

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Stammzellen als Transportvehikel für multimechanistische  
Varianten von onkolytischem Herpes Simplex Virus in der  
Hirntumorthherapie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Dübgen

aus Gersthofen

Datum der Promotion: 09.12.2016

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt.....   | 3  |
| 1. Einleitung .....   | 5  |
| 2. Methodik .....   | 8  |
| 2.1 Verwendete Zell-Linien .....  | 8  |
| 2.2 Rekombinanter Herpes Simplex Virus und Virusquantifizierung .....                                 | 9  |
| 2.3 In vitro Biolumineszenz-Test.....   | 9  |
| 2.4 Caspase-Aktivierung bei Mischkultur-Studien .....   | 9  |
| 2.5 Western-Blot Analyse und ELISA .....  | 10 |
| 2.6 Überlebensfähigkeit von oHSV-geladenen MSC in vivo.....   | 10 |
| 2.7 In vivo Experimente in intakten GBM-Tumoren .....   | 11 |
| 2.8 Fluoreszenzgestützte Tumorresektion.....  | 11 |
| 2.9 Wirkung von MSC-oHSV in GBM-Tumorresektionsmodellen in vivo.....                                  | 12 |
| 2.10 Persistenz von oHSV-Infektion in GBM-Tumorresektionsmodellen.....                                | 12 |
| 2.11 Survival-Studien nach GBM-Tumorresektion.....  | 12 |
| 2.12 Gewebeverarbeitung und Immunhistochemie .....  | 13 |
| 2.13 Statistische Analyse.....  | 13 |
| 3. Ergebnisse .....   | 13 |
| 3.1 Entwicklung fluoreszenzgestützter Tumorresektionsverfahren.....                                   | 13 |
| 3.2 Postoperative Validierung fluoreszenzgestützter Tumorresektionsverfahren.....                     | 14 |
| 3.3 Darstellung der Tumorrezidivbildung nach Resektion .....  | 14 |
| 3.4 Wachstumsdynamik von resezierten und nicht-resezierten Tumoren .....                              | 18 |
| 3.5 MSC als zelluläre Transportvehikel für oHSV .....   | 18 |
| 3.6 Dynamik der oHSV-Infektion und -Onkolyse in vivo .....  | 25 |
| 3.7 MSC-vermittelter Antransport und Freisetzung von oHSV in einem GBM-<br>Tumorresektionsmodell..... | 27 |
| 3.8 MSC-vermittelter Antransport und Freisetzung einer aufgerüsteten oHSV-Variante... 30              |    |
| 4. Diskussion.....  | 37 |
| 4.1 GBM-Tumorresektionsmodell als translationaler Forschungsansatz.....                               | 37 |
| 4.2 Möglichkeiten durch Multimodale Bildgebungsverfahren.....   | 38 |
| 4.3 MSC als zelluläre Transportvehikel .....  | 39 |
| 4.4 Intracavitäre Lokalthherapieverfahren mittels MSC-oHSV .....                                      | 39 |
| 4.5 Therapie resistenter GBM-Tumoren .....  | 40 |
| 4.6 Limitationen der Studie und zukünftige Forschungsziele.....                                       | 40 |
| 5. Literaturverzeichnis und Anmerkungen .....   | 42 |
| 5.1 Eidesstattliche Versicherung.....   | 47 |
| 5.2 Lebenslauf.....   | 48 |
| 5.3 Publikationsliste .....   | 49 |

## **Abstrakt**

Die Prognose von Patienten mit Glioblastoma Multiforme (GBM) ist, trotz radikaler Tumorresektion sowie adjuvanter Radiochemotherapie, noch immer äußerst ungünstig. Auf der Suche nach neuen Therapieverfahren hat sich die Behandlung mit onkolytischem Herpes Simplex Virus (oHSV) als besonders vielversprechend erwiesen. Trotz nachgewiesener Sicherheit von oHSV in klinischen Studien zu GBM war die therapeutische Wirksamkeit bislang, aufgrund unzureichender oHSV-Infektion des Tumors nach GBM-Tumorresektion, noch suboptimal.

Um zelluläre Trägervehikel für den effektiven Antransport von oHSV zu entwickeln, wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSC) mit oHSV infiziert (MSC-oHSV) und ihr Schicksal mittels Echtzeit-Bildgebungsverfahren *in vitro* und *in vivo* untersucht. Durch Gebrauch von diagnostischen und sog. „aufgerüsteten“ oHSV-Varianten (oHSV-TRAIL) sowie multimodalen Bildgebungsverfahren wurde die Wirksamkeit von MSC-oHSV, die in biokompatible synthetische Extrazellulärmatrix (sECM) eingebettet wurden, in GBM-Mausmodellen getestet, die, im Gegensatz zu konventionellen Tiermodellen, klinisch relevante Aspekte wie Tumorresektionsszenarien sowie GBM-Multiresistenzen inkorporieren.

MSC-oHSV ermöglichen eine effektive Amplifizierung und Freisetzung von oHSV und führen so über eine charakteristische Onkolysedynamik zu Tumorzelltod von GBM *in vitro* und *in vivo*. sECM-umhüllte MSC-oHSV zeigen außerdem in Tumorresektionsmodellen eine statistisch signifikant erhöhte Wirksamkeit gegen GBM verglichen mit direkter Injektion von konzentrierten, freien oHSV-Partikeln, was sich in einer verlängerten mittleren Überlebensdauer in behandelten Mäusen niederschlägt. Zur Behandlung resistenter GBM-Tumoren wurden MSC mit oHSV-TRAIL beladen, wodurch Apoptose-vermittelter Tumorzelltod ausgelöst sowie eine verlängerte mittlere Überlebensdauer in Mäusen erreicht werden konnte, die sowohl oHSV- als auch TRAIL-resistente GBM-Tumoren trugen.

Humane MSC als Transportvehikel für verschiedene oHSV-Varianten stellen eine Plattform dar, die eine bessere Translation von präklinisch entwickelten onkolytischen Virustherapieverfahren in die klinische Praxis ermöglicht und die Behandlung eines breiten Spektrums an GBM-Tumoren erlaubt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse haben direkte Implikationen für das Design zukünftiger klinischer Studien sowie darüberhinaus für die Behandlung zahlreicher anderer Krebsarten, die ebenfalls einer Behandlung mit oHSV zugänglich sind. **[1]**

## **Abstract**

Despite the aggressive treatment regimen for malignant glioblastoma multiforme (GBM) consisting of neurosurgical tumor resection followed by chemotherapy and radiation therapy, patient's prognosis is still dismal. In search for novel therapeutics, oncolytic Herpes Simplex Virus (oHSV) has shown great promise for GBM therapy. However despite its proven safety in clinical trials for GBMs, its efficacy is suboptimal mainly because of insufficient viral spread after tumor resection.

In order to develop a cellular delivery strategy for oHSV, human mesenchymal stem cells (MSC) were loaded with oHSV (MSC-oHSV), and their fate was explored by real-time imaging in vitro and in vivo. Using novel diagnostic and armed oHSV mutants and real-time multimodality imaging, the efficacy of MSC-oHSV and its proapoptotic variant, oHSV-TRAIL, encapsulated in biocompatible synthetic extracellular matrix (sECM), was tested in different mouse GBM models, which more accurately reflect the current clinical settings of malignant, resistant, and resected tumors.

MSC-oHSVs effectively produce oHSV progeny, which results in killing of GBMs in vitro and in vivo mediated by a dynamic process of oHSV infection and tumor destruction. sECM-encapsulated MSC-oHSVs result in statistically significant increased anti-GBM efficacy compared with direct injection of purified oHSV in a preclinical model of GBM resection, resulting in prolonged median survival in mice. To supersede resistant tumors, MSC loaded with oHSV-TRAIL effectively induce apoptosis-mediated killing and prolonged median survival in mice bearing oHSV- and TRAIL-resistant GBM in vivo.

Human MSC loaded with different oHSV variants provide a platform to translate oncolytic virus therapies to clinics in a broad spectrum of GBMs and also have direct implications for design of future clinical trials as well as treatment of other cancer types. **[1]**

## 1. Einleitung

Glioblastoma multiforme (GBM) stellt den häufigsten primären Hirntumor bei Erwachsenen dar [3-5] und ist aufgrund seines aggressiv-invasiven Wachstums mit äußerst hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Trotz der für gewöhnlich durchgeführten radikalen Tumorresektion mit adjuvanter Strahlen- und/oder Chemotherapie bestehen bis heute keine kurativen Behandlungskonzepte [4]. Ziel des neurochirurgischen Eingriffs ist idealerweise die vollständige Entfernung aller GBM-Tumorzellen bei weitestgehender Schonung des physiologischen Hirnparenchyms, wobei Nutzen der Intervention für den Patienten eng mit dem Ausmaß der chirurgischen Tumorresektion korreliert [5, 6]. Jedoch, obwohl die chirurgische Tumorresektion eine derart zentrale Rolle in der klinischen GBM-Therapie einnimmt, ist diese Verfahrensweise kein Bestandteil der meisten gängigen in vivo Tiermodelle [7, 8]. Vielmehr ist es derzeit gängige Praxis, GBM-Xenotransplantate intrakraniell zu implantieren, woraufhin sich solitäre, solide neoplastische Läsionen bilden, die dann wiederum mittels intrakranieller Injektionen bzw. systemischer Therapeutikagabe behandelt werden [8]. Der in der klinischen Realität ausschlaggebende Eingriff der Tumorresektion und die sich daraus ergebenden therapeutischen Möglichkeiten werden in solchen Modellen vollkommen außer Acht gelassen. **[1-2]**

Da der möglichst vollständigen Tumorresektion eine derart zentrale Rolle in Bezug auf das Patientenüberleben zukommt, werden derzeit Techniken entwickelt und bereits klinisch erprobt, die es mittels intraoperativer bildgebungsgestützter Verfahren ermöglichen sollen, ein Maximum an Tumormasse zu resezieren [9, 10]. In einer Phase III Studie ermöglichte die intraoperative Verwendung von 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA), ein Imaging-Agent, der schnell von GBM-Zellen aufgenommen und zu hochfluoreszierenden Porphyrinen metabolisiert wird, eine wesentlich exaktere Tumorresektion und verdoppelte bei Patienten das sechsmonatige progressionsfreie Überleben [10]. Bildgebende Verfahren spielen aber selbstverständlich auch in der Diagnose und der Therapieüberwachung von Patienten eine ausschlaggebende Rolle [11, 12]. Entsprechend wichtig ist es, solcherlei Verfahren auch in vorklinische Tiermodellstudien zu integrieren um bei Erprobung von neuen Therapiekonzepten die klinischen Verfahrensweisen möglichst realistisch nachzuahmen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben kürzlich mit der Entwicklung solcher Mausmodelle für GBM-Tumorresektion begonnen [13-15] und konnten zeigen, dass postoperatives Tumolvolumen mittels Biolumineszenzbildgebung (BLI) exakt bestimmt werden kann. Die Verwendung von molekularen Bildgebungstechniken zur Steuerung von GBM-Tumorresektionen sowie zur postoperativen Therapieüberwachung in Mäusen wurde aber bisher noch nicht untersucht. **[2]**

Wie zuvor erwähnt, stellt die neurochirurgische Tumorresektion in der GBM-Therapie nach wie vor die wichtigste therapeutische Intervention dar. Die standardmäßig

durchgeführte postoperative Radiochemotherapie, bestehend aus Bestrahlung und Gabe des Chemotherapeutikums Temozolomid, zeigt dagegen lediglich geringen Nutzen [16, 17]. Das Einbringen von Lokaltherapeutika in die Tumorresektionshöhle wurde jedoch bisher kaum untersucht. Die einzige derartige Studie beschäftigte sich mit der Wirkung von Gliadel-Wafern, Polyanhydrid-Mikroplättchen, die Carmustin enthalten und die direkt nach der neurochirurgischen Intervention in die Tumorresektionshöhle eingebracht wurden, was jedoch nur eine begrenzte therapeutische Wirkung zeigte [18]. **[1]**

Auf der Suche nach effektiveren GBM-Therapiemöglichkeiten stieß man bereits vor längerer Zeit auf onkolytische Viren und vorklinische Studien konnten deren erhebliches Potential für die Behandlung von GBM-Patienten bestätigen [19-22]. Bei onkolytischen Viren handelt es sich entweder um natürliche, meist jedoch genetisch modifizierte Viren, die sich selektiv nur in neoplastischen Zellen vermehren und diese letztlich lysieren, während gesunde Körperzellen verschont bleiben [19]. Onkolytischer Herpes Simplex Virus Typ 1 (oHSV) gehört dabei zu den am genauesten untersuchten Virenstämmen und gilt, unter anderem auch wegen seiner inherenten Neurotropizität, derzeit als einer der vielversprechendsten Kandidaten in der GBM-Therapie [19, 23, 24]. So konnte in einer Studie, die onkolytische Adenoviren, ebenfalls ein inzwischen gut untersuchter Virusstamm, mit oHSV verglich, gezeigt werden, dass oHSV in GBM-Zellen eine wesentlich bessere therapeutische Wirksamkeit besitzt [24]. **[1]**

