesen die CL-34-Tumorzellen eine stärkere Sensitivität gegenüber H-1PV auf. Die Infektion mit H-1PV (MOI 15) resultierte in einer Reduktion der Zellviabilität auf 68 %. Bei HT115-Tumorzellen wurde die maximale Viabilitätsminderung auf 76 % mit einer MOI von 20 erzielt. Einen Erklärungsansatz für die unterschiedlich ausgeprägte onkolytische Wirksamkeit können auch hier die verschiedenen molekularbiologischen Eigenschaften bieten. Während es sich bei CL-34 um eine mikrosatelliteninstabile Zelllinie handelt, sind HT115-Tumorzellen mikrosatellitenstabil. Es ist allerdings fraglich, ob der Mikrosatellitenstatus ursächlich für den unterschiedlichen Viabilitätseffekt ist. Im Versuch mit einem onkolytischen Reovirus konnte kein deutlicher Sensitivitätsunterschied zwischen mikrosatellitenstabilen- und -instabilen kolorektalen Tumorzellen festgestellt werden (104). Neben dem Mikrosatellitenstatus unterscheiden sich die beiden getesteten CMS3-Tumorzelllinien im Mutationsstatus des Onkogens *BRAF*. Während es bei HT115 als Wildtyp vorliegt, ist es bei CL-34 mutiert (33, 110). Die vorliegende *BRAF*^{V600E} Mutation gilt als negativer prognostischer Faktor beim metastasierten KRK. Sie stimuliert den *MAPK* (mitogen-aktivierte Proteinkinase) / *ERK* (extrazelluläre signalregulierte Kinase) Signalweg, der an der Proliferation, Migration und Angiogenese sowie an der Suppression der Apoptose beteiligt ist. Die therapeutischen Optionen für Patientinnen und Patienten mit *BRAF*-mutiertem KRK sind begrenzt, in der Regel kommen Kombinationstherapien aus einer Chemotherapie-Triplette mit Bevacizumab zum Einsatz (111). Wenngleich sich der onkolytische Effekt von H-1PV auf CL-34-Tumorzellen limitiert zeigte, sollte geprüft werden, ob das onkolytische Virus in Kombination mit anderen Therapien eine deutlichere Viabilitätsminderung bewirken kann.

Moehler et al. konnten in einer vorherigen Arbeit zeigen, dass H-1PV bei der Melanomzelllinie SK29Mel einen annähernd vollständigen Viabilitätsverlust auf weniger als 10 % induziert. Die ebenfalls untersuchten LS1034-Tumorzellen reagierten weniger sensitiv auf das onkolytische Virus (112). Auch in der vorliegenden Dissertation war der onkolytische Effekt auf die untersuchten kolorektalen Tumorzelllinien limitiert. Sowohl beim CMS2- als auch beim CMS3-Subtyp bedingte die Infektion mit H-1PV (MOI 15) eine Viabilitätsminderung auf ca. 70 %. Bei der Suche nach molekularbiologischen Gemeinsamkeiten fällt auf, dass alle getesteten kolorektalen Tumorzellen eine Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* aufweisen (33). Es spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der Zellteilung und des Zelltodes. Als Antwort auf die Synthese fremder DNA induziert *TP53* den Zellzyklusarrest und/oder die Apoptose (113). Der Funktionsverlust dieses Tumorsuppressorgens geht in der Regel mit einem aggressiveren Krebs-Phänotyp sowie einem schlechteren klinischen Outcome einher. Für das hepatozelluläre Karzinom konnte eine größere zytotoxische Wirksamkeit von H-1PV auf *p53*-negative Tumorzellen im Vergleich zu *p53*-positiven Tumorzellen dargestellt werden (114). Vor diesem Hintergrund lässt sich der insgesamt limitierte onkolytische Effekt von H-1PV auf die

untersuchten *p53*-positiven CMS2- und CMS3-Tumorzellen erklären. Im direkten Vergleich wiesen die CMS2-Tumorzellen eine stärkere Sensitivität gegenüber H-1PV auf. Eine vollständige Hemmung der Zellviabilität konnte bei beiden molekularen Subtypen nicht erreicht werden. Mit einer verbleibenden Tumorzellviabilitätsrate von über 60 % erwiesen sich die durch H-1PV induzierten Viabilitätseffekte als zu gering, um als Monotherapie eingesetzt zu werden. Das Ergebnis deckt sich mit früheren Beobachtungen, in denen H-1PV zwar durchaus zytotoxisch auf kolorektale Tumorzellen wirkte, allerdings nur bei hohen Viruskonzentrationen und langen Inkubationszeiten. Es hat den Anschein, als sei die Fähigkeit zur Virusreplikation in kolorektalen Tumorzellen beeinträchtigt (115, 116). An dieser Stelle soll noch einmal im Detail auf den Vermehrungszyklus von H-1PV eingegangen werden. Kulkarni et al. haben Laminin $\gamma 1$ (*LAMC1*) als wichtigen Modulator der H-1PV-Infektion identifiziert. Das Glykoprotein ist essenziell für die Adsorption und Penetration des onkolytischen Virus. Die Arbeitsgruppe konnte eine direkte Korrelation zwischen der *LAMC1*-Expression und der virusvermittelten onkolytischen Aktivität nachweisen. Tumore mit einem erhöhten Level an *LAMC1* zeigten sich empfänglicher für H-1PV basierte Therapien. Unter den 59 untersuchten Zelllinien fanden sich auch kolorektale Tumorzellen. Neben ovariellen Tumorzellen wiesen sie die höchste Resistenz gegenüber H-1PV auf (117). Wenngleich die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten CMS2- und CMS3-Tumorzellen nicht analysiert wurden, wurde mit HT29 zumindest ein Vertreter des CMS3-Subtyps betrachtet. Im Vergleich zu den anderen getesteten kolorektalen Tumorzellen, die entweder dem CMS1- oder dem CMS4-Subtyp zuzuordnen waren, zeigte H-1PV beim CMS3-Subtyp HT29 den deutlichsten Viabilitätseffekt (117). Neben *LAMC1* macht sich H-1PV auch das Glykoprotein Galectin-1 (Gal-1) bei der Penetration von Tumorzellen zu Nutze. Der Knockout des Gens *LGALS1*, welches für Gal-1 codiert, verringert die Fähigkeit von H-1PV zur Infektion und Lyse von Tumorzellen (118). Es wäre interessant zu wissen, wie hoch die *LAMC1*- und *LGALS1*-Expression bei den hier getesteten CMS2- und CMS3-Tumorzellen ist. Möglichweise könnte so ein weiterer Schlüsselfaktor identifiziert werden, der zum Verständnis der heterogenen Sensitivität gegenüber H-1PV beiträgt.

Neben der zytotoxischen Aktivität verfügen onkolytische Viren über weitere antitumorale Eigenschaften. Sie können Immunzellen aktivieren und die immunsuppressive, „kalte“ Tumormikroumgebung in ein proinflammatorisches, „heißes“ Mikromilieu umwandeln (119, 120). Diesem Aspekt widmete sich der zweite Teil der Arbeit.

6.2 Einfluss von CMS2 und CMS3 auf das Immunsystem

6.2.1 Verteilung und Aktivierung von Immunzellen

Die molekularen Subtypen CMS2 und CMS3 gelten als „kalte“ Tumoren und sind durch eine schwache Immunzellinfiltration gekennzeichnet (37, 121, 122). Die im Rahmen der Kokulturversuche analysierten kolorektalen Tumorzellen des CMS2- (LS1034 und NCI-H508) und CMS3-Subtyps (HT115) sind allesamt mikrosatellitenstabil. Studien haben gezeigt, dass der Erfolg von Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren mit dem Mikrosatellitenstatus korreliert. In einer klinischen Studie konnte belegt werden, dass insbesondere Patientinnen und Patienten mit MSI-H- bzw. dMMR-Tumoren von der kombinierten Therapie mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab und dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab profitieren (44, 123). Begründet ist das darin, dass diese Tumoren eine hohe Mutationslast aufweisen, die zu einer vermehrten Freisetzung tumorspezifischer Antigene führt. Folge ist eine erhöhte Immunogenität des Tumors sowie eine größere Angriffsfläche für immunstimulierende Therapien (44). Um neue Ansatzpunkte für die Behandlung von MSS- bzw. pMMR-Tumoren zu identifizieren gilt es, die Wechselwirkungen zwischen MSS-Tumorzellen und humanem Immunsystem zu verstehen. An dieser Stelle sei explizit darauf hingewiesen, dass mit der vorliegenden Dissertation nicht die Immunzellinfiltration untersucht wurde. Stattdessen dienten die Kokulturversuche als Modellsystem, um den Effekt der kolorektalen Tumorzellen des CMS2- und CMS3-Subtyps sowie den Einfluss von H-1PV auf die Verteilung und Aktivierung ausgewählter Immunzellen

darzustellen. Die komplexen Vorgänge und Regulationsmechanismen, die innerhalb eines Organismus ablaufen, konnten in den in-vitro-Versuchen nicht rekonstruiert werden.