Die allermeisten oHSV-Vektoren, die heutzutage verwendet werden, besitzen eine Deletion des ausschlaggebenden Neurovirulenzgens  $\gamma$ 34.5, was deren Fähigkeit, sich im adulten, physiologischen Zentralnervensystem zu replizieren, deutlich einschränkt. Entsprechend waren HSV-Vektoren mit  $\gamma$ 34.5-Deletion (G207) auch die erste oHSV-Variante, die für klinische Studien zugelassen wurde [21]. Um jedoch die Gefahr der HSV-Wildtypenbildung zu verringern, wurden in oHSV-Varianten der zweiten Generation weitere Gendeletionen eingeführt um die Sicherheit zu erhöhen und gleichzeitig versucht, die durch  $\gamma$ 34.5-Deletion eingeschränkte Replikationsfähigkeit von oHSV in GBM-Zellen zumindest teilweise wieder aufzuheben. oHSV-Vektoren der dritten Generation (G47 $\Delta$ ) verfügen über Deletionen von ICP47, wodurch eine verbesserte Replikationsrate und Onkolysefähigkeit als mit den älteren G207-Varianten erreicht wird [25]. Diese Deletion von ICP47 führt außerdem dazu, dass die eigentlich durch HSV ausgelöste verminderte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen, die es dem Virus normalerweise ermöglicht dem Immunsystem zu entgehen, nun nicht mehr möglich ist, wodurch eine verstärkte, gegen infizierte Tumorzellen gerichtete Immunantwort beobachtet werden konnte.

oHSV-Varianten der vierten Generation sind meist G47 $\Delta$ -Vektoren, bei denen zusätzlich die große Transgenkapazität des HSV-Genoms ausgenutzt wird um mittels Insertion therapeutischer Transgene eine synergistische oder über die reine Onkolyse

hinausreichende therapeutische Wirkung zu erreichen. Diese auch als „aufgerüstete“ oHSV bezeichneten Varianten sorgen beispielsweise für die Expressierung verschiedener Cyto- oder Chemokine wie z.B. IL-12 oder GM-CSF um für die verstärkte Ausbildung von Antitumorimmunität zu sorgen [26]. Ein ebenfalls vielversprechender Ansatz liegt in der Expressierung von Fusogenic Membrane Proteins (FMG), wodurch Tumoren zu ausgedehnten Synzytien zusammengeschlossen werden, was zu rapider Verbreiterung des Virus und deutlich erhöhter onkolytischer Wirkung führt [27]. Shah et al. entwickelten kürzlich eine neue oHSV-Variante, die das Transgen für eine sekretierbare Variante des proapoptotischen Moleküls Tumor Related Apoptosis Inducing Ligand (sTRAIL) trägt und konnten zeigen, dass auf diese Weise auch gering oHSV-sensible GBM-Linien erfolgreich therapiert werden können [28].

Obwohl klinische Studien der Phase-I und -II, die oHSV in der Behandlung von resezierten GBM-Tumoren untersuchten, deren onkolytische Wirkung bestätigen konnten, so waren die klinischen Ansprechraten doch suboptimal [21, 29-32]. Einer der naheliegendsten Gründe dafür könnte sein, dass Blutungen sowie Liquoreinstrom in die Resektionshöhle den Virus nach Injektion unmittelbar wieder auswaschen bzw. neutralisieren konnten sowie generell die vielfältigen postoperativen Entzündungs- und Regenerationsvorgänge im Bereich des Resektionsgebietes eine schnelle Elimination der freien Viruspartikel begünstigten [33, 34]. Um den Antransport von viralen Therapeutika zu verbessern und antivirale Immunreaktionsmechanismen zumindest kurzfristig zu umgehen, haben einige Studien die Möglichkeit untersucht, mit onkolytischen Viren infizierte Zellen als Transportvehikel zu nutzen [35-41]. Mesenchymale Stammzellen (MSC) haben sich in dieser Hinsicht als besonders vielversprechende Kandidaten erwiesen und mehrere Studien konnten bereits die Verwendung von MSC als Trägervehikel für den Antransport von onkolytischen Adenoviren in der GBM-Therapie untersuchen [35, 37, 41, 42]. Die Ergebnisse waren vielversprechend, jedoch insofern limitiert, als dass es den Studien nicht gelang, die therapeutische Wirkung von mit onkolytischen Viren beladenen MSC in einem Kontext zu untersuchen, der sich einfach auf die klinische Praxis der Behandlung von GBM-Patienten übertragen lässt. [1]

Shah et al. haben in vorhergehenden Studien den Gebrauch von synthetischer Extrazellulärmatrix (sECM) untersucht, die auf mit Schwefelatomen modifizierter Hyaluronsäure und einem Disulfidbrückenbildner als Aktivator (Polyethylenglycoldiacrylat) basiert und konnten zeigen, dass sECM-Einbettung von therapeutischen Stammzellen deren Retention und therapeutische Wirkung in der Tumorböhle nach GBM-Resektion erhöht [14]. [1]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei aufeinander aufbauenden Themengebieten: zuerst die Entwicklung und Validierung eines klinisch relevanten

Mausmodells, das wichtige klinische Konzepte wie GBM-Resektion mittels fluoreszenzgestützter Verfahren sowie molekulare Bildgebung zur Überwachung des postoperativen Verlaufs und der GBM-Rezidivbildung beinhaltet. Dabei wird gezeigt, dass die in präklinischen Studien relativ einfach durchzuführende fluoreszenzgesteuerte Resektion von GFP-exprimierenden GBM-Zellen eng mit der simultanen 5-ALA-Bildgebung korreliert. Mittels Magnetresonanz- sowie Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren sowie Immunhistologie wird gezeigt, dass es möglich ist, mittels nicht-invasiver Verfahren das Ausmaß der Tumorsektion genau zu beurteilen. Ebenso kann auf diese Weise die GBM-Rezidivbildung und Wachstumsdynamik exakt verfolgt werden. Letztlich erlaubt dies, die Eigenschaften von resezierten und nicht-resezierten GBM-Modellen zu vergleichen. **[2]**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Möglichkeit nachgegangen, humane MSC als Transportvehikel mit oHSV zu infizieren bzw. zu beladen (MSC-oHSV) und deren Wirkungsdynamik in Echtzeit in vitro sowie in tumorresezierten GBM-Mausmodellen in vivo untersucht. Mithilfe von neuartigen oHSV-Varianten wurde daraufhin die therapeutische Wirkung von oHSV sowie die einer proapoptotischen oHSV-Variante (oHSV-TRAIL) getestet. Dazu wurden MSC als Transportvehikel mit den entsprechenden oHSV-Varianten infiziert, in sECM eingebettet und daraufhin in das eigens entwickelte Tumorsektions-Mausmodell eingebracht, welches die momentan gängige klinische Vorgehensweise in der GBM-Therapie wesentlich genauer als herkömmliche Tiermodelle reflektiert. **[1]**

## **2. Methodik**

### **2.1 Verwendete Zell-Linien**

Humane, aus Knochenmark abgeleitete MSC (zur Verfügung gestellt von David Prockop, Tulane University, New Orleans, LA) wurden, wie zuvor beschrieben, kultiviert [43]. Gli36vIII (Gli36-Zellen mit konstanter, onkogener EGFRvIII-Exprimierung), U87, U251, LN319, U138, U251 und LN229 GBM Zell-Linien wurden von der American Type Culture Collection (Manassas, VA) zur Verfügung gestellt und wie zuvor beschrieben kultiviert [44]. MSC und GBM Zell-Linien (LN229 und Gli36vIII) wurden mit Lentiviren (LV) transduziert, die die Gensequenz für grün fluoreszierendes Protein (GFP) sowie Firefly Luciferase (Fl bzw. FLuc) trugen (LV-GFI bzw. LV-GFP-FLuc). Transduziert wurden Zellen bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von 2 in Medium mit Protaminsulfat (2 bzw. 4 µg/ml). Alle Zellen wurden 36 Stunden nach Transduktion stets mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert um GFP-Exprimierung und damit die erfolgreiche Transduktion zu bestätigen. Packaging der lentiviralen Vektoren wurde erreicht mittels Transfektion von 293T Zellen wie zuvor beschrieben [45]. **[1]**



## **2.2 Rekombinanter Herpes Simplex Virus und Virusquantifizierung**

G47Δ-TRAIL kodiert S-TRAIL cDNA unter Kontrolle des IE4/5 immediate-early HSV-Promotors und G47Δ-Fluc kodiert Firefly-Luciferase cDNA unter Kontrolle des immediate-early CMV-Promotors. Ebenso trägt oHSV-mCherry (oHSV-mCh) mCherry cDNA unter Kontrolle des IE4/5 immediate-early HSV-Promotors. Hergestellt wurden alle diese Viren mittels derselben BAC- und Shuttle-Plasmid-Technik wie zuvor beschrieben [46]. Außerdem exprimieren alle dieser rekombinanten oHSV-Varianten E.coli lacZ unter Kontrolle des endogenen ICP6 Promotors. [1]

Zur Quantifizierung viraler Partikel, die von MSC nach Infektion freigesetzt wurden, wurden MSC mit oHSV-mCh oder oHSV-TRAIL bei MOI=15 in 24-Well Zellkulturplatten (2x10<sup>4</sup> Zellen/Schale) über 4 Stunden infiziert. Nach Infektion wurden die Zellen daraufhin mit PBS gewaschen und mit neuem Nährmedium versehen. Daraufhin wurden Zellen inklusive Medium nach 12, 18, 24, 48, 72 und 96 Stunden post-infektionem gesammelt. Die jeweiligen Proben durchliefen einen dreimaligen Gefrierzyklus, um Virus aus den Zellen freizusetzen und virale Titer wurden daraufhin mittels Plaque-Assay auf Vero-Zellen (American Type Culture Collection) bestimmt. Um die Menge an freigesetzten Viruspartikeln aus sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh, zu bestimmen, wurden MSC mit oHSV-mCh infiziert, mit PBS gewaschen, in sECM eingebettet und in der Mitte von 24-Well Zellkulturplatten (2x10<sup>4</sup> Zellen/Schale) kultiviert, woraufhin der virale Titer, wie oben beschrieben, bestimmt wurde. Alle Experimente wurden in Triplets durchgeführt. [1]

## **2.3 In vitro Biolumineszenz-Test**

Für in vitro Studien zum Überleben von oHSV-geladenen MSC wurden Zellen in 96-Well Zellkulturplatten (2x10<sup>3</sup> Zellen/Schale) ausgesät und 24h später mit oHSV über einen Zeitraum von 4 Stunden bei einem MOI=15 infiziert. Zell-Überleben wurde über einen Verlauf von 5 Tagen gemessen indem die aggregierte zellmetabolische Aktivität mittels eines ATP-abhängigen lumineszierenden Reagens nach Herstellerangaben bestimmt wurde (Cell-Titer-Glo, Promega, Madison, WI, USA). [1]

## **2.4 Caspase-Aktivierung bei Mischkultur-Studien**

Um den therapeutischen Effekt von oHSV-geladenen MSC in Mischkultur mit GBM-Zellen zu bestimmen, wurden GFI-exprimierende GBM-Zellen (5x10<sup>3</sup>/Schale) und entsprechend 5% MSC-TRAIL, 5% MSC-oHSV-mCh oder 10% MSC-oHSV-TRAIL in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Das Überleben der GBM-Zellen wurde 3 Tage später bestimmt, indem spezifisch deren Fluc-Aktivität gemessen wurde. Dazu wurde das Kulturmedium ersetzt durch 250 µl frisches Medium mit 1mg/ml D-Luciferin (Biotium). Die Platten wurden für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und Fluc-Aktivität wurde daraufhin mittels einer stickstoffgekühlten CCD-Kamera gemessen (Roper Scientific, Trenton, NJ). Caspase 3/7 Aktivität von GBM-

Zellen in Mischkultur mit 5% MSC-TRAIL, 5% MSC-oHSV-mCh oder 5% MSC-oHSV-TRAIL wurde 2 Tage nach Plattierung der Zellen mittels DEVD-aminoluciferin (CaspaseGlo 3/7, Promega) nach Herstellerangaben gemessen. Für Experimente mit sECM-umhüllten Zellen wurden die zwei sECM-Komponenten Hystem und Extralink (Glycosan Hystem-C, Biotime Inc.) nach Herstellerangaben rekonstituiert. MSC ( $4 \times 10^4$ ), MSC ( $4 \times 10^4$ ) infiziert mit oHSV-mCh (über 4 Stunden bei MOI=15) oder die äquivalente Menge an konzentriertem oHSV-mCh ( $6 \times 10^5$  PFU) wurden in Hystem (10  $\mu$ l) resuspendiert und der Matrix-Cross-Linker (3  $\mu$ l) wurde hinzugegeben. Die in sECM eingebetteten MSC, MSC-oHSV-mCh oder reiner oHSV-mCh in sECM wurden in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät und U87-GFI ( $2 \times 10^4$ ) wurden hinzugefügt und Fluc-Signal über die folgenden 1, 4 und 6 Tage ausgelesen. Alle Experimente wurden in Triplets durchgeführt und zweimal wiederholt. [1]

## **2.5 Western-Blot Analyse und ELISA**

24 Stunden nachdem LN229-Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Schale) in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät wurden, wurden MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL mittels Transwell-Inserts (BD Biosciences) mit diesen in Mischkultur gebracht. Nach 20 bzw. 40 Stunden Inkubationszeit wurden die Transwell-Inserts entfernt, LN229 Zellen wurden mit PBS gewaschen und daraufhin mit NP40 Puffer zusammen mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche bzw. Sigma) lysiert. 20  $\mu$ g Proteinprobenmasse aus jeweils jedem Lysat wurden in 10% SDS-PAGE gelöst und ein Immunoblot mit Antikörpern gegen Caspase-8 (Cell Signaling), Caspase-9 (Stressgen), cleaved-PARP (Cell Signaling) oder  $\alpha$ -Tubulin (Sigma) durchgeführt. Ausgewertet wurde der Immunoblot mittels Chemielumineszenz nach Inkubation mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern (Santa Cruz). Um die TRAIL-Sekretion von MSC-oHSV-TRAIL zu bestimmen wurden  $2 \times 10^4$  MSC mit oHSV-TRAIL bei MOI=15 infiziert und 4 Stunden später zweimal mit PBS gewaschen. Die TRAIL-Konzentration in Medium, das nach 0, 12, 24 und 48 Stunden post-infektionem gesammelt wurde, wurde mittels ELISA und eines TRAIL Immunoassay-Kits (Biosource International, Camarillo, CA) bestimmt, wobei rekombinantes hTRAIL als Standard genommen wurde [47]. Alle Experimente wurde in Triplets durchgeführt und zweimal wiederholt. [1]

## **2.6 Überlebensfähigkeit von oHSV-geladenen MSC in vivo**

Für die verschiedenen nachfolgend beschriebenen in vivo Experimente wurden weibliche SCID-Mäuse (6-8 Wochen alt, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) verwendet. Alle tierschutzrechtlichen Vorschriften und Prozeduren wurden dabei durch das Subcommittee on Research Animal Care des MGH überwacht.

Um die Überlebensfähigkeit von MSC-oHSV in vivo zu bestimmen, wurden MSC-GFI ( $1 \times 10^5$ /Maus; n=3) und mit oHSV-mCh infizierte MSC-GFI ( $1 \times 10^5$ /Maus; n=5) stereotaktisch in die Gehirne von SCID-Mäusen implantiert (etwa rechtes Striatum, 2,5mm lateral des

Bregmas, 2,5mm tief). Biolumineszenz-Bildgebung (BLI) zur Feststellung der Fluc-Aktivität wurde 10 Minuten nach intraperitonealer (i.p.) Injektion von D-Luciferin (1,5mg/25g Körpergewicht; aufbereitet in 150  $\mu$ l isotoner Kochsalzlösung) mittels eines stickstoffgekühlten hochsensitiven CCD-Kamerasystems (Roper Scientific, Trenton, NJ) durchgeführt. Mäuse wurden 24, 48 und 120 Stunden nach Implantation geopfert, um Hirnschnittbilder für immunhistochemische Analyse herzustellen. [1]

## **2.7 In vivo Experimente in intakten GBM-Tumoren**

Um einen ersten Anhalt über die therapeutische Wirkung von MSC-oHSV in vivo zu erhalten, wurden Gli36vIII-GFI-Zellen ( $5 \times 10^4$ /Maus) stereotaktisch in die Gehirne von SCID-Mäusen (n=12) wie zuvor beschrieben [43] implantiert. Eine Woche später wurden die Tiere mit stereotaktischen Injektionen von MSC ( $1 \times 10^5$ /Maus, n=3), oHSV-mCh ( $5 \mu$ l  $5 \times 10^9$  PFU/ml, n=3) oder MSC-oHSV-mCh ( $2 \times 10^5$ /Maus, n=6) behandelt, wobei die gleichen Koordinaten wie zuvor für die Tumorimplantation benutzt wurden. Das Tumolvolumen wurde im Verlauf mittels Fluc-Biolumineszenzbildgebung bestimmt wie zuvor beschrieben [43]. Um Hirnschnittbilder für immunhistochemische Analyse zu erhalten, führten wir oben beschriebenes Experiment erneut durch und opferten die Tiere sukzessive über eine Periode von 7 Tagen. Um die Wirkung von MSC-oHSV nach intravenöser Gabe zu untersuchen, wurden Mäuse mit Gli36vIII-GFP-Tumoren entsprechend intravenös behandelt (Schwanzvenen-Injektion von MSC-Fluc-mCherry;  $1 \times 10^5$ /Maus, n=3) und das Schicksal von MSC-Fluc-mCherry wurde im Verlauf mittels BLI überwacht. [1]

## **2.8 Fluoreszenzgestützte Tumorresektion**

Für die fluoreszenzgestützten Tumorresektionsverfahren mit 5-ALA-Bildgebung wurden Nacktmäuse (6-8 Wochen, 25-30g Gewicht, Charles River Laboratories, Wilmington, MA) verwendet. U87-GFP-Fluc Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Maus) wurden stereotaktisch im rechten Vorderlappen 2mm lateral des Bregmas in 0,5mm Tiefe unter der Dura implantiert (n=48). Am Tag der Tumorresektion erhielten Mäuse intravenöse Injektionen von 5-ALA (6mg/kg) über die Schwanzvene (n=5). Nach Immobilisation auf einem stereotaktischen Rahmen, wurden die Mäuse unter einem Olympus SZX10 Stereofluoreszenzmikroskop (Olympus, Center Valley, PA, USA) platziert. Intraoperativ wurden über den gesamten Verlauf Lichtbild-, GFP- und 5-ALA-Photoaufnahmen mit einer DP-72 Kamera und CellSens Software (Olympus) angefertigt. Eine Hautinzision erfolgte im Bereich der Mittellinie, um den Schädel freizulegen. Das intrakranielle Xenograft wurde daraufhin mittels GFP-Fluoreszenz lokalisiert und an entsprechender Stelle eine Kraniotomie durchgeführt, um ein genügend großes Knochenfenster herzustellen. Nach Freilegung des U87-GFP-Fluc Tumors wurde dieser unter ständiger fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle mittels chirurgischer Dissektion und Aspiration vorsichtig reseziert und der Verlauf entsprechend photographisch dokumentiert

(n=26). Prä- und postoperative Aufnahmen von 5-ALA-Anreicherung wurden angefertigt, um die Genauigkeit der GFP-gesteuerten Resektion zu kontrollieren. Um fluoreszenzgesteuerte sowie konventionelle Tumorresektion zu vergleichen, wurde eine Untergruppe von Mäusen (n=7) unter herkömmlicher Beleuchtung und ohne 5-ALA-Injektionen tumorreseziert bis das mutmaßliche Tumorgewebe entfernt war. Nach Resektion wurde die Tumorphöhle ausführlich gespült und die Haut mit Nahtfadenmaterial verschlossen. Alle experimentellen Protokolle und Vorgehensweisen wurden durch das Animal Care and Use Committee des MGH genehmigt. [1-2]

### **2.9 Wirkung von MSC-oHSV in GBM-Tumorresektionsmodellen in vivo**

Um die Wirkung von MSC-oHSV und MSC-oHSV-TRAIL in einem klinisch relevanten Tumorresektionsmodell zu testen, wurde zunächst analog zu oben beschriebenem Protokoll vorgegangen. Dabei wurden jedoch Gli36vIII-GFI ( $5 \times 10^4$  Zellen/Maus) oder LN229-GFI ( $5 \times 10^5$  Zellen/Maus) mit den oben genannten Koordinaten stereotaktisch in die Gehirne von 10 SCID-Mäusen implantiert und Tumorresektionen wurden 7 (Gli36vIII-GFI) bzw. 21 (LN229-GFI) Tage später wie zuvor beschrieben [14] durchgeführt. Zur Einbettung in sECM wurden MSC, MSC-oHSV-Fluc, MSC-oHSV-mCh oder MSC-TRAIL (jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen/Maus) in 7  $\mu$ l Hystem resuspendiert und 3  $\mu$ l Matrix-Cross-Linker hinzugegeben. Daraufhin wurden die so behandelten Zellen bzw. konzentrierte oHSV-Partikel ( $10^8$  PFU in 10  $\mu$ l Volumen) in die Resektionshöhle injiziert (n=5). Mäuse wurden daraufhin sukzessive auf Tumolvolumenentwicklung mittels korrespondierender Fluc-Aktivität hin untersucht wie oben beschrieben. [1]

### **2.10 Persistenz von oHSV-Infektion in GBM-Tumorresektionsmodellen**

Um die Persistenz von oHSV in GBM-Tumorresektionsmodellen nach erfolgter Therapie beurteilen zu können, wurden analog zu oben beschriebener Vorgehensweise Gli36vIII-GFP-Zellen ( $5 \times 10^4$ /Maus) stereotaktisch in die Gehirne von 10 Mäusen implantiert und die Tumorresektion 7 Tage später durchgeführt. sECM eingebettete MSC-oHSV-Fluc ( $2 \times 10^5$ , n=5) bzw. konzentrierte oHSV-Fluc Partikel ( $10^8$  pfu in 10ml Volumen) wurden dabei in die Resektionshöhle injiziert. Mäuse wurden daraufhin über einen Zeitraum von 12 Tagen engmaschig auf oHSV-induzierte Fluc-Aktivität hin überwacht. [1]

### **2.11 Survival-Studien nach GBM-Tumorresektion**

Für Survival-Studien nach GBM-Tumorresektion wurden Mäuse mit Gli36vIII-GFI Tumoren (n=20) tumorreseziert und mit sECM-umhüllten MSC ( $2 \times 10^5$ /Maus, n=5), konzentrierten oHSV-mCh-Partikeln (10ul of  $10^9$  PFU/ml, n=5) oder sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh ( $2 \times 10^5$ /Maus, n=10) behandelt. Fluc-Aktivität wurde im Verlauf mittels Biolumineszenzbildgebung ermittelt und die Mäuse im Rahmen der Überlebensstudie überwacht bzw. geopfert sobald es zu neurologischen Symptomen oder Ausfällen kam. Für

oHSV-TRAIL in vivo Überlebensstudien wurden LN229-GFI GBM-Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Maus) implantiert (n=12) und 21 Tage später die entsprechende Tumorresektion durchgeführt, gefolgt von Injektion von sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh ( $2 \times 10^5$ , n=6) oder sECM-umhüllten MSC-oHSV-TRAIL ( $2 \times 10^5$ , n=6). Auch hier wurde Fluc-Aktivität im Verlauf ermittelt und die Mäuse im Rahmen der Überlebensstudie entsprechend überwacht bzw. wenn nötig geopfert. [1]

## **2.12 Gewebeverarbeitung und Immunhistochemie**

Mäuse wurden nach entsprechender Narkotisierung mittels direkter intrakardialer Injektion von eisgekühlter 4% Paraformaldehydlösung (PFA) perfundiert und die Gehirne in 4% PFA fixiert. Gefrierdünnschnittschnitte wurden angefertigt für Analysen mittels H&E-Färbung, Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie. Um lacZ-exprimierende Zellen zu identifizieren, wurde eine X-gal-Färbung verwendet, für die Schnitte in einer Mischung aus 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (1mg/ml), Kaliumhexacyanidoferrat (5 mM) und Magnesiumchlorid (2 mM) für 5 Stunden bei 37° C inkubiert wurden. Für NeuN- und GFAP-Färbung, zur Darstellung von jeweils Neuronen und Astrozyten, wurden Schnitte mit primären Antikörpern für entweder NeuN (Millipore, 1:200) oder GFAP (Sigma, 1:400) inkubiert. Nach Anwendung des Vactastain Elite ABC Kit (Vector) nach Herstellerangaben wurden die Schnitte mittels Diaminobenzidin (Dako) visualisiert. [1-2]

## **2.13 Statistische Analyse**

Daten wurden bei Vergleich zweier Gruppen mittels Student t-test analysiert. Daten wurden mit mittlerer Standardabweichung dargestellt. Unterschiede wurden als statistisch Signifikant angesehen bei  $P < 0,05$ . Kaplan-Meier-Analysen wurden für Maus-Survival-Studien genutzt und Gruppen wurden verglichen mittels Gehan-Breslow-Wilcoxin-Test oder  $\chi^2$ -Kontingenz-Test. Alle statistischen Tests waren zweiseitig. [1-2]

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Entwicklung fluoreszenzgestützter Tumorresektionsverfahren**

Um die Ergebnisse des fluoreszenzgestützten Tumorresektionsverfahrens mittels nicht-invasiver Biolumineszenzbildgebung (BLI) validieren bzw. überwachen zu können, entwickelten wir zunächst humane U87 GBM-Zellen, die ein GFP-Fluc Fusionsprotein exprimieren (U87-GFP-Fluc). Serielle in vivo Bildgebung mittels BLI bestätigte das problemlose Einwachsen der U87-GFP-Fluc GBM-Tumoren und zeigte kontinuierliches intrakranielles Wachstum über einen Zeitraum von 2 Wochen (Abb. 1a). Nach Hautinzision genügte die durch die dünne Schädeldecke hindurchreichende Fluoreszenzsignalstärke bereits, um die ungefähre Lokalisation des U87-GFP-Fluc Tumors zu bestimmen, woraufhin dieser anschließend mittels Kraniotomie und entsprechender Präparation freigelegt werden

konnte (Abb. 1b). Um zu validieren, dass das registrierte GFP-Signal tatsächlich der Tumorausdehnung entspricht, wurde mehreren Mäusen 5-ALA intravenös verabreicht, welches zuvor als zuverlässiger Marker der GBM-Tumorausdehnung beschrieben wurde [9, 10]. 5-ALA-Prophyrin-vermittelte Fluoreszenz war weiträumig mit den GFP-vermittelten Fluoreszenzbereichen deckungsgleich (Abb. 1c). Unter Fluoreszenzkontrolle wurde daraufhin der Tumor weitgehend entfernt, wobei ein minimaler Rest in der Resektionshöhle belassen wurde (Abb. 1d), dessen Malignität noch einmal mittels 5-ALA-vermittelter Porphyrin-Fluoreszenz bestätigt wurde. [2]