Als zentrale Zellpopulation der frühen Immunität wurde der Effekt der kolorektalen Tumorzellen auf NK-Zellen untersucht. Während die CMS2-Tumorzellen eine Abnahme von NK-Zellen induzierten, konnte dieser Trend beim CMS3-Subtyp nicht dargestellt werden. Das Ergebnis deckt sich mit dem von Lin et al. sowie dem von Becht et al. Diese Arbeitsgruppen fanden beim CMS3-Subtyp sogar ein höheres Level an NK-Zellen (121, 124). Das passt insofern, als dass CMS3-Tumore im direkten Vergleich eine höhere Immunaktivität aufweisen als CMS2-Tumore (14). Allerdings existieren auch Studien, in denen sowohl bei CMS2- als auch bei CMS3-Tumoren ein geringerer Anteil an NK-Zellen registriert wurde (107). In der vorliegenden Arbeit veranlassten beide molekulare Subgruppen eine deutliche Reduktion der Ausreifung von NK-Zellen. Beim CMS3-Subtyp war der Effekt stärker ausgeprägt als beim CMS2-Subtyp. Das könnte mit ein Grund für die schlechtere Prognose von CMS3-Tumoren sein (13).

Auch die analysierten NKT-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren. Aktivierte NKT-Zellen sezernieren große Mengen an Zytokinen. Durch die Freisetzung zytotoxischer Moleküle sind sie zur direkten Lyse von Tumorzellen befähigt (125). Anhand ihres TCR können NKT-Zellen in zwei Subtypen unterteilt werden. Während Typ I NKT-Zellen eine invariante TCR α -Kette besitzen, verfügen Typ II NKT-Zellen über ein vielfältiges TCR-Repertoire. Damit sind sie in der Lage, eine Vielzahl von Antigenen zu erkennen. Typ I NKT-Zellen zeichnen sich insbesondere durch antitumorale Funktionen aus. Sie setzen proinflammatorische Zytokine frei, die wiederum NK-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Typ II NKT-Zellen weisen vor allem protumorale Eigenschaften auf. Sie unterstützen die tumorfördernden Funktionen von MDSCs und supprimieren die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen. Typ I und Typ II NKT-Zellen regulieren sich gegenseitig. Der dominierende Zelltyp bestimmt die nachfolgende Immunantwort (74). Für das KRK wurden sowohl tumorfördernde als auch tumorsupprimierende Eigenschaften von NKT-Zellen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass sich IL-10-sezernierende NKT-Zellen in präkanzerösen Polypen anreichern und dass Typ I NKT-Zellen die Entstehung intestinaler Polypen fördern. Auf der anderen Seite konnte in einer Studie, in der das Tumorgewebe von 103 Patientinnen und Patienten mit KRK untersucht wurde, eine erhöhte Infiltration mit Typ I NKT-Zellen demonstriert werden, was mit einer verbesserten Prognose einherging (74, 126). In der vorliegenden Dissertation reduzierten die Tumorzellen von CMS2 und CMS3 die Ausreifung von NKT-Zellen. Eine Differenzierung zwischen Typ I und Typ II NKT-Zellen wurde nicht vorgenommen. In Anbetracht der antagonistischen Funktionen beider Subtypen sowie aufgrund der in der Vergangenheit teils widersprüchlichen Beobachtungen ist eine Aussage hinsichtlich der Bedeutung für das Tumormikromilieu schwierig. Die meisten Publikationen beschreiben eine antitumorale Wirkung von NKT-Zellen (74). Damit ist die reduzierte Ausreifung von NKT-Zellen als vorteilhaft für die Tumorprogression anzusehen.

Charakteristisch sowohl für CMS2 als auch für CMS3 ist die Exklusion infiltrierender T-Zellen aus der Tumormikroumgebung (107). Untersuchungen bei anderen Tumorentitäten haben ergeben, dass hierfür neben der Aktivierung des Wnt-Signalweges (typisch für CMS2) auch mit *KRAS*-Mutationen (charakteristisch für CMS3) assoziierte Co-Mutationen verantwortlich sind (88). Interessanterweise induzierten die LS1034-Tumorzellen des CMS2-Subtyps in den Kokulturversuchen eine zwar geringfügige, aber dennoch statistisch signifikante Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen. Das würde zur guten Prognose des CMS2-Subtyps passen. Auch in der Arbeit von Li et al. zeigte sich beim CMS2-Subtyp ein hohes Level an CD8⁺ T-Zellen (121). Erwartet hätte man dieses Ergebnis trotzdem nicht, denn in der Regel finden sich bei CMS2-Tumoren fast keine T-Zellen. Ihre Exklusion ist ein wichtiger Mechanismus der Immunevasion und gilt als negativer prognostischer Faktor (127). Die beiden anderen getesteten Tumorzelllinien hatten keine Auswirkung auf die Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen. Spannend wäre gewesen zu sehen, welchen Effekt die MSI-Tumorzelllinie CL-34 auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen hat. Generell zeigt sich bei Patientinnen und Patienten mit MSI-Tumoren eine deutlich höhere Infiltration von CD8⁺ T-Zellen und eine bessere Prognose als bei Patientinnen und Patienten mit MSS-Tumoren (127).

Alle getesteten Tumorzelllinien veranlassten eine Zunahme an T_H-Zellen um das ca. 2,5-fache im Vergleich zur PBMC-Kontrolle. Des Weiteren führten die Tumorzellen beider molekularer Subtypen zu einer leichten Aktivierung von T_H-Zellen. Im direkten Vergleich fiel die Aktivierung durch die CMS3-Tumorzellen stärker aus. Eine Differenzierung zwischen T_H1- und T_H2-Zellen ist nicht erfolgt. Beim KRK geht eine erhöhte Infiltration mit T_H1-Zellen mit einer guten Prognose einher. T_H1-Zellen reduzieren die Proliferation und Angiogenese von Tumorzellen, fördern die Apoptose von Tumorzellen und rekrutieren CD8⁺ T-Zellen. Welche Rolle T_H2-Zellen beim KRK einnehmen, wird kontrovers diskutiert. Zwar führen die durch T_H2-Zellen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine zu chronischen Entzündungen, welche die Karzinogenese begünstigen. T_H2-Zytokine können aber auch eosinophile Granulozyten mit antitumoralen Eigenschaften rekrutieren und die Tumorprogression durch die Modulation der Gefäßversorgung verzögern (127). Vor diesem Hintergrund ist es schwer zu sagen, was die gewonnenen Erkenntnisse für die Tumormikroumgebung bedeuten. Insgesamt scheinen die antitumoralen Eigenschaften von T_H-Zellen zu überwiegen. In Anbetracht der Tatsache, dass der CMS2-Subtyp eine bessere Prognose aufweist als der CMS3-Subtyp, hätte man die stärkere Aktivierung von T_H-Zellen eher beim CMS2-Subtyp vermutet (13). Sicherlich sind jedoch noch andere Faktoren dafür verantwortlich, dass der CMS2-Subtyp die bessere Prognose aufweist. Allerdings konnte auch die Arbeitsgruppe um Li et al. beim CMS2-Subtyp ein höheres Level an CD4⁺ T-Zellen nachweisen als beim CMS3-Subtyp (121).

Neben Immunzellen, die mit einer guten Prognose des KRK einhergehen, wurden auch Immunzellen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, betrachtet. Im Rahmen der Progression von Krebserkrankungen sind unter anderem T_{regs} von besonderer Bedeutung. Die durch sie vermittelte Immunsuppression wird neben der Freisetzung immunsuppressiver Zytokine auch durch die verminderte Aktivierung von T_H-Zellen induziert. T_{regs} exprimieren darüber hinaus hohe Level an CTLA-4 und PD-1 auf ihrer Oberfläche (85). Bei Patientinnen und Patienten mit KRK finden sich zwei Subtypen: nicht-suppressive T_{regs} und aktivierte T_{regs}. Erstere sind keine funktionalen T_{regs}. Sie können die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nicht supprimieren und sezernieren außerdem große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ , IL-2 und TNF α . Picard et al. haben demonstriert, dass nur aktivierte T_{regs} mit fortgeschrittenen Stadien und ungünstigen Prognosen des KRK einhergehen (37). Damit lassen sich auch die dem ersten Anschein nach widersprüchlichen Ergebnisse der Kokulturversuche verstehen: Während NCI-H508- und HT115-Tumorzellen eine Abnahme von T_{regs} induzierten, führten LS1034- und HT115-Tumorzellen eine Aktivierung von T_{regs} herbei. Als zweite wichtige Gruppe suppressiver Immunzellen gelten MDSCs. Wie schon zuvor beschrieben, hemmen sie die antitumoralen Funktionen von NK-Zellen und T-Zellen, wobei ihre immunsuppressive Funktion insbesondere auf der Inhibierung der T-Zell-Proliferation beruht. Darüber hinaus fördern sie die Akkumulation und Aktivierung anderer immunsuppressiver Zellen wie T_{regs} und M2-Makrophagen und tragen damit signifikant zur Progression von Tumoren bei (128, 129). Beim KRK korreliert eine erhöhte Anzahl an MDSCs mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer stattgehabten Metastasierung. Des Weiteren ist ein erhöhter Anteil an MDSCs mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Überleben nach Chemotherapie assoziiert (130). Mit der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass sowohl die CMS2- als auch die CMS3-Tumorzellen eine deutliche Anreicherung von MDSCs veranlassten. Im Vergleich zur PBMC-Kontrolle, bei welcher das Level an MDSCs bei ca. 6 % lag, wurde in der Kokultur mit LS1034 ein Anteil von ca. 38 %, bei NCI-H508 von ca. 76 % und bei HT115 von ca. 89 % erreicht. LS1034-Tumorzellen induzierten zusätzlich eine deutliche Zunahme an M-MDSCs, bei denen es sich um eine Untergruppe der MDSCs handelt. Es scheint, als laufe die durch die kolorektalen Tumorzellen beider molekularer Subtypen induzierte Immunsuppression über den myeloiden Weg. Das Ergebnis deckt sich mit einer klinischen Studie, bei der im Blut von Patientinnen und Patienten mit KRK ein signifikanter Anstieg an MDSCs registriert wurde (129).