### **3.2 Postoperative Validierung fluoreszenzgestützter Tumorresektionsverfahren**

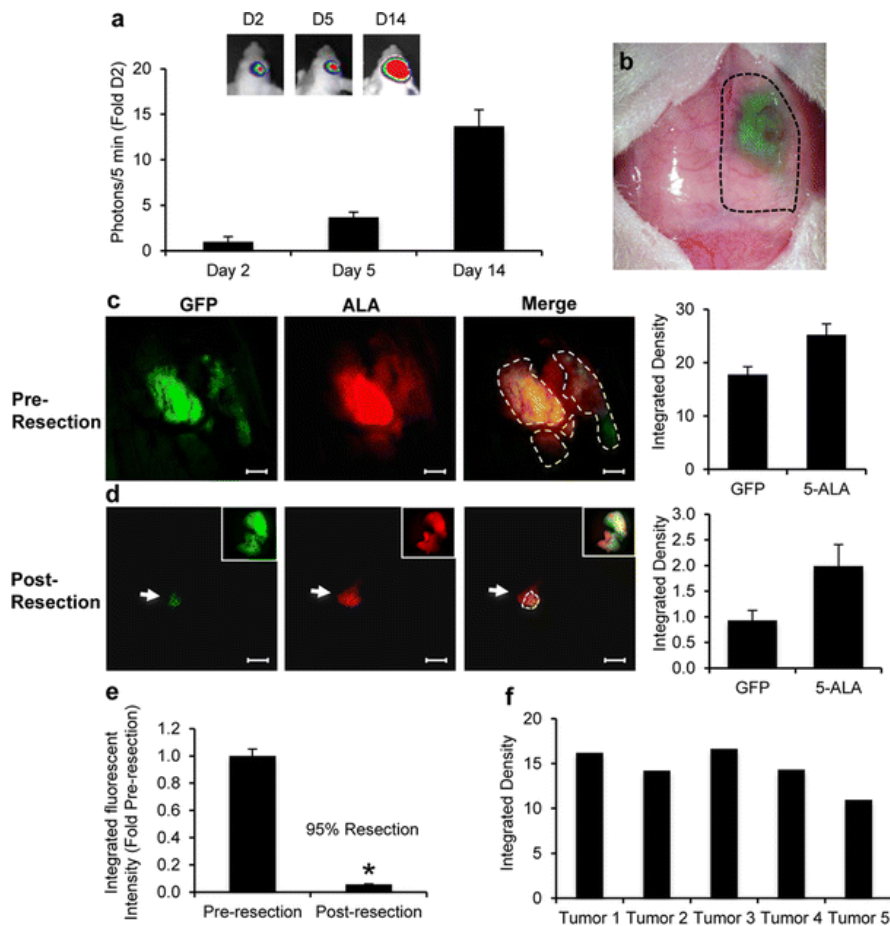
Das Ausmaß der chirurgischen Tumorresektion wurde im Verlauf durch Bildgebungsverfahren mittels BLI und MRI quantifiziert, wobei festgestellt wurde, dass mehr als 92% bzw. 96% der Tumormasse reseziert wurden (Abb. 2a-d). Bildgebung mittels BLI zeigte darüberhinaus, dass bei fluoreszenzgestützten Tumorresektionen verglichen mit der konventionellen Resektionsmethode im Durchschnitt wesentlich mehr Tumormasse entfernt werden konnte (fluoreszenzgestützte Resektion: 92% Tumormasse entfernt; konventionelle Resektion: 76% Tumormasse entfernt), wobei sich bei der fluoreszenzgestützten Methode auch die Variabilität der Tumormasseentfernung verringerte (Abb. 2e). Histologische Analysen von Mausgehirnen nach Tumorresektion bestätigten die fast vollständige Resektion mit nur wenigen verbleibenden Tumorzellen in der Peripherie der Resektionshöhle (Abb. 2f-g). [2]

Diese Ergebnisse zeigen, dass intraoperative GFP-Fluoreszenzbildgebung hochgenaue Tumorresektionen in Mäusen erlaubt und dass postoperative nicht-invasive Bildgebungsverfahren gut dazu geeignet sind, das Ausmaß der Resektion zu quantifizieren sowie die Lokalisation von verbliebenen Tumorresten darzustellen. [2]

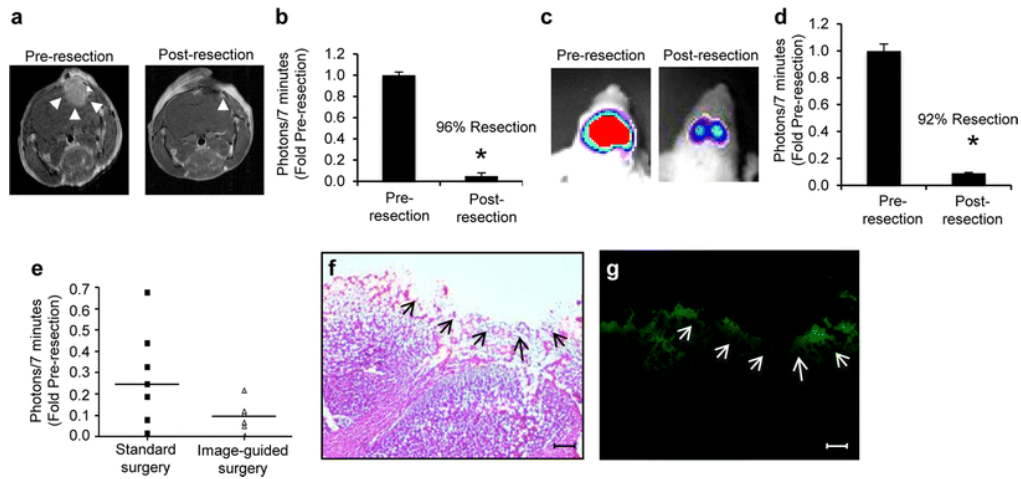
### **3.3 Darstellung der Tumorrezidivbildung nach Resektion**

Klinische Untersuchungen haben ergeben, dass GBM-Tumorrezidive in der Regel sehr bald nach der entsprechenden Resektion und dabei meist innerhalb von 2cm der ursprünglichen Resektionsgrenze auftreten [48, 49]. MR-Bildgebung 8 Tage postoperativ zeigte, dass die ursprünglich kleinen GBM-Tumorreste wieder stark an Größe zugenommen hatten. Dies führte innerhalb von 15 Tagen nach der ursprünglichen Resektion zur erneuten Bildung von multifokalen Rezidiven, die sich schließlich wieder zu einem einzigen großen soliden Tumor vereinigten (Abb. 3a). Quantitative Bildgebung mittels BLI nach Resektion ergab ähnliche Ergebnisse und zeigte eine siebenfache Erhöhung des Tumolvolumens während der ersten 5 Tage nach Tumorresektion, und steigerte sich bis hin zu einer 26-fachen Erhöhung bis Tag 13 (Abb. 3b). Das Ergebnis der Überlebensstudien zeigte, dass sich durch die Resektion das

**(Fortsetzung Seite 18)**

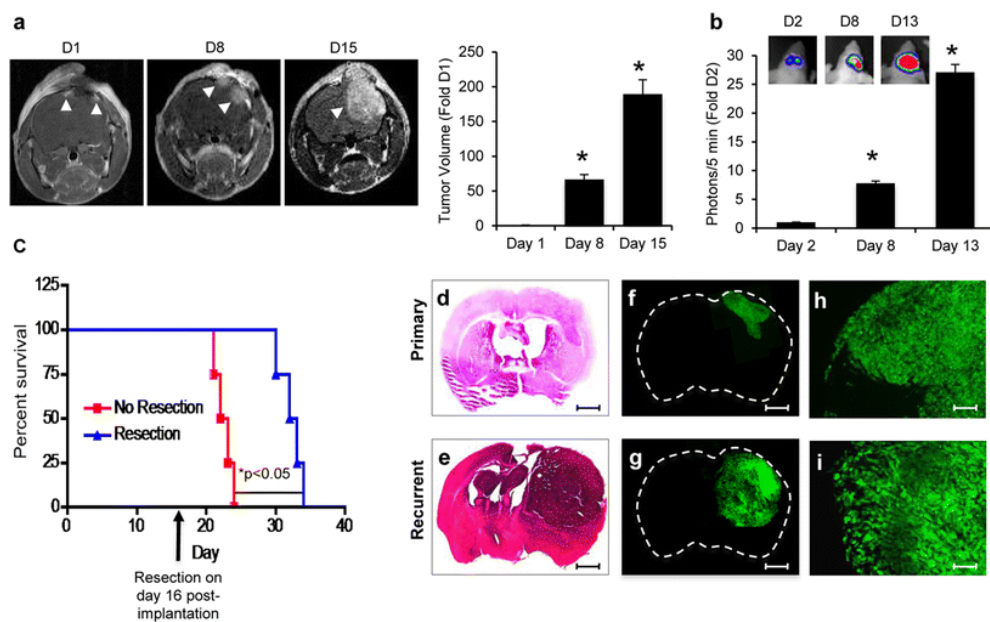


**Abbildung 1: Fluoreszenzgestützte GBM-Resektion und Validierung mittels 5-ALA.** **a** Repräsentative BLI-Daten zeigen Progression von orthotopischen U87 GBM in Mäusen. **b** Repräsentative Aufnahme zeigt Visualisierung des U87-GFP-Fluc Tumors durch das Cranium hindurch. Auf dieser Grundlage wurde die craniale Fensterung geplant (gestrichelte Linie). **c, d** Repräsentative intraoperative Fluoreszenzaufnahmen zeigen GFP-Fluc-Expression des intracranialen GBM-Tumors und Validierung mittels 5-ALA prä- **c** und post- **d** operativ. Bildeinsätze zeigen GFP-Fluoreszenz, 5-ALA oder Überlagerung beider Aufnahmen. Entsprechende Diagramme demonstrieren relative intrakranielle prä- und post-operative Tumorstärken gemessen anhand der GFP- bzw. 5-ALA-Aufnahmen. **e** Zusammenfassendes Diagramm demonstriert das Ausmaß der chirurgischen Resektion anhand Auswertung der GFP-Fluoreszenzaufnahmen. **f** Diagramm mit Ausmaß der relativen Tumorstärke nach GFP-Integrated-Density aufgeschlüsselt nach einzelnen Fällen. Daten + SD, \* $P < 0,05$  nach Student t-test. Skalengröße: 200  $\mu\text{m}$ . [2]



**Abbildung 2: Quantitative nicht-invasive Bildgebung von GBM-Tumorvolumen prä- und postoperativ.** Repräsentative Bilder und Summendaten quantitativer Bildgebung zeigen Ausmaß der chirurgischen Resektion mittels MRI (**a,b**) und BLI (**c,d**). MRI: jeweils ein Tag vor und nach Resektion erhielten Mäuse MR-Bildgebung nach Injektion von Gd-DTPA. Tumorvolumen wurden mittels ImageJ Software ausgewertet. Die Pfeile zeigen Tumorreste an. BLI: jeweils ein Tag vor und nach Resektion wurden Tumorvolumen mittels BLI nach Injektion von D-Luciferin bestimmt. **e** Scatterplot zeigt verbliebenes Tumorvolumen durch BLI ermittelt jeweils nach fluoreszenzgestützter oder konventioneller Tumorresektion. Horizontale Linie als Mittelwert des jeweiligen Operationstyps. **f**, **g** Repräsentative Weißlichtaufnahmen von H&E-Färbung (**f**) bzw. Fluoreszenzmikroaufnahmen (**g**) von korrespondierenden Hirnschnittbildern nach Resektion (Tag 1). Pfeile in **f** und **g** zeigen Ausmaß der Tumorresektion. Daten + SD, \*P<0,05 nach Student t-test. Skalengröße 100 µm (**f**, **g**) [2]





**Abbildung 3: Multimodale Darstellung und Überwachung postoperativer GBM-Rezidivbildung.** **a, b** Repräsentative Bilder und Summendiagramme zeigen GBM-Rezidive nach Resektion mittels nicht-invasiver Bildgebung. Nach Tumormasseentfernung wurde bei Mäusen eine MRT-Untersuchung an Tag 1, 8 und 15 (**a**) bzw. eine BLI-Untersuchung an Tag 2, 8 und 13 (**b**) nach Resektion durchgeführt. Pfeilspitzen deuten auf Tumorreste in Darstellung (**a**). **c** Kaplan-Meier-Kurven stellen Überlebenskurven von Mäusen dar, die entweder keine Tumorsektion erhielten oder aber einer Tumorsektion unterzogen wurden. **d-i** Repräsentative Weißlichtaufnahmen von H&E-Färbungen (**d, e**) und Fluoreszenzmicrophotographien (**f-i**) von Hirnschnittbildern von Mäusen mit primären Hirntumoren (**d, f, h**) sowie von Mäusen mit Rezidivtumoren 2 Wochen nach Resektion (**e, g, i**). Nach intrakranialer Xenotransplantat-Implantation wurden Mäuse entweder 2 Wochen später geopfert oder einer Tumorsektion unterzogen und daraufhin 2 Wochen später geopfert. 2-fache Vergrößerung: **d, e, f, g**; 10-fache Vergrößerung: **h, i**. Daten + SD, \*P < 0.05 bestimmt nach ANOVA (**a, b**) sowie log-rank-Test (**c**). Skalengröße: 100 µm (**d, e, f, g**) und 400 µm (**h, i**) [2]

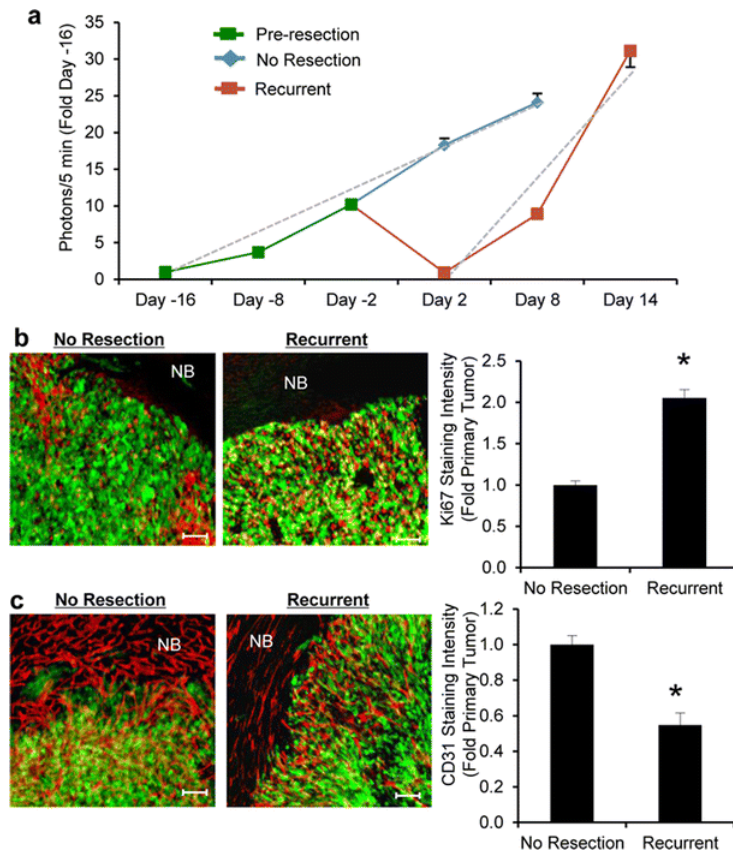
Überleben signifikant aber trotzdem nur mäßig verlängerte (32,5 Tage reseziert vs. 22,5 Tage nicht-reseziert) (Abb. 3c). H&E-Färbung sowie Fluoreszenzmikroskopie von postmortalen Gefrierhirnschnitten validierten die Ergebnisse der nicht-invasiven Messergebnisse und zeigten einen großen Tumor mit deutlich andersartiger Morphologie als die nicht-resezierten Tumoren (Abb. 3d-i). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Verbleib von GBM-Resten nach Resektion zu rapiden, multifokalen Tumorrezidiven führt, die in Echtzeit mittels nicht-invasiver Bildgebungsverfahren überwacht werden können. [2]

### **3.4 Wachstumsdynamik von resezierten und nicht-resezierten Tumoren**

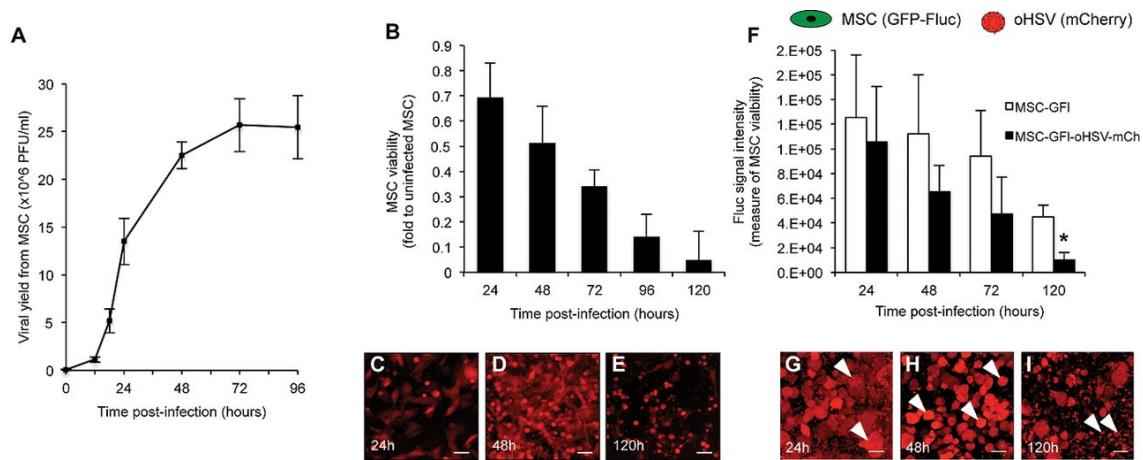
Um die Wachstumsdynamik von resezierten und nicht-resezierten Tumoren vergleichen zu können, verglichen wir Mäuse, die chirurgische Tumorresektionen erhalten hatten mit den Tieren, bei denen keine derartige Behandlung durchgeführt wurde. Longitudinale Auswertung von BLI-Daten zeigten, dass Volumen von resezierten Tumoren zum Ende hin größer waren als Volumen in nicht-resezierten Tieren (Abb. 4a). Regressionsanalysen der Wachstumskurven zeigten außerdem, dass die Kurvensteigung bei GBM-Rezidiven deutlich höher als bei nicht-resezierten GBM war (15,09 bei GBM-Rezidiven; 6,08 bei nicht-resezierten GBM, Abb. 4a). Immunohistochemische Untersuchungen bestätigten dies und zeigten doppelt so hohe Level des Proliferationsmarkers Ki67 in GBM-Rezidivtumoren (Abb. 4b). Trotz der vermehrten Proliferationsrate in Tumorrezidiven zeigte die CD31-Färbung eine 46-prozentige Reduktion der Blutgefäßdichte in Tumorrezidiven (Abb. 4c). Zusammenfassend zeigt dies, dass sich die postoperative Tumorrezidivbildung rapide vollzieht und dass sich die dabei entstehenden Rezidivtumoren deutlich von den ursprünglichen Tumoren unterscheiden. [2]

### **3.5 MSC als zelluläre Transportvehikel für oHSV**

Um festzustellen, ob MSC überhaupt in der Lage sind als zelluläre Transportvehikel für oHSV zu dienen, wurde zunächst die oHSV-Replikation und Freisetzung viraler Partikel aus humanen MSC in vitro untersucht. Humane MSC wurden dazu mit einer auf G47 $\Delta$ -basierenden rekombinanten oHSV-Variante infiziert, die eine cDNA-Sequenz des mCherry-Fluoreszierenden-Proteins unter dem IE4/5-immediate-early Promotor von HSV enthält (oHSV-mCh) [46]. Die Infektion von MSC mit oHSV-mCh erbrachte eine exponentielle Amplifikation des Virus innerhalb von 24 Stunden (Abb. 5A), die mit gleichzeitiger Expression des mCherry-Markerproteins einherging und eine Verminderung der MSC-Zellzahl zur Folge hatte (Abb. 5, B-E). Um die Überlebensfähigkeit von oHSV-mCh-geladenen MSC (MSC-oHSV-mCh) in vivo zu bestimmen, wurden zuerst MSC so modifiziert, dass sie das zuvor beschriebene Fusionsprotein GFP-Fluc bzw. GFI exprimieren. Dabei konnte eine statistisch signifikante Verminderung im Zellüberleben von intrakranial implantierten oHSV-mCh-geladenen MSC-GFI im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Fortsetzung Seite 21**)



**Abbildung 4: Resezierte GBM-Tumoren zeigen höhere Wachstumsraten als nicht-resezierte GBM-Tumoren.**  
**a** Anhand von BLI-Werten erstelltes Kurvendiagramm zeigt die Wachstumsraten von primären und rekurrenten intracraniellen GBM. Gestrichelte Linie zeigt die Steigung der jeweiligen Wachstumskurven für jede Gruppe, bestimmt mittels Regressionsanalyse.  
**b, c** Repräsentative Bilder und Übersichts-Diagramme zeigen die relativen Expressionslevel des Proliferationsmarkers Ki67 (**b**) sowie des Blutgefäßmarkers CD-31 (**c**) in Gewebeproben von primären bzw. rekurrenten GBM-Tumoren. Daten + SD, \*P < 0.05 bestimmt nach Student-t-test (**b, c**). Skalengröße 100 µm.  
**[2]**



**Abbildung 5: Verhalten mesenchymaler Stammzellen (MSC), die mit onkolytischem Herpes Simplex Virus (oHSV) beladen wurden, in vitro und in vivo.** MSC wurden mit oHSV-mCherry (oHSV-mCh) infiziert und Virusproduktion sowie MSC-Überleben über mehrere Tage verfolgt. **A**) oHSV-Ertrag von infizierten MSC in vitro über 4 Tage. Kurvenpunkte  $\pm$  SD. **B**) Überleben von MSC-oHSV-mCh in vitro über einen Verlauf von 120 Stunden. **C–E**) Microphotographien von MSC-oHSV-mCh bei Durchlaufen verschiedener Stufen der Transgenexpression sowie Darstellung des zytopathischen Effekts nach 24 (**C**), 48 (**D**), and 120 (**E**) Stunden nach Infektion. **F**) MSC, die Firefly Luciferase (Fluc) exprimieren, wurden mit oHSV-mCh beladen und MSC-Überleben in vivo über 5 Tage verfolgt. Dargestellt ist Fluc Signalaktivität als Maß für MSC-Überleben. **G–I**) Microphotographien von Maus-Hirnschnittbildern nach Implantation von MSC-oHSV-mCh. Mäuse wurden 24 (**G**), 48 (**H**), und 120 (**I**) Stunden nach Implantation geopfert. Pfeilspitzen zeigen Zellen zu Beginn der Virusreplikation (**G**), zytopathischen Effekt (**H**), und Zelldebris nach virusvermittelter Zelllyse (**I**). Daten + SD. \*P < 0.05 bestimmt nach Student-t-test. Skalengröße 100  $\mu$ m [1]

beobachtet werden ( $P=0.006$ ) (Abb. 5F).

Hirnschnittbilder von im Verlauf geopfertem Tieren zeigten fluoreszierende Zellen mit zytopathischem Effekt im Sinne von virusgeladenen, mCh-positiven MSC im fortgeschrittenen Stadium der Virus- und mCh-Amplifikation mit darauffolgender Zelllyse sowie mCh-positivem Zelldebris (Abb. 5, G-I). **[1]**

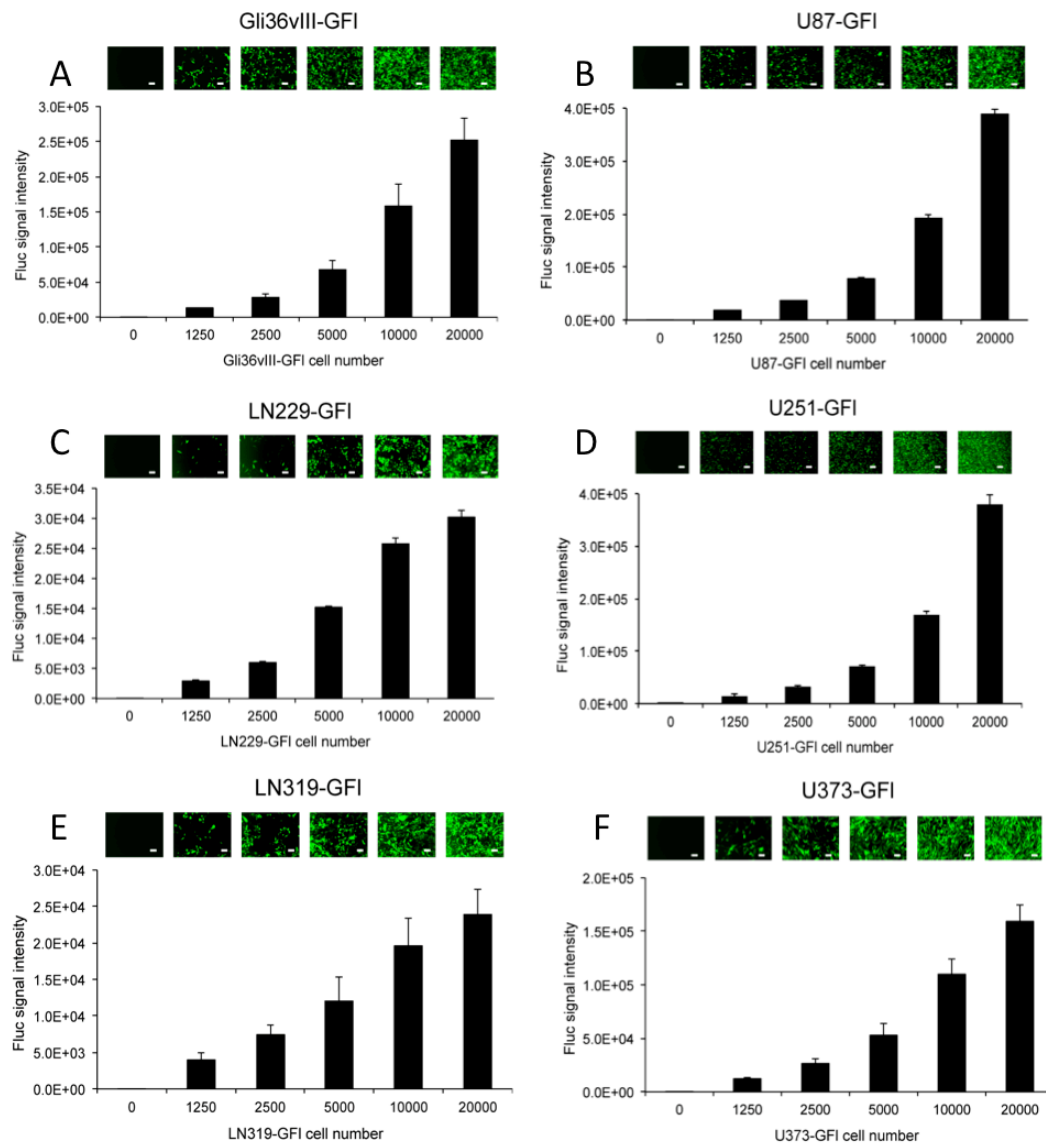
Um die onkolytische Aktivität von MSC-oHSV-mCh in Mischkultur mit GBM-Zellen zu bestimmen, wurden speziell modifizierte humane GBM-Zelllinien Gli36vIII (hochproliferativ) und U87 (mittelgradige Proliferationsrate) genutzt, die als diagnostischen Marker ebenfalls GFI exprimierten, Gli36vIII-GFI und U87-GFI. Dabei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen GBM-GFI Zellzahl, Fluc-Signalintensität und GFP-positiven Zellen *in vitro* beobachtet werden (Abb. 6). **[1]**