Zusammenfassend zeigte sich sowohl zwischen den beiden CMS-Subgruppen als auch innerhalb dieser ein heterogenes Bild der Immunaktivität. Zum Teil veranlassten die kolorektalen Tumorzellen eine stärkere Immunantwort, als man es bei den in der Literatur als wenig immunogen bezeichneten CMS2- und CMS3-Subtypen erwartet hätte (14).

6.2.2 Produktion von Zytokinen

Um der Immunüberwachung zu entgehen, setzen Tumore zahlreiche Moleküle mit immunsuppressiven Eigenschaften frei. Hierzu zählen in erster Linie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β . Sie werden zum einen von den Tumorzellen selbst, zum anderen von infiltrierenden Immunzellen wie T_{regs} und MDSCs produziert. Auch kolorektale Tumorzellen sezernieren vermehrt IL-10 (120). In der vorliegenden Arbeit konnte das für die Zelllinie LS1034 (CMS2) gezeigt werden. Erhöhte Serumlevel von IL-10 gelten beim KRK als negativer prognostischer Faktor, sowohl für das Therapieansprechen als auch für das Überleben. IL-10 und TGF β inhibieren die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, fördern das Überleben von T_{regs} und modulieren die Aktivität anderer immunsuppressiver Zellen. So entsteht ein komplexes und dynamisches Netzwerk mit dem Ziel, die Entwicklung und Metastasierung des Tumors zu gewährleisten (120). In den Überständen der Kokultur mit PBMCs wurde sowohl bei CMS2- als auch bei CMS3-Tumorzellen ein erhöhtes Level an TGF β registriert. Wie bereits erwähnt, sind beide molekulare Subtypen wenig immunogen, d.h. sie induzieren eine schwache Antitumor-Immunantwort (131). Damit überrascht es, dass die CMS2- und CMS3-Tumorzellen in der vorliegenden Arbeit vermehrt immunsuppressive Zytokine sezernierten. In der Literatur ist eine erhöhte TGF β -Freisetzung vor allem für den CMS4-Subtyp beschrieben (11, 23, 33).

Auch das Zytokin IL-6 wird von vielen Tumorzellen freigesetzt. Es trägt zur Karzinogenese bei, indem es die Differenzierung, Proliferation und Metastasierung von Tumoren fördert. Erhöhte Serumlevel von IL-6 sind beim KRK mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Gleichwohl werden IL-6 auch antitumorale Funktionen zugesprochen, da es bekanntermaßen an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist. IL-6 wird in Lymphknoten von DCs freigesetzt und begünstigt die Differenzierung von T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen. In der Tumormikroumgebung fördert es die Rekrutierung von CD8⁺ Effektor-T-Zellen (79, 128, 132, 133). Die untersuchten kolorektalen Tumorzellen vom CMS2- und CMS3-Subtyp setzten kein IL-6 frei. In den Überständen der Kokultur mit PBMCs fand sich hingegen bei allen untersuchten kolorektalen Tumorzellen eine erhöhte IL-6-Konzentration. In Übereinstimmung mit Tarazona et al. konnte kein deutlicher Unterschied zwischen CMS2 und CMS3 festgestellt werden (134).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ebenfalls die Konzentration der Serinprotease GranB ermittelt. Über die Aktivierung der Caspasenkaskade induziert sie die Apoptose von Tumorzellen (135, 136). Ein hohes Level an GranB ist beim KRK mit einer günstigen Prognose assoziiert (137). Die Serinprotease wird aber auch von T_{regs} zur Eliminierung von proinflammatorischen Immunzellen genutzt (136). GranB wird überwiegend von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen sezerniert (135, 136). Für den CMS2-Subtyp scheint das nicht zuzutreffen. Die auf Grundlage der Studien AVANT und GSE39582 gesammelten Daten von Daemen et al. suggerieren, dass bei CMS2 weder CD8⁺ T-Zellen noch NK-Zellen die Hauptproduzenten von GranB sind (137-139). Stattdessen wird die Protease vor allem von den Tumorzellen selbst produziert (137). Das deckt sich nur zum Teil mit den hier gewonnenen Erkenntnissen. Während bei den LS1034-Tumorzellen ein erhöhtes Level an GranB registriert wurde, war die Konzentration bei NCI-H508-Tumorzellen, welche ebenfalls CMS2 zuzuordnen sind, im Vergleich zur PBMC-Kontrolle erniedrigt. Beim CMS3-Subtyp HT115 zeigte sich im Überstand ein ähnliches Level an GranB wie in der PBMC-Kontrolle. In den Überständen der Kokultur mit PBMCs wurde bei NCI-H508 und HT115 eine höhere Konzentration an GranB detektiert.

Neben antiinflammatorischen Zytokinen wurden auch die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-2 betrachtet. In den Überständen der Kokultur mit PBMCs fand sich bei allen Tumorzellen ein geringeres Level an IL-2. Auf die Sezernierung von IFN- γ hatten die CMS2- und CMS3-Subtypen hingegen keinen Einfluss. Das ist insofern nicht verwunderlich, als dass es sich bei allen getesteten Tumorzellen um MSS-Tumorzelllinien handelt. Die erhöhte Infiltration mit CD8⁺ T-Zellen und die konsekutiv gesteigerte Sekretion von IFN- γ ist hingegen typisch für MSI-Tumorzellen (23).

6.3 Einfluss von H-1PV auf das Immunsystem

6.3.1 Verteilung und Aktivierung von Immunzellen

Schon in der Vergangenheit wurde demonstriert, dass H-1PV die tumorbedingte Immunsuppression durch die Induktion eines immunogenen Zelltodes und die Etablierung einer proinflammatorischen Tumormikroumgebung umzukehren vermag (89). Zum genaueren Verständnis der durch H-1PV vermittelten Immunmodulation wurden bereits zahlreiche in-vitro-Studien durchgeführt. In der Kokultur von Melanomzellen mit DCs induzierte die Infektion mit H-1PV eine verstärkte Aktivierung und Ausreifung von DCs, begleitet von der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF α . Ausgereifte DCs aktivierten antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen, was wiederum in einer erhöhten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ resultierte (5, 89). Für die kolorektalen Tumorzelllinien Colo32, HT29, Lovo und SW480 wurde ein verstärkender Effekt von H-1PV auf die durch NK-Zellen induzierte Zytotoxizität dargestellt (115). Bei den hier untersuchten Tumorzellen des CMS2- und CMS3-Subtyps hatte die Infektion mit H-1PV weder eine Auswirkung auf die Anzahl noch auf die Ausreifung von NK-Zellen. Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch zu vorherigen Arbeiten, in denen H-1PV bei Pankreas- und Kolonkarzinomzellen die Aktivierung von NK-Zellen induzierte (120, 140, 141).

Neben NK-Zellen wird die Immunüberwachung von Tumoren vor allem durch aktivierte CD8⁺ T-Zellen vermittelt (120, 142). Ihre Existenz innerhalb des Tumormikromilieus gilt als wichtiger prognostischer Marker. Ein hoher Anteil CD8⁺ T-Zellen ist mit einem verbesserten Ansprechen auf Immuntherapien assoziiert (143). In den durchgeführten Kokulturversuchen resultierte die Infektion mit H-1PV (MOI 5) beim CMS3-Subtyp HT115 in einer statistisch signifikanten Aktivierung CD8⁺ T-Zellen. Damit stimmen die Ergebnisse mit denen aus Zellmodellen zum malignen Melanom und zum Glioblastom überein. Auch bei diesen Tumorentitäten wurde gezeigt, dass H-1PV die Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen induziert (7, 85). Demgegenüber stehen die Resultate der Kokulturversuche mit CMS2-Tumorzellen. Hier bedingte die Infektion mit H-1PV keine Aktivierung CD8⁺ T-Zellen. Möglicherweise sind Unterschiede auf molekularbiologischer Ebene verantwortlich für den abweichenden Effekt von H-1PV. Shen et al. konnten nachweisen, dass das Expressions- und Methylierungslevel mehrerer Gene mit der Infiltration von CD8⁺ T-Zellen assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe fand bei CMS2-Tumorzellen eine Herabregulation der Genexpression von *ARHGAP9* und *TBX21 (T-bet)*. Beim CMS3-Subtyp war die Expression der Gene *ARHGAP9*, *TBX21 (T-bet)*, *FML1*, *HLA-DPB1* und *STX11* herabreguliert. Insgesamt zeigte sich bei beiden CMS-Subtypen ein geringes Methylierungslevel. Insbesondere *TBX21 (T-bet)* scheint beim KRK essenziell an der Regulation der T-Zell-Antwort beteiligt zu sein. Eine gesteigerte Expression von *TBX21 (T-bet)* sowie ein erhöhtes Methylierungslevel sind zur effektiven Strategie für die Immuntherapie „kalter“ Tumoren geworden (144). Untersuchungen von van den Berg et al. sowie von Guinney et al. haben ergeben, dass der CMS3-Subtyp im Vergleich zum CMS2-Subtyp durch ein höheres Methylierungslevel gekennzeichnet ist (14, 145). Das könnte erklären, wieso die Infektion mit H-1PV nur beim CMS3-Subtyp HT115 eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen induzierte.