Die Freisetzung von oHSV-mCh aus MSC führte in Mischkultur zu Infektion der modifizierten GBM-Zellen und zu Verbreitung des Virus unter benachbarten GBM-Zellen mit ausgedehnten Onkolysefeldern und -fronten als Folge (Abb. 7, A-F). Dabei führte oHSV-Infektion zu drastischer Onkolyse von hochproliferativen Gli36vIII-GFI (Abb. 7, A-C und G) sowie auch mittelgradig proliferativen U87-GFI (Abb. 7, D-G). Analog dazu führten weitere Mischkulturversuche von MSC-oHSV-mCh mit anderen GBM-Zelllinien zu stärkerem Zelltod bei oHSV-sensibleren Zelllinien (U87, U251, U373, Gli36vIII) als bei relativ oHSV-resistenten Zelllinien (LN229, U138, LN319) (Abb. 8). **[1]**

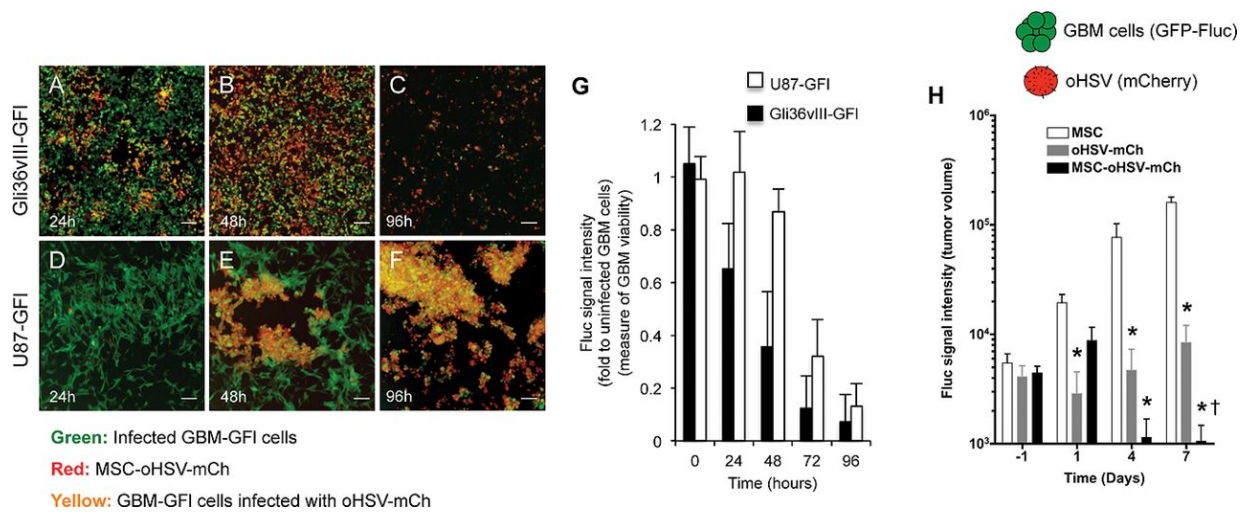
Trotz des äußerst aggressiven Tumorwachstums von Gli36vIII-GFI *in vivo* (Abb. 9), führten intratumorale Injektionen von oHSV-mCh bzw. MSC-oHSV-mCh in Mäusen mit eingewachsenen Gli36vIII-GFI-Tumoren zu statistisch signifikanter Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zur Gruppe mit Kontrollinjektionen von normalen MSC-Zellen (Abb. 7H). Interessanterweise wurde jedoch in der MSC-oHSV-mCh-Gruppe eine statistisch signifikant stärkere Antitumorwirkung beobachtet als in der Gruppe, die konzentrierte oHSV-mCh-Injektionen erhielt (Abb. 7H). Um zu testen, ob mittels systemischer Gabe von MSC-oHSV-mCh eine Behandlung intrakranieller Tumoren möglich wäre, wurden Mäuse mit eingewachsenen Gli36vIII-Tumoren mit intravenösen Gaben von MSC behandelt, die ein Fusionsprotein aus Firefly Luciferase und mCherry-Fluoreszenzprotein exprimierten (FmC): MSC-FmC. Fluc-Biolumineszenzbildgebung ergab dabei, dass intravenös injizierte MSC nicht in der Lage sind, sich im Bereich der intrakraniellen neoplastischen Läsionen abzusetzen und stattdessen in den Lungen abgefangen werden (Abb. 10). **[1]**

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass oHSV-mCh-geladene MSC in der Lage sind, effektiv oHSV zu amplifizieren und freizusetzen, was zu effizienter Abtötung von GBM-Tumorzellen *in vitro* als auch in ausgewachsenen GBM-Tumoren *in vivo* führt. **[1]**

(Fortsetzung Seite 25)

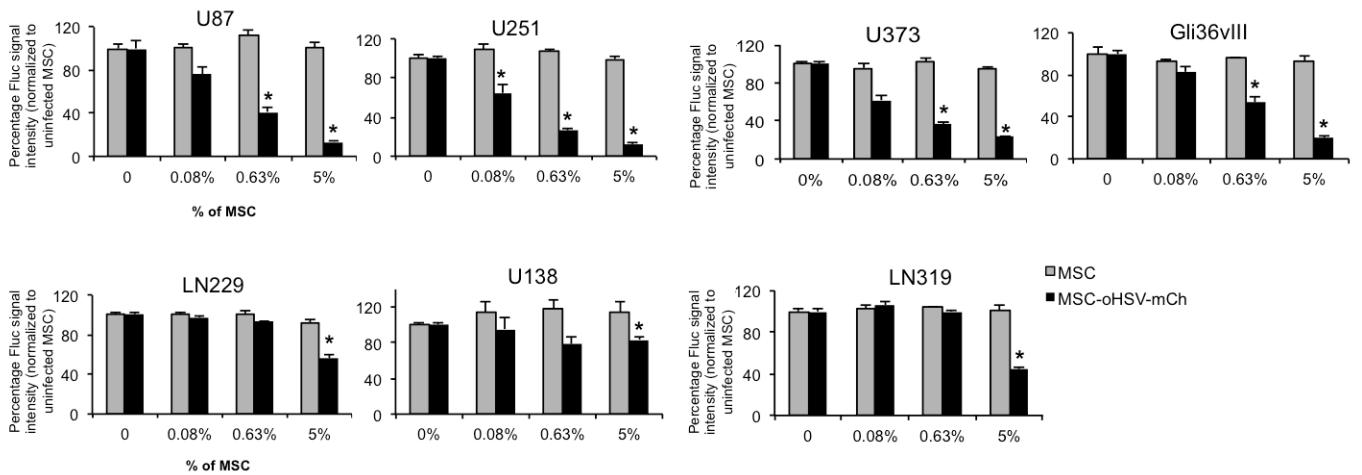


**Abbildung 6: Expression bimodaler diagnostischer Transgene mittels lentiviraler Vektoren.** Verdünnungsreihen von GBM-Zelllinien, die das bimodale fluoreszierende und biolumineszierende GFI-Fusionsprotein GFP-Firefly-Luciferase (Fluc) exprimieren, wurden ausgesät, woraufhin 24 Stunden später die Fluc-Signalintensität bestimmt wurde. Bilder zeigen (A) Gli36vIII-GFI, (B) LN229-GFI, (C) U251-GFI, (D) U87-GFI, (E) LN319-GFI, (F) U373-GFI, und (G) U138-GFI Zellen. Skalengröße: 200  $\mu\text{m}$ . Balkendiagramme unterhalb der entsprechenden Aufnahmen zeigen Mittelwert und Standardabweichung der Fluc-Signalintensität. Alle Versuche wurden in Triplets durchgeführt. [1]



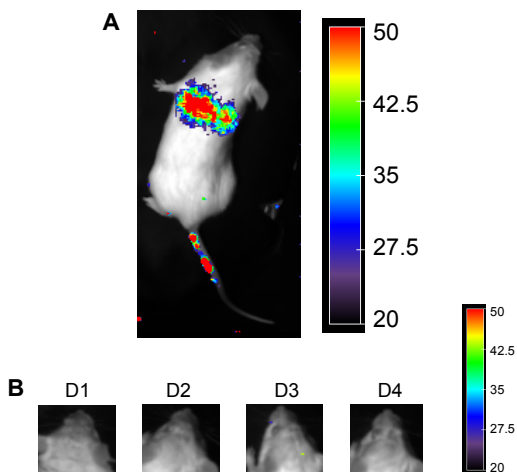
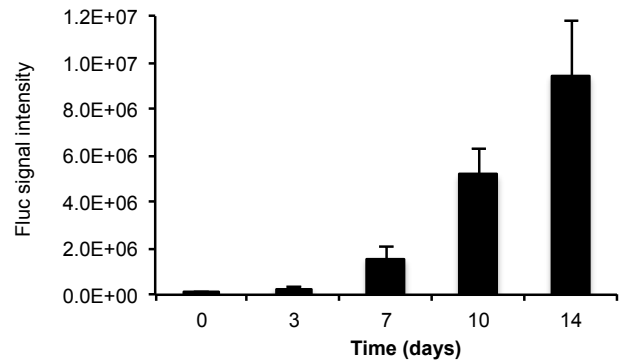
**Abbildung 7: Therapeutische Wirkung von humanen mesenchymalen Stammzellen beladen mit onkolytischem Herpes Simplex Virus in vitro und in vivo. A–F)** Verschiedene humane Glioblastoma Multiforme Zelllinien wurden genetisch so modifiziert, dass sie ein Fusionsprotein aus GFP und Firefly Luciferase (GFI) sezernieren. Gli36vIII-GFI und U87-GFI wurden zusammen mit 3% MSC-oHSV-mCherry kultiviert und oHSV-Ausbreitung sowie Zellüberleben der verschiedenen GBM-Linien im Verlauf beobachtet. Microphotographien von Gli36vIII-GFI (**A–C**) und U87-GFI (**D–F**) nach 24 (**A** und **D**), 48 (**B** und **E**), und 96 (**C** und **F**) Stunden. Grüne Zellen repräsentieren GBM-GFI Zellen, rote Zellen repräsentieren MSC-oHSV-mCh und gelbe Zellen repräsentieren GBM-GFI Zellen, die mit oHSV-mCh infiziert sind. **G)** Diagramm mit Zellüberleben von Gli36vIII-GFI und U87-GFI nach Mischkultur mit MSC-oHSV-mCh. **H)** Diagramm mit Biolumineszenzsignalintensität von Firefly Luciferase (Fluc) als Maß für Tumorumfängenänderungen in Mäusen mit etablierten Gli36vIII-GFI Tumoren, die mit MSC-oHSV-mCh or MSC-oHSV-mCh behandelt wurden. Daten + SD. Skalengröße: 200 µm. \*P < 0.05 nach Student-t-test. [1]





**Abbildung 8: Therapeutische Wirkung von durch MSC freigesetztem oHSV auf verschiedene GBM-Tumorzelllinien.** GBM-Linien, die das fusionierte GFI-Markerprotein exprimieren, wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (0,08-5%) in Mischkultur mit MSC bzw. MSC-oHSV-mCh gebracht. Zur Darstellung in den Diagrammen kommen oHSV-sensible (U87, U251, U373 und Gli36vIII) sowie weitestgehend oHSV-resistente (LN229, U138 and LN319) GBM-Linien, gemessen 3 Tage nach Infektion. Daten + SD, \* $P < 0,05$  verglichen mit Kontrollen (zweiseitiger t-test). Alle Versuche wurden in Triplets durchgeführt. [1]

**Abbildung 9: In vivo Wachstumsdynamik der hochproliferativen GBM-Variante Gli36vIII-GFI.** Dargestellt als Diagramm ist das hochaggressive Wachstumsmuster in Form von in vivo Fluc-Signallintensität über einen Zeitraum von 14 Tagen. Daten + SD [1]

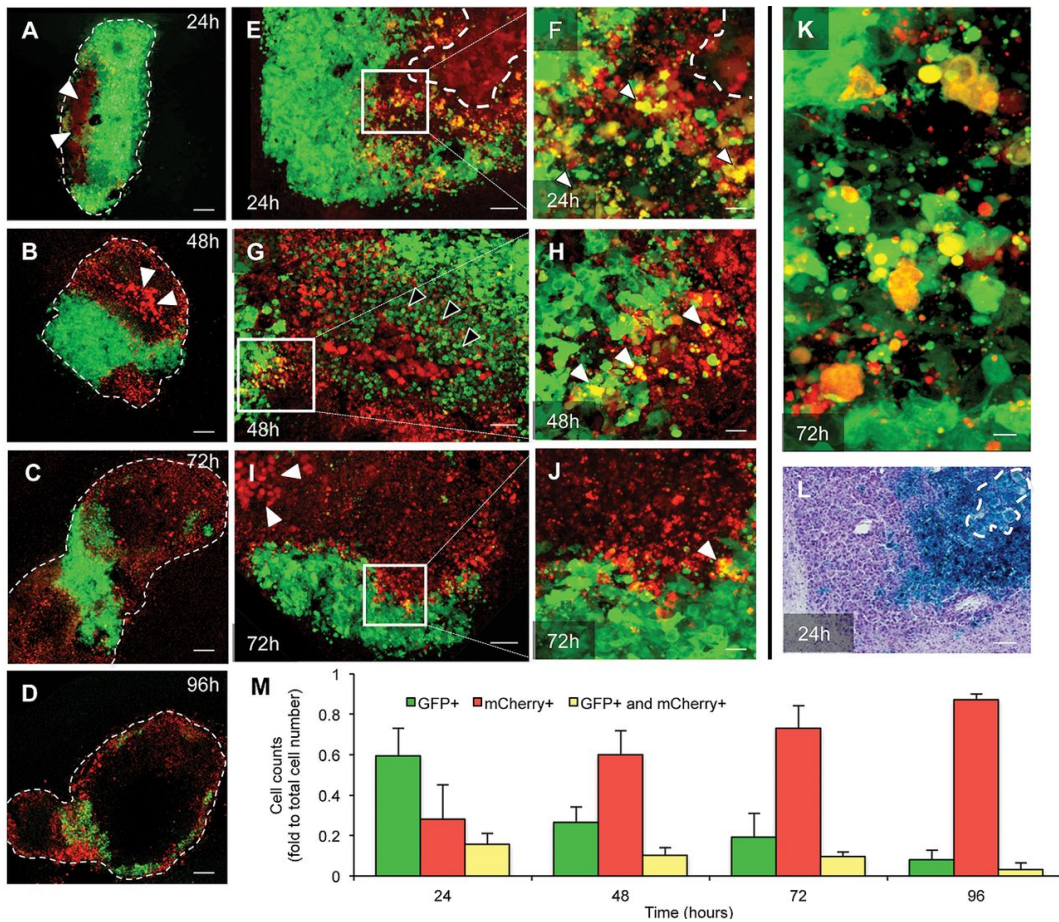


**Abbildung 10: Intravenöse Injektion von MSC-Fluc-mCh in Mäusen mit etablierten Tumoren.** Mäuse mit etablierten Gli36-GFP-Tumoren wurden mit intravenösen Injektionen von MSC-Fluc-mCh therapiert und das Schicksal der injizierten Zellen im Verlauf beobachtet. (A) Biolumineszenzaufnahme der gesamten Maus am Tag 1. (B) Biolumineszenzaufnahme der Kopfregion einer repräsentativen Maus an Tagen 1 bis 4. [1]