Im Hinblick auf die Auswirkung von H-1PV auf NKT-Zellen wurden mit der vorliegenden Dissertation neue Erkenntnisse gewonnen. Arbeiten hierzu gibt es bislang nach meinem Kenntnisstand nicht. Die Analyse der Daten zeigt, dass die Infektion mit H-1PV bei beiden molekularen Subtypen weder einen Einfluss auf die Anzahl noch auf die Ausreifung von NKT-Zellen hatte. Ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Versuche wäre die Kombination von H-1PV mit der NKT-Zell-Immuntherapie. Präklinische Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von NKT-Zellen durch Glykolipide eine signifikante Antitumor-Immunantwort hervorruft (146). Im Mausmodell konnte die NKT-Zell-Immuntherapie bei 40-50 % der untersuchten Tiere eine komplette Regression metastasierter Mammakarzinome induzieren. Durch die kombinierte Infektion mit dem vesikulären Stomatitisvirus (VSV) wurde das Gesamtüberleben gesteigert und die Tumormasse weiter verringert (125).

Während H-1PV auf die Anzahl an T_H-Zellen keine Auswirkung hatte, führte die Infektion bei beiden molekularen Subtypen tendenziell zu einer leichten Aktivierung von T_H-Zellen. Der Anstieg war bei der Zelllinie LS1034 (CMS2) am stärksten ausgeprägt. Damit stützen die gewonnenen Ergebnisse die Erkenntnisse von Moralès et al. Auch hier wurde gezeigt, dass H-1PV die Aktivierung von CD4⁺ T-Helferzellen induzierte - gemessen an den Aktivierungsmarkern CD69 und CD30 sowie an der Freisetzung von Typ1- und Typ2-Zytokinen (IL-2, IFN- γ und IL-4) (120, 147). In verschiedenen Tiermodellen führte die Behandlung mit Parvoviren zu ausgeprägten Veränderungen im Tumor- und Lymphgewebe, die auf die Generierung einer zellulären Immunantwort schließen ließ. Die Induktion der durch T_H1-Zellen vermittelten Immunreaktion offenbarte sich durch erhöhte Serumlevel der Zytokine IFN- γ und TNF α , die Infiltration von Tumoren mit aktivierten T_H-Zellen und CD8⁺ T-Zellen sowie die Proliferation von T_H-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in lymphatischem Gewebe (89).

Eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der tumorinduzierten Immuntoleranz spielen suppressive Immunzellen wie MDSCs und T_{regs}. Eine verringerte Anzahl dieser Zellen in der Tumormikroumgebung geht mit einer verbesserten Antitumor-Immunantwort einher, sodass im Rahmen der Kokulturversuche der direkte Effekt von H-1PV sowohl auf MDSCs als auch auf T_{regs} untersucht wurde. Es stellte sich heraus, dass die Infektion mit H-1PV keine Auswirkung auf die Anzahl an MDSCs hatte. Bei den NCI-H508-Tumorzellen des CMS2-Subtyps fand sich im Vergleich zu den anderen Tumorzelllinien ein höherer Anteil an M-MDSCs. In dieser Hinsicht stehen die Ergebnisse im Widerspruch zu denen einer neueren Arbeit zum Adenokarzinom des Pankreas, in denen das onkolytische Adenovirus OBP-702 die Anreicherung von MDSCs inhibierte (148). Andere Arbeiten, die den direkten Effekt von H-1PV auf MDSCs untersuchen, liegen nach meinem Wissen bislang nicht vor. Hier sind sicherlich weitere Studien erforderlich - vor allem, da die tumorinduzierte Immunsuppression bei den untersuchten kolorektalen Tumorzellen, wie zuvor dargestellt, über den myeloiden Weg zu laufen scheint. Betrachtet man den Einfluss von H-1PV auf T_{regs} lässt sich sagen, dass die Infektion bei NCI-H508- (CMS2) und HT115-Tumorzellen (CMS3) tendenziell zu einer verringerten Aktivierung von T_{regs} führte. Damit decken sich die Ergebnisse mit Erkenntnissen aus klinischen Studien zum Glioblastom, in denen gezeigt wurde, dass H-1PV die Aktivität von T_{regs} supprimiert. Gleiches konnte auch für Melanomzellen dargestellt werden (85). Moralès et al. haben demonstriert, dass die Infektion mit H-1PV die suppressive Aktivität von T_{regs} inhibiert (147). Allerdings sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich der Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe um Moralès et al. grundlegend von den hier durchgeführten Kokulturversuchen unterschied, da die Arbeitsgruppe T_{regs} direkt mit H-1PV infizierte. Damit sind die Ergebnisse nicht übertragbar. Bei LS1034-Tumorzellen (CMS2) resultierte die Infektion mit H-1PV (MOI 5) in einer statistisch signifikanten Aktivierung von T_{regs}, was einer Aufrechterhaltung bzw. Förderung des immunsuppressiven Tumormikromilieus gleichkommt und sicherlich nicht gewünscht ist. Auch hier sind ohne Frage weitere Untersuchungen erforderlich, um die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse einordnen zu können.

6.3.2 Produktion von Zytokinen

Die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen ist zu einem großen Anteil auf die Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF α zurückzuführen. Auch die Zytotoxizität von NK-Zellen basiert unter anderem auf der Freisetzung von IFN- γ und TNF α . Die Zytokine induzieren die Apoptose von Tumorzellen und initiieren eine effektive und tumorspezifische Immunantwort. CD4⁺ T-Helferzellen tragen ebenfalls zur T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunantwort bei, indem sie durch die Sekretion von IFN- γ das Priming von CD8⁺ T-Zellen stimulieren. IFN- γ fungiert indes selbst als starkes Immunstimulans. Es supprimiert die Angiogenese in Tumorzellen, induziert die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf DCs, aktiviert und erhöht die phagozytotische Aktivität von Makrophagen und fördert die T_H1-vermittelte Immunantwort (120). Auf der anderen Seite induziert IFN- γ die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen, was der Immunevasion von Tumoren dient (149). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass H-1PV bei den kolorektalen Tumorzellen des CMS2- und CMS3-Subtyps eine vermehrte Sezernierung von IFN- γ induziert. Für die LS1034- und HT115-

Tumorzellen konnte darüber hinaus eine erhöhte Freisetzung von IL-2 dargestellt werden. Die Ergebnisse stützen die Erkenntnisse aus vorherigen Studien. Auch Moralès et al. konnten zeigen, dass H-1PV eine gesteigerte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- γ bedingt. Damit ist indirekt bewiesen, dass H-1PV die T_H1-vermittelte Immunantwort induziert, welche für die Antitumor-Immunantwort von besonderer Bedeutung ist (85, 147). Bei Pankreaskarzinomzellen resultierte die Infektion mit H-1PV in einer gesteigerten Produktion von IFN- γ (150). Bei Melanomzellen induzierte H-1PV eine erhöhte Freisetzung von IL-2 (7).

Auch wenn proinflammatorischen Zytokinen eine bedeutende Aufgabe in der Immunüberwachung von Tumoren zukommt, eliminieren sowohl NK-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen Tumorzellen in erster Linie durch die Freisetzung zytotoxischer Granula. Diese enthalten neben Proteasen (Granzyme, Cathepsine und Granuloysin) auch Perforine, also porenbildende Proteine, die ein Eindringen der Granzyme in die Zielzelle erleichtern (135). In der vorliegenden Arbeit resultierte die Infektion mit H-1PV bei NCI-H508 (CMS2) und HT115 (CMS3) in einer gesteigerten Produktion von GranB. Das scheint zunächst von Vorteil zu sein, denn die Protease gilt als Indikator für die Aktivierung von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen (151). Jedoch haben mehrere Studien gezeigt, dass GranB auch von T_{regs} exprimiert wird (136, 152). In diesem Kontext vermittelt es die Eliminierung von Effektor-T-Zellen, womit die antitumorale Immunantwort abgeschwächt werden kann (136). Damit könnte es sogar von Vorteil sein, dass H-1PV bei der Zelllinie LS1034 (CMS2) keinen Effekt auf die Freisetzung von GranB hatte.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass onkolytische Viren die Produktion von TGF β inhibieren. Als Beispiel ist die Arbeit von Goepfert et al. anzuführen, in der eine reduzierte Sekretion von TGF β durch H-1PV-infizierte Melanomzellen beobachtet wurde. Auf die Freisetzung des ebenfalls immunsuppressiv wirkenden Zytokins IL-10 hatte H-1PV hingegen keinen Einfluss (85). Der gleiche Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Während H-1PV sowohl bei CMS2 als auch bei CMS3 tendenziell zu einer verminderten Sezernierung von TGF β führte, zeigte sich keine Auswirkung auf die Produktion von IL-10. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die durch onkolytische Viren induzierte Reduktion von TGF β in der Tumormikroumgebung mit einer Verringerung der Anzahl an T_{regs} und einer generellen Steigerung der Antitumor-Immunantwort assoziiert ist. Diese Beobachtungen haben dazu geführt, dass auch einige Kombinationsstudien zu TGF β -Inhibitoren und onkolytischen Viren durchgeführt wurden. Während viele Studien antitumorale Effekte fanden, standen einige Arbeiten hierzu im Widerspruch. So resultierte die TGF β -Inhibition in einem Mausmodell zum Glioblastom neben reduzierten Virustitern in einem verringerten Überleben nach der Behandlung mit einem Herpes simplex Virus. Damit bleibt die Rolle von TGF β in der onkolytischen Virotherapie kontrovers (133).

Auch die Funktion von IL-6 ist umstritten. Wenngleich dieses Zytokin im Allgemeinen als prokarzinogener Faktor angesehen wird, kann seine lokale Anwesenheit in der Krebsimmuntherapie unter bestimmten Umständen von Vorteil sein (133). In der vorliegenden Arbeit wurde in den Überständen aller H-1PV-infizierter kolorektaler Tumorzellen ein erhöhtes Level an IL-6 gemessen. Das Ergebnis deckt sich mit Erkenntnissen aus bereits durchgeführten klinischen Studien bei anderen Tumorentitäten. Auch die Infektion von Melanom-, Mamma- und Pankreaskarzinomzellen mit onkolytischen Viren resultierte in einer gesteigerten IL-6-Expression (133). In einem Mausmodell zum malignen Melanom wurde demonstriert, dass IL-6 die durch T_{regs} induzierte Immunsuppression blockiert und zudem für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen von Nöten ist (128). Außerdem konnte in zahlreichen Experimenten mit Zytokin-induzierten NK-Zellen ein positiver Effekt von hohen IL-6-Leveln auf die Antitumor-Immunantwort verzeichnet werden (100). Zusammenfassend induzieren onkolytische Viren eine gesteigerte Produktion von IL-6, welche die Wirksamkeit der Behandlung zumeist nicht beeinträchtigt und bestenfalls die Kontrolle des Tumorwachstums verbessert (133). Dennoch sind meines Erachtens weitergehende Untersuchungen erforderlich, um die pleiotropen Effekte von IL-6 genauer zu verstehen.

6.4 Diskussion der klinischen Anwendung

H-1PV wurde bereits in zwei klinischen Studien getestet (153). Bei der ersten Studie, ParvOryx01, handelte es sich um eine Phase I/IIa Studie, in die 18 Patientinnen und Patienten mit einem Glioblastom-Rezidiv eingeschlossen wurden. H-1PV wurde entweder intratumoral oder intravenös verabreicht, neun Tage nach der Behandlung wurden die Tumore reseziert. Im Tumorgewebe fanden sich große Immuninfiltrate bestehend aus aktivierten CD8⁺ T-Zellen, mit nur vereinzelt eingestreuten T_{regs}. In einem Teil der Tumorproben registrierte man zudem ein erhöhtes Level proinflammatorischer Zytokine, allen voran IL-2 und IFN- γ (10, 55). Die zweite klinische Studie, ParvOryx02, erfolgte zum metastasierten Pankreaskarzinom und schloss 7 Patientinnen und Patienten ein. Auch hier wurde H-1PV entweder intratumoral oder intravenös injiziert. Bei zwei Patienten war die Behandlung mit einem verbesserten klinischen Outcome im Sinne einer partiellen Remission und einem verlängerten Überleben assoziiert (153, 154). Sowohl bei ParvOryx01 als auch bei ParvOryx02 konnte ein exzellentes Sicherheitsprofil von H-1PV, ohne nennenswerte Nebenwirkungen, demonstriert werden (153).

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint es fraglich, ob die onkolytische Virotherapie mit H-1PV den Therapiedurchbruch beim CMS2- und CMS3-Subtyp des KRK markiert. Wenngleich das onkolytische Virus eine vielversprechende Modulation der Zytokinproduktion induzierte, war die direkte Wirkung auf ausgewählte Immunzellen begrenzt. Sicherlich bedarf es noch einiger Optimierungen, damit Patientinnen und Patienten von einer klinischen Anwendung profitieren können. Es hat den Anschein, als sei ein potenteres onkolytisches Virus unerlässlich (153). Bei H-1PV handelt es sich um natürliches onkolytisches Virus. Im Allgemeinen weisen diese eine geringe Steuerbarkeit auf, sind nur begrenzt zur Abtötung von Tumorzellen befähigt und werden mit Leichtigkeit durch das humane Immunsystem eliminiert (119). Eine Möglichkeit zur Optimierung der onkolytischen und immunmodulierenden Eigenschaften onkolytischer Viren stellen genetische Modifikationen dar (119, 153). GM-CSF, ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Proliferation von Granulozyten und Makrophagen stimuliert, wurde bereits in den Vektor einiger onkolytischer Viren (z.B. T-VEC) integriert. Folge der genetischen Veränderung ist eine verbesserte Antigenpräsentation von DCs und damit einhergehend eine gesteigerte Rekrutierung von NK-Zellen und T-Zellen (155). Auch proinflammatorische Zytokine bieten eine Möglichkeit zur Modifikation onkolytischer Viren. So wurde bereits ein Adenovirus generiert, das für eine Variante des humanen IL-2 Proteins (vIL-2) codiert. vIL-2 aktiviert selektiv CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen, ohne T_{regs} zu beeinflussen. Adenoviren, die TNF α und IL-2 exprimieren, führten im anti-PD-1-resistenten Melanommodell zu einer verstärkten Infiltration von CD8⁺ T-Zellen, während der Anteil an M2 Makrophagen und MDSCs abnahm. Im Mausmodell zum Lungenkarzinom konnte das IFN- γ codierende onkolytische Virus VSV durch eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ein verbessertes Therapieansprechen induzieren (155). In einem anderen Mausmodell zum Lungenkarzinom wurde durch die Kombination von IL-10 mit dem onkolytischen Adenovirus Ad-hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) eine starke Infiltration des Tumorgewebes mit CD8⁺ T-Zellen und eine gesteigerte Sekretion von IFN- γ erreicht (142). In einem präklinischen Tiermodell zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas bedingte die kombinierte intraperitoneale Verabreichung von IFN- γ und H-1PV eine gesteigerte Immunantwort und ein verlängertes Überleben (156). Jedoch soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass eine Überexpression an Zytokinen auch schädlich sein kann. So wurden bei hohen Dosen von rekombinantem IL-2 unter anderem schwerwiegende hepatotoxische Nebenwirkungen verzeichnet (120). Auch für H-1PV wurden bereits Strategien zur Optimierung der antitumoralen Eigenschaften entwickelt. Zum Beispiel wurde das Viruskapsid durch das Einfügen des Peptids RGD-4c genetisch modifiziert, mit dem Ziel, die Penetration von H-1PV zu verbessern. Andere Ansätze zielen auf eine Optimierung der Virusreplikation ab (5).

Eine weitere Option, die Limitationen der onkolytischen Virotherapie zu umgehen, stellen Kombinationstherapien dar. Onkolytische Viren können mit Radio-, Chemo- und Immuntherapien sowie mit zielgerichteten Therapien kombiniert werden (153). Hierzu wurden

bereits zahlreiche präklinische Untersuchungen, aber auch einige klinische Studien durchgeführt. In präklinischen Arbeiten mit Pankreaskarzinomzellen erzielte H-1PV einen teils synergistischen Effekt mit dem Zytostatikum Gemcitabin, wobei die Wirkung des onkolytischen Virus auch in Gemcitabin-resistenten Kulturen erhalten war (156). Für Melanomzellen wurde gezeigt, dass H-1PV in Kombination mit Ipilimumab und Nivolumab die Freisetzung von TGF β und IL-10 weiter herabsetzte. Auch konnte H-1PV durch die kombinierte Gabe mit den Checkpoint-Inhibitoren eine stärkere Aktivierung CD8⁺ T-Zellen induzieren (85). Für das KRK wurden Untersuchungen zur Kombination von H-1PV mit Tremelimumab, einem gegen CTLA-4 gerichteten Antikörper, durchgeführt. Die Behandlung H-1PV-infizierter kolorektaler Tumorzellen mit Tremelimumab resultierte in einer erhöhten Freisetzung von IFN- γ (100, 156). Auch in klinischen Studien zur Kombination von onkolytischen Viren mit Chemo- oder Immuntherapien konnten außergewöhnliche therapeutische Effekte erzielt werden. Dabei übertraf die Wirksamkeit der Kombinationstherapie die der alleinigen Chemo- oder Immuntherapie. Durch die kombinierte Behandlung mit onkolytischen Viren und Checkpoint-Inhibitoren wurde eine große Anzahl an Immunzellen induziert, wodurch die Antitumor-Aktivität der Immuntherapie gesteigert und das Überleben verlängert werden konnte (119). H-1PV wurde beim Glioblastom in Kombination mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab und dem PD-1-Inhibitor Nivolumab getestet. Verzeichnet wurden partielle bzw. zum Teil auch vollständige Tumorregressionen. Dabei war die Ansprechrate des Tumors bei der Kombinationstherapie signifikant höher als bei der Monotherapie mit Bevacizumab und Nivolumab (153).