### 3.6 Dynamik der oHSV-Infektion und -Onkolyse in vivo

Um Dynamik und Mechanismus der oHSV-Ausbreitung sowie damit verbundenes Krebszellsterben, dass durch oHSV-geladene MSC vermittelt wird, genauer untersuchen zu können, wurden Mäuse mit hochproliferativen, ausgewachsenen Gli36vIII-GFI-Tumoren mit MSC-oHSV-mCh behandelt. Mehrfarbige Fluoreszenzbildgebung von seriellen Hirnschnittbildern zeigte die rapide Ausbreitung von oHSV-mCh ausgehend von der MSC-oHSV-Implantationsstelle bei gleichzeitigem Rückgang der durch Gli36vIII-GFI besetzten Tumorfläche über einen Zeitraum von 96 Stunden (Abb. 11, A-D). Nach 24 Stunden bildete sich eine erhöhte Anzahl an gelb abgebildeten Zellen (da sowohl GFP-positiv als auch mCherry-positiv) im Bereich der MSC-Implantationsstelle als Bestätigung, dass eine initiale Tumorzellinfektion mit sich ausbreitendem oHSV stattfand (Abb. 11, E und F, weiße Pfeilköpfe). Nach 48 Stunden konnte verstärkte oHSV-Amplifizierung und Ausbreitung des Virus mit Penetration in tiefere Tumorschichten beobachtet werden, wobei abgerundete Tumorzellen mit verminderter GFP-Expression wahrscheinlich auf bereits einsetzenden zytopathischen Effekt hindeuteten (Abb. 11G, schwarze Pfeilköpfe). Nach 72 Stunden reichte die Vorderfront der mCherry-positiven Fläche bis nahe an die Tumorperipherie, wobei sich dahinter ausgedehnte Flächen von mCherry-positivem Zelldebris gebildet hatten – bei beträchtlicher Reduktion der noch verbliebenden GFP-positiven, nicht-infizierten Tumorfläche (Abb. 11, C und I). Sich fortsetzende Zyklen von Tumorerkrankung, Virusamplifikation und Onkolyse waren an den Grenzflächen zwischen mCherry- und GFP-positiven Regionen bis mindestens 72 Stunden nach Implantation erkennbar (Abb. 11, F, H und J, weiße Pfeilköpfe) wobei sich GBM-Zellen in verschiedensten Phasen der Virusinfektion wie initialem Infektionsstadium, zytopathischem Effekt oder Zellysestadium präsentierten (Abb. 11K). X-gal-Färbung zur Kennzeichnung von lacZ (Reporter gen für oHSV-Infektion) von direkt benachbarten Hirnschnittbildern zeigte, dass die lacZ-positive Zellfläche sich fast komplett Deckungsgleich mit der mCherry-positiven sowie der mCherry/GFP-positiven (gelben) Fläche darstellte – ein Beleg dafür, dass mCherry-positiv sowie mCherry/GFP-positiv (gelbe) Fluoreszenzdarstellungen tatsächlich oHSV-infizierte Zellen repräsentieren (Abb. 11L). Quantifizierung der Fluoreszenzaufnahmen zeigte eine ständige Zunahme der mCh-infizierten Zellen bei gleichzeitiger Flächenabnahme der unbeeinträchtigten Tumorzellen, wobei die drastischsten Änderungen in Bezug auf Tumorerkrankung und Virusreplikation innerhalb der ersten 48 Stunden nach MSC-oHSV-mCh Implantation stattfanden (Abb. 11M). [1] (Fortsetzung Seite 27)



**Abbildung 11: Darstellung der viralen Onkolyse vermittelt durch mesenchymale Stammzellen (MSC) beladen mit onkolytischen Herpes Simplex (oHSV-mCherry) in vivo. A–D)** Mäuse mit Gli36vIII-GFI Tumoren wurden mit MSC-oHSV-mCh therapiert. Amplifikation von oHSV-mCh in MSC, virale Zelllyse und Infektion von Gli36vIII-GFI Zellen (GFP+mCh) konnte im Verlauf beobachtet werden. Hirnschnittbilder bei niedriger Vergrößerung zeigen virale Infektion (rot) von Tumorzellen (grün) über 4 Tage nach MSC-oHSV-mCh Implantation. **Pfeilspitzen in A) und D)** zeigen ursprüngliche MSC-oHSV-mCh Implantationsstelle. Virusausschüttung aus humanen MSC und Infektion von Gli36vIII-GFI hat im Verlauf die fast gesamte Zerstörung der ursprünglichen Tumormasse zur Folge (**weiß gestrichelte Linie**). **E) und F)** Große Mengen von gelb gefärbten infizierten GBM-Zellen (EGFP+, mCherry+; **Pfeilspitzen in F)** in den Tumorbereichen um die MSC Implantationsstelle 24 Stunden nach MSC Implantation. **G) und H)** Virus dringt während der ersten 48 Stunden in den Tumor vor und löst großflächigen zytopathischen Effekt aus (**schwarze Pfeilspitzen in G)** bei fortlaufender Infektion von neuen Tumorzellen (**weiße Pfeilspitzen in H**). **I und J)** Vorderfront der mCherry-positiven Fläche reicht nach 72 Stunden bis nahe an die Tumorperipherie bei beträchtlicher Reduktion des GFP-positiven, virusfreien Tumorareals. **K)** Hochauflösende konfokale Microphotographien zeigen infizierte GBM Zellen während unterschiedlicher Stadien der Virusinfektion. **L)** H&E- und X-gal-Färbung eines Hirnschnittbildes, das direkt an das in **(E)** gezeigte angrenzt, bestätigt, dass Fluoreszenzbildgebungsergebnisse direkt mit der konventionellen histologischen Analyse korrelieren (**weiß gestrichelte Linie**: MSC-Implantationsstelle). **M)** Diagramm zur Darstellung der quantitativen Auswertung von nicht-infizierten Gli36vIII Tumorzellen (GFP+), oHSV-mCh infizierten MSC (mCherry+), und oHSV-mCh infizierten Gli36vIII (GFP+ and mCherry+) im Verlauf der Behandlung. Dargestellt ist entsprechende Zellzahl relativ zur Gesamtzellzahl. Daten + SD. Skalengröße: 200 µm in **(A–D)**; 100 µm in **(E, G, I, und L)**; 50 µm in **(F, H, und J)**; 20 µm in **(L)**. [1]

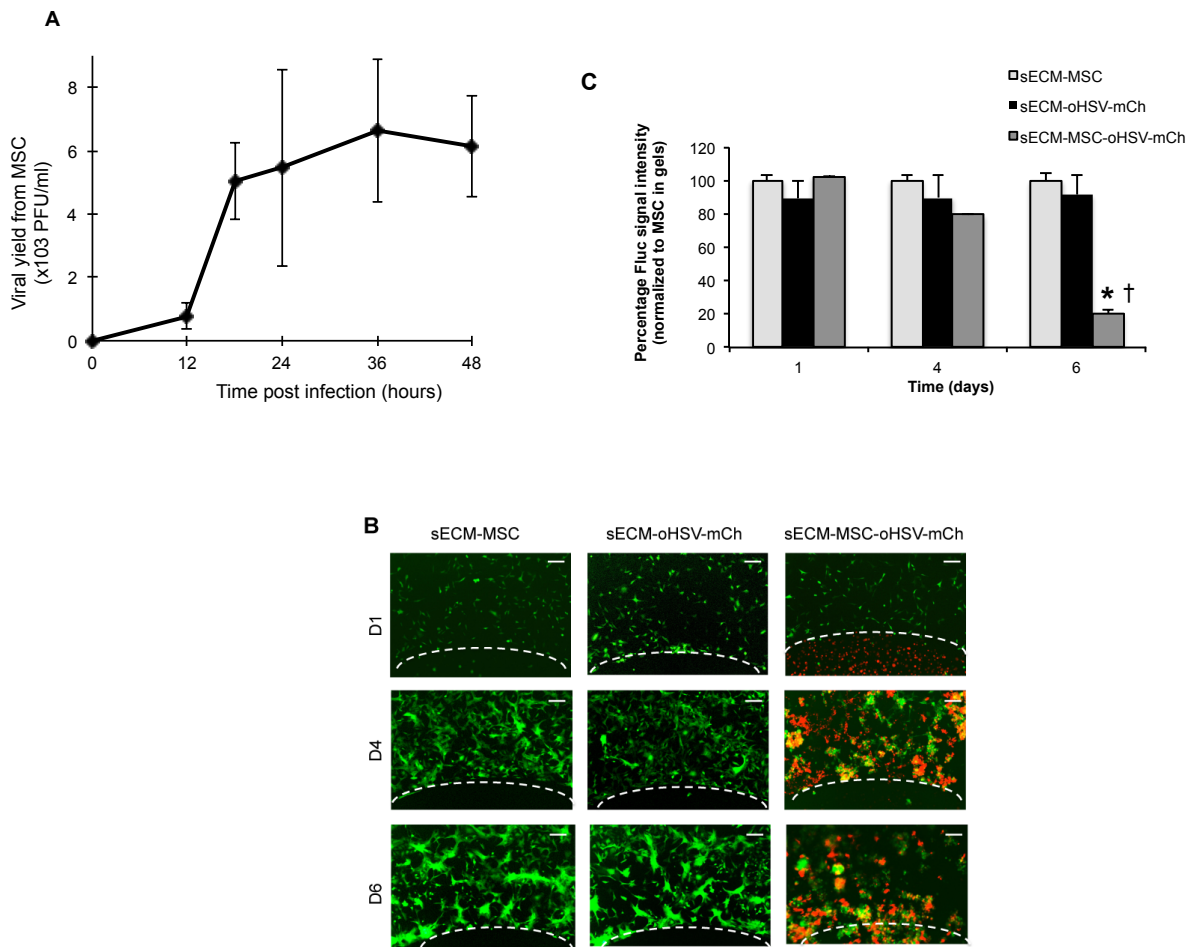
### **3.7 MSC-vermittelter Antransport und Freisetzung von oHSV in einem GBM-Tumorresektionsmodell**

Shah et al. konnten in der Vergangenheit zeigen, dass sECM-Einbettung von therapeutischen Stammzellen zu einer besseren Zellretention und einem verbesserten Zellüberleben in der GBM-Tumorresektionshöhle führt, was wiederum in einer erhöhten therapeutischen Wirksamkeit resultiert [14]. Basierend auf diesen Studienergebnissen, untersuchten wir zunächst die oHSV-mCh-Amplifizierung und Freisetzung von sECM-umhüllten MSC. In vitro produzierten sECM-MSC-oHSV-mCh kontinuierlich oHSV-mCh während der ersten 24 Stunden nach Infektion, wobei die Messkurve der akkumulierten Virusproduktion nach 36 Stunden auf ein Plateau abflachte (Abb. 12A). Desweiteren ergaben Mischkulturexperimente von sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh mit U87-GFI GBM-Zellen eine statistisch signifikante Reduktion des GBM-Zellüberlebens verglichen mit freien oHSV-mCh Viruspartikeln, die in sECM eingebettet wurden, sowie sECM-umhüllten MSC (Abb. 12, B und C). [1]