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der H-1PV-induzierten Onkolyse und Immunzellaktivierung des CMS2- und CMS3-Subtyps des KRK charakterisiert werden. Die Analyse der Daten zeigt, dass die virusvermittelte Zytotoxizität und Immunmodulation sowohl zwischen den einzelnen Tumorzelllinien als auch zwischen den molekularen Subtypen variiert. Zurückzuführen ist dieser Umstand vor allem auf das hohe Maß an Heterogenität auch innerhalb der CMS-Subgruppen. Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich zwei dem CMS2- sowie zwei dem CMS3-Subtyp zugeordnete Zelllinien untersucht wurden. Da jeder Subgruppe noch viele weitere Tumorzelllinien angehören, ist die Aussagekraft limitiert. Alles in allem zeigte sich ein vielversprechendes Potenzial von H-1PV, das sicherlich weiter ausbaufähig ist. Ohne Zweifel ist es von Vorteil, eine Einteilung des KRK auf molekularbiologischer Basis vorzunehmen. Insbesondere der Identifikation spezifischer Mutationen ist ein hoher Stellenwert beizumessen. Aktuell hat die CMS-Klassifikation noch keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung beim KRK (157). Weitergehende Untersuchungen sind von Nöten, um das onkolytische und immunaktivierende Potenzial von H-1PV zu optimieren und das onkolytische Virus als Therapieoption beim KRK zu etablieren. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei mehr als 50 % der Karzinome um CMS2- und CMS3-Tumore handelt und diese in der Regel schlecht auf Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren ansprechen, könnten viele Patientinnen und Patienten von dieser neuen Therapieoption profitieren.

7 Zusammenfassung

Das KRK kann im frühen Stadium durch eine Operation kurativ behandelt werden. Bei einer stattgehabten Metastasierung ist, je nach Lokalisation, Stadium und Molekularbiologie des Tumors, eine neoadjuvante Radiotherapie und/oder eine adjuvante Chemotherapie, gegebenenfalls in Kombination mit einer Antikörpertherapie, indiziert (2). Der Effekt dieser etablierten Therapien ist limitiert und mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Um die Therapieresistenz von Tumoren zu durchbrechen, müssen neue Strategien entwickelt werden. Eine Möglichkeit stellen onkolytische Viren dar. In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche präklinische und klinische Studien zu verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt, in denen das Potenzial der onkolytischen Virotherapie dargestellt werden konnte (119). Neben der gezielten Infektion und Lyse von Tumorzellen stimulieren viele onkolytische Viren die Antitumor-Immunantwort. Als vielversprechender Kandidat gilt H-1PV. Seine onkolytische Wirksamkeit wurde unter anderem bei Melanom-, Pankreas- und Kolonkarzinomzellen gezeigt (5, 85, 120). Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten das immunstimulierende Potenzial von H-1PV belegen. Beispielhaft sei an dieser Stelle die experimentelle Arbeit von Moehler et al. zum malignen Melanom genannt (7).

In der vorliegenden Dissertation wurde der Effekt von H-1PV auf die kolorektalen Tumorzellen des CMS2- (LS1034 und NCI-H508) und CMS3-Subtyps (CL-34 und HT115) analysiert. Im Mittelpunkt der Arbeit stand dabei die Frage, ob die virusvermittelte onkolytische und immunmodulierende Wirkung zwischen den CMS-Subgruppen bzw. innerhalb dieser variierte.

Im ersten Teil der Arbeit konnte das onkolytische Potenzial von H-1PV demonstriert werden. Die Infektion resultierte bei allen vier Zelllinien in einer Reduktion der Zellviabilität, wobei ein vollständiger Viabilitätsverlust weder beim CMS2- noch beim CMS3-Subtyp induziert werden konnte. Im direkten Vergleich war der onkolytische Effekt von H-1PV bei CMS2 stärker ausgeprägt als bei CMS3. Am sensitivsten reagierte die Zelllinie LS1034, am wenigsten sensitiv die Zelllinie HT115.

In der Kokultur mit PBMCs induzierte die Infektion mit H-1PV bei der Zelllinie HT115 eine statistisch signifikante Aktivierung CD8⁺ T-Zellen. Bei beiden molekularen Subtypen führte das onkolytische Virus tendenziell eine Aktivierung von T_H-Zellen herbei. Insgesamt zeigte sich der direkte immunstimulierende Effekt von H-1PV bei beiden CMS-Subtypen limitiert.

Vielfersprechend waren die Ergebnisse der Zytokinanalysen. Im Vergleich zu den Überständen der Kokulturversuche mit nicht infizierten Tumorzellen, konnte in den Überständen mit H-1PV infizierten Tumorzellen bei allen analysierten Zelllinien (LS1034, NCI-H508 und HT115) eine erhöhte Konzentration von IFN- γ und IL-6 sowie ein erniedrigtes Level an TGF β detektiert werden. Bei LS1034 wurde ein erhöhter Wert von IL-2 gemessen, bei NCI-H508 ein gesteigertes Level an GranB. Bei HT115 zeigte sich sowohl die Konzentration von IL-2 als auch von GranB erhöht.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Anwendung von H-1PV sowohl beim CMS2- als auch beim CMS3-Subtyp des KRK denkbar ist. In den durchgeführten Versuchen wies das Virus jedoch bei beiden molekularen Subgruppen einen begrenzten onkolytischen und immunstimulierenden Effekt auf, sodass die Therapie mit H-1PV zum aktuellen Zeitpunkt keine alternative Behandlungsstrategie darstellt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich und werden mit großem Interesse erwartet, um die Wirkung von H-1PV zu optimieren und eine klinische Anwendung, von der Patientinnen und Patienten mit CMS2- und CMS3-Tumoren profitieren, zu ermöglichen.

8 Literaturverzeichnis

1. Statista. Anzahl der Todesfälle nach den häufigsten Todesursachen in Deutschland in den Jahren 2019 bis 2021 [Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/158441/umfrage/anzahl-der-todesfaelle-nach-todesursachen/>].
2. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. 2019.
3. Kelly E, Russell SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. 2007;15(4):651-9.
4. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, et al. The family Parvoviridae. *Arch Virol*. 2014;159(5):1239-47.
5. Bretscher C, Marchini A. H-1 Parvovirus as a Cancer-Killing Agent: Past, Present, and Future. *Viruses*. 2019;11(6).
6. Marelli G, Howells A, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:866.
7. Moehler M, Goepfert K, Heinrich B, Breitbach CJ, Delic M, Galle PR, et al. Oncolytic virotherapy as emerging immunotherapeutic modality: potential of parvovirus h-1. *Front Oncol*. 2014;4:92.
8. Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, et al. 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.
9. Moehler MH, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, Rommelaere J, et al. 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.
10. Geletneky K, Hajda J, Angelova AL, Leuchs B, Capper D, Bartsch AJ, et al. 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.
11. Ros J, Baraibar I, Martini G, Salvà F, Saoudi N, Cuadra-Urteaga JL, et al. The Evolving Role of Consensus Molecular Subtypes: a Step Beyond Inpatient Selection for Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2021;22(12):113.
12. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep*. 2019;21(2):5.
13. Siegmund-Schultze N. Kolorektale Karzinome: Die Lage des Primarius zählt. *Deutsches Ärzteblatt*. 2017(Perspektiven der Onkologie 1/2017).
14. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015;21(11):1350-6.
15. Krebsregisterdaten Zf. Krebs in Deutschland - Darm 2020 [
16. Krebsregisterdaten Zf. Krebs in Deutschland - Krebs gesamt 2020 [
17. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *Jama*. 2021;325(7):669-85.
18. Krebsregisterdaten Zf. Krebs in Deutschland für 2017/2018 - Darm [PDF]. 2021 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c18_c20_darm.pdf?blob=publicationFile].
19. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*. 2019;11(1).
20. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas*. 2015;80(3):258-64.
21. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(12):713-32.
22. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-60.
23. Martini G, Dienstmann R, Ros J, Baraibar I, Cuadra-Urteaga JL, Salva F, et al. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920936089.

24. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
25. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72.
26. Eide PW, Moosavi SH, Eilertsen IA, Brunsell TH, Langerud J, Berg KCG, et al. Metastatic heterogeneity of the consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *NPJ Genom Med*. 2021;6(1):59.
27. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018;89(9-s):97-101.
28. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7.
29. Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci*. 2021;17(14):3837-49.
30. Saeed O, Lopez-Beltran A, Fisher KW, Scarpelli M, Montironi R, Cimadamore A, et al. RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications. *J Clin Pathol*. 2019;72(2):135-9.
31. Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer*. 2022;21(1):144.
32. Madunić K, Zhang T, Mayboroda OA, Holst S, Stavenhagen K, Jin C, et al. Colorectal cancer cell lines show striking diversity of their O-glycome reflecting the cellular differentiation phenotype. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(1):337-50.
33. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer*. 2017;16(1):116.
34. Randon G, Yaeger R, Hechtman JF, Manca P, Fucà G, Walch H, et al. EGFR Amplification in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(11):1561-9.
35. Shivji S, Conner JR, Barresi V, Kirsch R. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*. 2020;77(3):351-68.
36. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2016;20(3):648-55.
37. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:369.
38. Ponnatapura J, Lalwani N. Imaging of Colorectal Cancer: Screening, Staging, and Surveillance. *Semin Roentgenol*. 2021;56(2):128-39.
39. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(6):1454-5.
40. Tamas K, Walenkamp AM, de Vries EG, van Vugt MA, Beets-Tan RG, van Etten B, et al. Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(8):671-9.
41. Bang YH, Hong YS, Lee JS, Lee KW, Han HS, Kim SY, et al. Effectiveness of Combining Bevacizumab With First-Line Chemotherapy Regimens for Metastatic Colorectal Cancer in Real-World Practice. *Clin Colorectal Cancer*. 2021;20(2):101-12.e6.
42. Papachristos A, Kemos P, Kalofonos H, Sivolapenko G. Correlation Between Bevacizumab Exposure and Survival in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2020;25(10):853-8.
43. Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer J*. 2018;24(4):165-70.
44. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol*. 2020;11:1624.
45. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jäger D, Hara H, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol*. 2020;38(1):11-9.

46. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(6):361-75.
47. Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4(2):101-17.
48. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst*. 1948;9(3):229-46.
49. Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(5):298-300.
50. Liang M. Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(2):171-6.
51. Bommareddy PK, Patel A, Hossain S, Kaufman HL. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2017;18(1):1-15.
52. Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(3):718-30.
53. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger AM, Hughes J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol*. 2019;100(3):367-8.
54. Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, et al. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(2-3):185-95.
55. Marchini A, Bonifati S, Scott EM, Angelova AL, Rommelaere J. Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications. *Virol J*. 2015;12:6.
56. Bär S, Rommelaere J, Nüesch JP. PKC η /Rdx-driven phosphorylation of PDK1: a novel mechanism promoting cancer cell survival and permissiveness for parvovirus-induced lysis. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004703.
57. Hristov G, Krämer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, et al. Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol*. 2010;84(12):5909-22.
58. Sieben M, Schäfer P, Dinsart C, Galle PR, Moehler M. Activation of the human immune system via toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1. *Int J Cancer*. 2013;132(11):2548-56.
59. Geletneky K, Herrero YCM, Rommelaere J, Schlehofer JR. Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: a brief review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005;52(7-8):327-30.
60. Nüesch JP, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J. Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2012;18(13):3516-23.
61. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, et al. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol*. 2007;81(8):4186-98.
62. Angelova AL, Barf M, Geletneky K, Unterberg A, Rommelaere J. Immunotherapeutic Potential of Oncolytic H-1 Parvovirus: Hints of Glioblastoma Microenvironment Conversion towards Immunogenicity. *Viruses*. 2017;9(12).
63. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
64. Sankawa Y. [The immune system - how does anti-tumor immunity arise?]. *Oncol Res Treat*. 2014;37 Suppl 4:2-5.
65. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Ausgabe ed: Springer Spektrum; 2018.
66. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science*. 2004;306(5701):1517-9.
67. Rink L, Kruse A, Haase H. *Immunologie für Einsteiger: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*; 2012.
68. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):412.

69. Lv B, Wang Y, Ma D, Cheng W, Liu J, Yong T, et al. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:844142.
70. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al. Two FOXP3(+)/CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22(6):679-84.
71. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:1-7.
72. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010;127(4):759-67.
73. Chen BJ, Zhao JW, Zhang DH, Zheng AH, Wu GQ. Immunotherapy of Cancer by Targeting Regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2022;104:108469.
74. Burks J, Olkhanud PB, Berzofsky JA. The role of NKT cells in gastrointestinal cancers. *Oncoimmunology*. 2022;11(1):2009666.
75. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.
76. Gardner A, de Mingo Pulido Á, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11:924.
77. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*. 2016;37(12):855-65.
78. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbutto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:3176.
79. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433.
80. Loppnow H. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*. 2001;42(1):13-27.
81. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. *Exp Suppl*. 2022;113:1-57.
82. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
83. Evans C, Dalglish AG, Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24(8):1163-77.
84. Sieminska I, Baran J. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:1526.
85. 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. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:425.
86. Qiu Y, Ke S, Chen J, Qin Z, Zhang W, Yuan Y, et al. FOXP3+ regulatory T cells and the immune escape in solid tumours. *Front Immunol*. 2022;13:982986.
87. EMA. Fachinformation YERVOY [cited 2023 26.11.2023]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yervoy-epar-product-information_de.pdf.
88. Roelands J, Kuppen PJK, Vermeulen L, Maccalli C, Decock J, Wang E, et al. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(10).
89. Angelova A, Rommelaere J. Immune System Stimulation by Oncolytic Rodent Protoparvoviruses. *Viruses*. 2019;11(5).
90. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med*. 2020;15(3):1463-91.
91. Merck. Thawing of Frozen Cell Lines 2022 [2022/08/30]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/thawing-of-frozen-cell-lines>.
92. 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.

93. Merck. MTT-Assay Protokoll für Zellviabilität und Proliferation 2022 [2022/08/30]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.
94. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator Immunologie. 4. Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer 2014.
95. Facility FaAC, Mainz UdJG-U. Prinzip der Durchflusszytometrie [updated 2020/02/2022/08/31]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html>.
96. Scientific TF. eBioscience Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set 2022 [2022/08/31]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-8824-00>.
97. Technologies L. Sandwich ELISA Protocol [2021/05/07]. Available from: <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>.
98. Merck. 3,3',5,5'-3,3,5,5-Tetramethylbenzidin (TMB) Flüssigsubstratsystem für ELISA [2022/09/01]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/t0440>.
99. Lombardelli L, Logiodice F, Kullolli O, Piccinni MP. Evaluation of Secreted Cytokines by Multiplex Bead-Based Assay (X MAP Technology, Luminex). *Methods Mol Biol.* 2021;2285:121-30.
100. 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.
101. ATCC. LS1034 2023 [Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-2158>].
102. ATCC. NCI-H508 2023 [Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-253>].
103. Maitra R, Augustine T, Dayan Y, Chandy C, Coffey M, Goel S. Toll like receptor 3 as an immunotherapeutic target for KRAS mutated colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(21):35138-53.
104. Augustine T, John P, Friedman T, Jiffry J, Guzik H, Mannan R, et al. Potentiating effect of reovirus on immune checkpoint inhibition in microsatellite stable colorectal cancer. *Front Oncol.* 2022;12:1018767.
105. Tamura S, Tazawa H, Hori N, Li Y, Yamada M, Kikuchi S, et al. p53-armed oncolytic adenovirus induces autophagy and apoptosis in KRAS and BRAF-mutant colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2023;18(11):e0294491.
106. Mamizadeh Z, Kalani MR, Parsania M, Soltan Dallal MM, Moradi A. NEBL and AKT1 maybe new targets to eliminate the colorectal cancer cells resistance to oncolytic effect of vesicular stomatitis virus M-protein. *Mol Ther Oncolytics.* 2021;23:593-601.
107. Khaliq AM, Erdogan C, Kurt Z, Turgut SS, Grunvald MW, Rand T, et al. Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas. *Genome Biol.* 2022;23(1):113.
108. Aldrich S. HT115 2023 [Available from: https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/cb_85061104].
109. DSMZ. CI-34 2023 [Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-520>].
110. Medico E, Russo M, Picco G, Cancelliere C, Valtorta E, Corti G, et al. The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nat Commun.* 2015;6:7002.
111. Taieb J, Lapeyre-Prost A, Laurent Puig P, Zaanani A. Exploring the best treatment options for BRAF-mutant metastatic colon cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(6):434-42.
112. Moehler M, Zeidler M, Schede J, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ, et al. 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.
113. Kana SI, Essani K. Immuno-Oncolytic Viruses: Emerging Options in the Treatment of Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2021;25(3):301-13.
114. Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, et al. Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein. *World J Gastroenterol.* 2008;14(24):3819-28.

115. 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.
116. Malerba M, Daeffler L, Rommelaere J, Iggo RD. Replicating parvoviruses that target colon cancer cells. *J Virol*. 2003;77(12):6683-91.
117. Kulkarni A, Ferreira T, Bretscher C, Grewenig A, El-Andaloussi N, Bonifati S, et al. Oncolytic H-1 parvovirus binds to sialic acid on laminins for cell attachment and entry. *Nat Commun*. 2021;12(1):3834.
118. Ferreira T, Kulkarni A, Bretscher C, Nazarov PV, Hossain JA, Ystaas LAR, et al. Oncolytic H-1 Parvovirus Hijacks Galectin-1 to Enter Cancer Cells. *Viruses*. 2022;14(5).
119. Zhu X, Fan C, Xiong Z, Chen M, Li Z, Tao T, et al. Development and application of oncolytic viruses as the nemesis of tumor cells. *Front Microbiol*. 2023;14:1188526.
120. 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.
121. Li X, Ling A, Kellgren TG, Lundholm M, Löfgren-Burström A, Zingmark C, et al. A Detailed Flow Cytometric Analysis of Immune Activity Profiles in Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
122. Soldevilla B, Carretero-Puche C, Gomez-Lopez G, Al-Shahrour F, Riesco MC, Gil-Calderon B, et al. The correlation between immune subtypes and consensus molecular subtypes in colorectal cancer identifies novel tumour microenvironment profiles, with prognostic and therapeutic implications. *Eur J Cancer*. 2019;123:118-29.
123. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773-9.
124. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. 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.
125. Gebremeskel S, Nelson A, Walker B, Oliphant T, Lobert L, Mahoney D, et al. 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).
126. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, et al. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7322-7.
127. Zheng Z, Wieder T, Mauerer B, Schäfer L, Kesselring R, Braumüller H. T Cells in Colorectal Cancer: Unravelling the Function of Different T Cell Subsets in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14).
128. Weber R, Groth C, Lasser S, Arkhypov I, Petrova V, Altevogt P, et al. IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cell Immunol*. 2021;359:104254.
129. Siemińska I, Węglarczyk K, Walczak M, Czerwińska A, Pach R, Rubinkiewicz M, et al. Mo-MDSCs are pivotal players in colorectal cancer and may be associated with tumor recurrence after surgery. *Transl Oncol*. 2022;17:101346.
130. Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, Wielandt AM, Hurtado C, Alvarez K, et al. Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. *Front Immunol*. 2021;12:612826.
131. Braumüller H, Mauerer B, Andris J, Berlin C, Wieder T, Kesselring R. The Cytokine Network in Colorectal Cancer: Implications for New Treatment Strategies. *Cells*. 2022;12(1).
132. Chonov DC, Ignatova MMK, Ananiev JR, Gulubova MV. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(14):2391-8.
133. Pol JG, Workenhe ST, Konda P, Gujar S, Kroemer G. Cytokines in oncolytic virotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;56:4-27.
134. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Huerta M, Roselló S, Zuniga S, et al. Detection of postoperative plasma circulating tumour DNA and lack of CDX2 expression as

- markers of recurrence in patients with localised colon cancer. *ESMO Open*. 2020;5(5):e000847.
135. Hay ZLZ, Slansky JE. Granzymes: The Molecular Executors of Immune-Mediated Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
136. Sun B, Liu M, Cui M, Li T. Granzyme B-expressing treg cells are enriched in colorectal cancer and present the potential to eliminate autologous T conventional cells. *Immunol Lett*. 2020;217:7-14.
137. Daemen A, Udyavar AR, Sandmann T, Li C, Bosch LJW, O'Gorman W, et al. Transcriptomic profiling of adjuvant colorectal cancer identifies three key prognostic biological processes and a disease specific role for granzyme B. *PLoS One*. 2021;16(12):e0262198.
138. de Gramont A, Van Cutsem E, Schmoll HJ, Tabernero J, Clarke S, Moore MJ, et al. Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(12):1225-33.
139. Yue T, Chen S, Zhu J, Guo S, Huang Z, Wang P, et al. The aging-related risk signature in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(5):7330-49.
140. Bhat R, Rommelaere J. Emerging role of Natural killer cells in oncolytic virotherapy. *Immunotargets Ther*. 2015;4:65-77.
141. Dempe S, Lavie M, Struyf S, Bhat R, Verbeke H, Paschek S, et al. Antitumoral activity of parvovirus-mediated IL-2 and MCP-3/CCL7 delivery into human pancreatic cancer: implication of leucocyte recruitment. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(11):2113-23.
142. Chen D, Huang L, Zhou H, Zhang Y. Combining IL-10 and Oncolytic Adenovirus Demonstrates Enhanced Antitumor Efficacy Through CD8(+) T Cells. *Front Immunol*. 2021;12:615089.
143. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8509-21.
144. He R, Lao Y, Yu W, Zhang X, Jiang M, Zhu C. Progress in the Application of Immune Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy for Targeting Different Types of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:764618.
145. van den Berg I, Smid M, Coebergh van den Braak RRJ, van de Wiel MA, van Deurzen CHM, de Weerd V, et al. A panel of DNA methylation markers for the classification of consensus molecular subtypes 2 and 3 in patients with colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2021;15(12):3348-62.
146. Nelson A, Lukacs JD, Johnston B. The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20).
147. Moralès O, Richard A, Martin N, Mrizak D, Sénéchal M, Miroux C, et al. Activation of a helper and not regulatory human CD4+ T cell response by oncolytic H-1 parvovirus. *PLoS One*. 2012;7(2):e32197.
148. Kajiwara Y, Tazawa H, Yamada M, Kanaya N, Fushimi T, Kikuchi S, et al. Oncolytic virus-mediated reducing of myeloid-derived suppressor cells enhances the efficacy of PD-L1 blockade in gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(5):1285-300.
149. Knopf P, Stowbur D, Hoffmann SHL, Hermann N, Maurer A, Bucher V, et al. Acidosis-mediated increase in IFN- γ -induced PD-L1 expression on cancer cells as an immune escape mechanism in solid tumors. *Mol Cancer*. 2023;22(1):207.
150. 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.
151. Parakrama R, Fogel E, Chandy C, Augustine T, Coffey M, Tesfa L, et al. Immune characterization of metastatic colorectal cancer patients post reovirus administration. *BMC Cancer*. 2020;20(1):569.
152. Salti SM, Hammelev EM, Grewal JL, Reddy ST, Zemple SJ, Grossman WJ, et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2011;187(12):6301-9.
153. Nettelbeck DM, Leber MF, Altomonte J, Angelova A, Beil J, Berchtold S, et al. Virotherapy in Germany-Recent Activities in Virus Engineering, Preclinical Development, and Clinical Studies. *Viruses*. 2021;13(8).
154. Hajda J, Lehmann M, Krebs O, Kieser M, Geletneky K, Jäger D, et al. A non-controlled, single arm, open label, phase II study of intravenous and intratumoral administration of

ParvOryx in patients with metastatic, inoperable pancreatic cancer: ParvOryx02 protocol. *BMC Cancer*. 2017;17(1):576.

155. Lin D, Shen Y, Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):156.

156. 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).

157. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KKR-0306) trial. *Ann Oncol*. 2019;30(11):1796-803

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf vielfältige Weise bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

In erster Linie danke ich XXX für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank auch an XXX für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt XXX. Sowohl für die geduldige Einführung und Betreuung im Labor als auch für die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit, die differenzierten Anmerkungen und die stets motivierenden Worte möchte ich mich von Herzen bedanken.

Auch XXX danke ich für die regelmäßige Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Bei XXX möchte ich mich für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, vor allem während der Schreibphase, bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz für die Bereitstellung der PBMCs sowie dem DKFZ Heidelberg für die Bereitstellung des Parvovirus H-1.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mir während des gesamten Studiums den Rücken stärkten und ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Laura Francesca Kienzler

Geburtsdatum und -ort 23.06.1995 in Karlsruhe

Berufserfahrung

seit 10/2022 Assistenzärztin Augenheilkunde, ViDia Kliniken Karlsruhe

11/2015 – 02/2016 Rettungsassistentin, Deutsches Rotes Kreuz Karlsruhe

Promotion

seit 2018 I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz

Bildungsweg

Praktisches Jahr

05/2021 – 09/2021 1. Tertial: Chirurgie, Evangelisches Stift St. Martin, Koblenz

09/2021 – 12/2021 2. Tertial: Innere Medizin, ViDia Kliniken Karlsruhe

12/2021 – 04/2021 3. Tertial: Augenheilkunde, ViDia Kliniken Karlsruhe

Famulaturen

09/2018 – 10/2018 Neurologie, SRH-Klinikum Karlsbad

09/2019 – 10/2019 Innere Medizin, Gemeinschaftspraxis Karlsruhe-Durlach

03/2020 Augenheilkunde, Katharinenhospital Stuttgart

08/2020 – 09/2020 Radiologie, Universitätsmedizin Mainz

04/2016 – 05/2022

Studium der Humanmedizin

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

03/2018 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2021 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2022 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2013 – 10/2015

Berufsausbildung zur Rettungsassistentin

Deutsches Rotes Kreuz

2013

Hochschulreife

Markgrafen-Gymnasium Karlsruhe