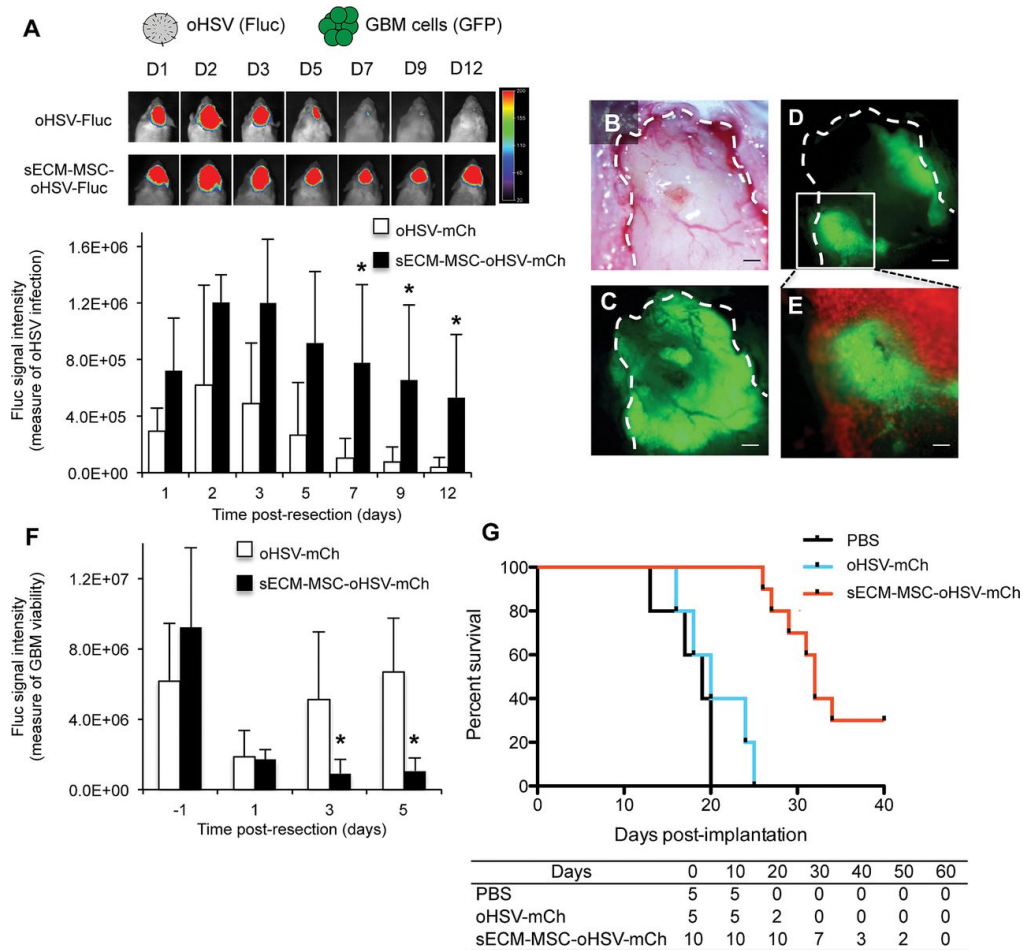
Als nächstes sollte untersucht werden, ob, verglichen mit direkter Injektion von konzentriertem oHSV in die Tumorresektionshöhle, der Antransport von oHSV durch sECM-umhüllte MSC-Trägervehikel in einem GBM-Tumorresektionsmodell zu einer verlängerten Viruspersistenz und onkolytischen Aktivität führt. Dazu wurde eine auf G47 $\Delta$ -basierende oHSV-Variante benutzt, die als Transgen cDNA für das Firefly-Luciferase-Protein unter Cytomegalievirus-immediate-early-Promotor im Virusgenom enthält (oHSV-Fluc) [28]. Die Verwendung dieser oHSV-Variante ermöglichte es, intratumorale oHSV-Virusaktivität, durch Messung des von infizierten Zellen exprimierten Fluc-Proteins, mittels Biolumineszenzbildgebung nicht-invasiv in Echtzeit zu verfolgen. sECM-umhüllte MSC geladen mit oHSV-Fluc (MSC-oHSV-Fluc,  $3 \times 10^6$  PFU) führten dabei zu statistisch signifikant erhöhter Fluc-Expimierung verglichen mit konventioneller, direkter Injektion von konzentriertem oHSV-Fluc ( $1 \times 10^8$  PFU) in der Tumorresektionshöhle von ausgewachsenen Gli36vIII-GFP-Tumoren (Abb. 13A). Diese Ergebnisse zeigen, dass sECM-umhüllte oHSV-geladene MSC eine verlängerte Viruspersistenz in der Tumorresektionshöhle ermöglichen als konventionelle oHSV-Injektionen, wobei diese verstärkte Viruspersistenz weit über die Lebensdauer der MSC-Transportvehikel hinausreicht und somit der verbesserten Infizierung der GBM-Tumorreste geschuldet sein sollte. [1]

Um die therapeutische Wirkung von sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh mit direkten Injektionen von oHSV-mCh in die Tumorresektionshöhle zu vergleichen, wurde an Mäusen mit ausgewachsenen Gli36vIII-GFI-Tumoren (Abb. 13, B und C) eine subtotale GBM-Tumorresektion durchgeführt (Abb. 13D) woraufhin diese mit sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh (Abb. 13E) oder konzentriertem oHSV-mCh behandelt wurden. In Mäusen, die mit

**(Fortsetzung Seite 30)**



**Abbildung 12: Virusamplifikation und onkolytische Wirkung von sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh in vitro.** MSC wurden mit oHSV-mCh infiziert, in sECM eingebettet und Virusfreisetzung im Verlauf gemessen. **A)** Kurvendiagramm der Virusfreisetzung aus sECM-MSC-oHSV-mCh in vitro. **B- C)** sECM-umhüllte MSC, MSC-oHSV-mCh oder oHSV-mCh in sECM-Suspension wurden in Mischkultur mit U87-GFI Tumorzellen gebracht und Fluc-Signalintensität als Maß des Tumorzellüberlebens im Verlauf bestimmt. Microphotographien von U87-GFI an Tag 1, 4 und 6 (**B**). Daten  $\pm$  SD, \* $P < 0.01$  sECM-MSC-oHSV-mCh versus sECM-MSC, † $P < 0.01$  sECM-MSC-oHSV-mCh versus sECM-oHSV-mCh (zweiseitiger t-Test). Sämtliche Experimente wurden in Triplets durchgeführt. **[1]**



**Abbildung 13: Therapeutische Wirkung von mesenchymalen Stammzellen (MSC), die mit onkolytischem Herpes Simplex Virus (oHSV) beladen und nach Einbettung in synthetische extrazelluläre Matrix (sECM) in die Resektionshöhle eines klinisch relevanten Glioblastoma-Multiforme-Resektionsmodell transplantiert wurden.** Mäuse mit etablierten intrakraniellen Gli36vIII-GFP Tumoren wurden reseziert und mit intracavitären Injektionen von purifiziertem oHSV-Firefly-Luciferase (Fluc) oder sECM-umhüllten MSC-oHSV-Fluc behandelt. **A**) Dargestellt im Diagramm ist die Fluc-Aktivität in den zwei Vergleichsgruppen als ein Maß für in vivo Virusaktivität von oHSV-Fluc. Darüber repräsentative fusionierte Biolumineszenzaufnahmen von je einer Maus jeder Gruppe ( $13.2 \pm 1.82$  Mal höhere Fluc-Expression in der MSC-oHSV-Fluc Gruppe verglichen mit der purifizierten oHSV-Fluc Gruppe). **B**) Lichtmikroskopische Aufnahmen des Gehirns nach Craniotomie. Weiß gestrichelte Linie als Begrenzung des kranialen Fensters. **C**) und **D**) Fluoreszenzmikroskopiebilder zeigen den GFP-positiven intracerebralen Tumor vor (**C**) und nach (**D**) Resektion. **E**) Fluoreszenzaufnahme mit sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCherry (MSC-oHSV-mCh) (**rot**) nach Injektion in unmittelbarer Nähe zu GFP-positiven Tumorresten. **F**) Diagramm mit Fluc-Signal als Maß für Gli36vIII-GFI Tumolvolumen nach intracavitären Injektionen von purifiziertem oHSV-mCh oder sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh. **G**) Etablierte intrakranielle Gli36vIII-GFI Tumoren wurden reseziert und mit intracavitären Injektionen von PBS, purifiziertem oHSV-mCh oder sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh behandelt. Kaplan-Meier-Kurve der behandelten Mäuse.  $P < 0.001$  (Wilcoxon test), sECM-MSC-oHSV-mCh vs oHSV-mCh und vs PBS. Daten + SD.  $*P < 0.05$  vs Kontrollen (zweiseitiger *t*-Test). Skalengröße: 400  $\mu\text{m}$ . [1]

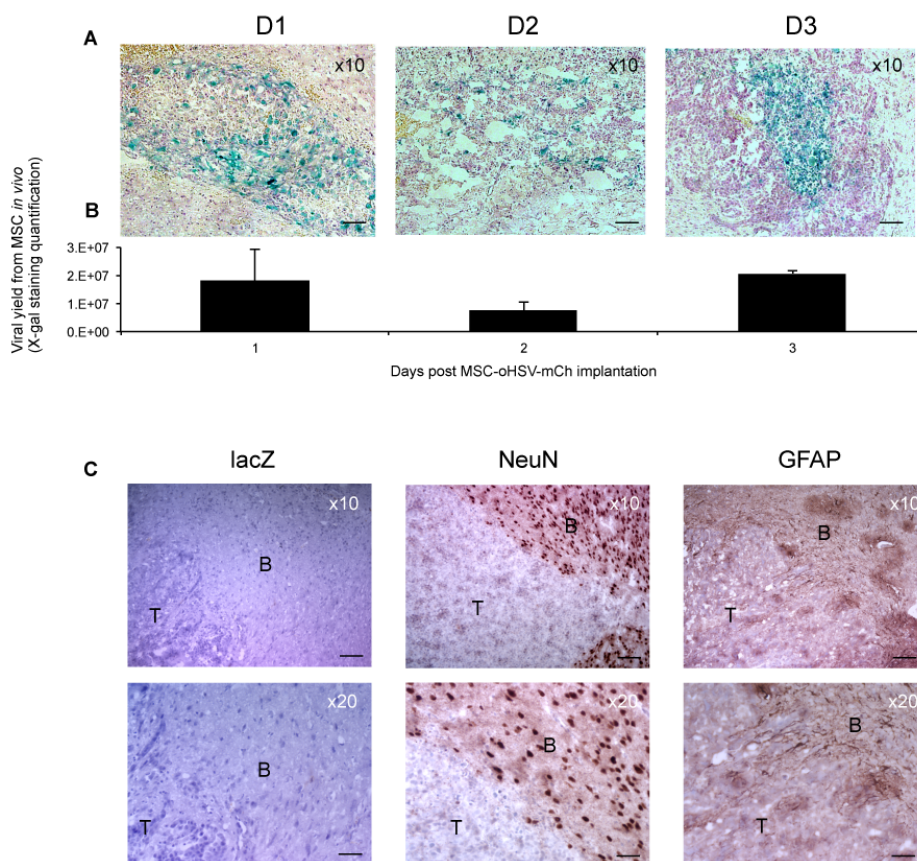
sECM-MSC-oHSV-mCh behandelt wurden, konnte eine statistisch signifikante Unterdrückung des Tumorwachstums und verlängertes Überleben im Vergleich zur Behandlung mit direkten oHSV-mCh-Injektionen beobachtet werden (MSC-oHSV-mCh-Gruppe: 32 Tage; PBS-Gruppe: 19 Tage; oHSV-mCh-Gruppe: 20 Tage) (Abb. 13, F und G). Mittels X-gal-Färbung untersuchten wir außerdem die Virusproduktion von tumortransplantierten MSC-oHSV-mCh anhand im Verlauf gesammelter Hirnschnittbilder. Von MSC freigesetzte oHSV-mCh-Partikel infizierten benachbarte GBM-Tumorzellen, was wiederum oHSV-Ausbreitung innerhalb des Tumorrestes zur Folge hatte (Abb. 14, A und B). Außerdem konnte in Hirnschnittbildern von mit MSC-oHSV-mCh behandelten Mäusen innerhalb der untersuchten 12 Tage nach Therapie keine Virusinfektion von normalem, umgebendem Hirnparenchym (Neuronen und Astrozyten) nachgewiesen werden, was die Sicherheit dieser onkolytischen Therapie abermals bestätigte (Abb. 14C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Therapie mit sECM-umhüllten MSC-oHSV eine bessere therapeutische Wirksamkeit als direkte Injektionen von oHSV-mCh in GBM-Tumorresektionsmodellen zeigt, und dass dies unter anderem an der verlängerten Persistenz und onkolytischen Aktivität in GBM-Tumorresten von derart eingebrachtem oHSV liegt. [1]

### **3.8 MSC-vermittelter Antransport und Freisetzung einer aufgerüsteten oHSV-Variante**

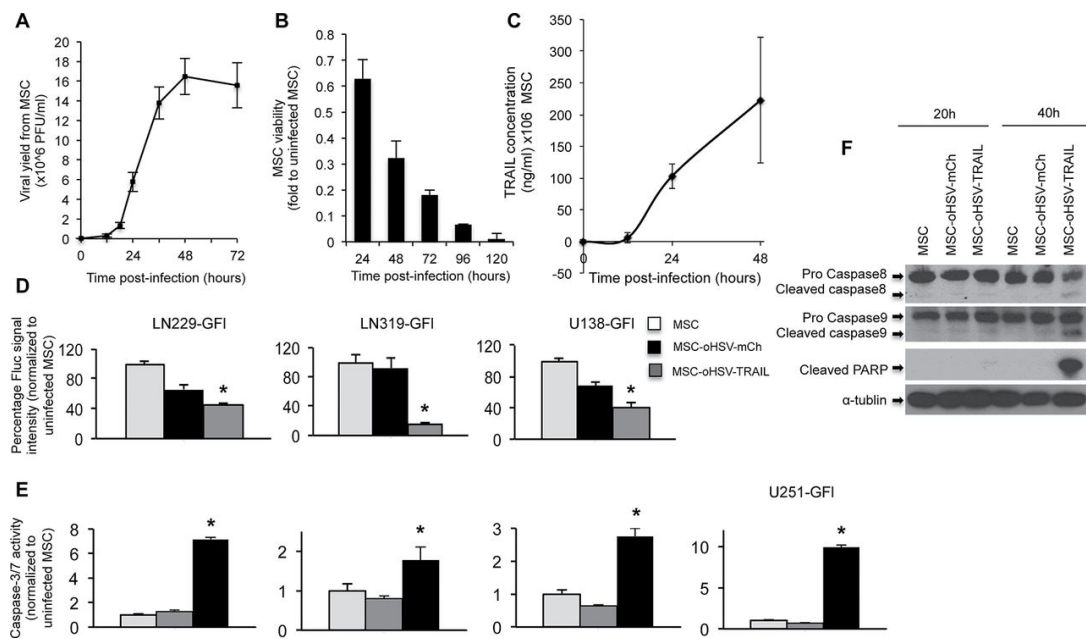
Shah et al. ist es kürzlich gelungen, eine sog. „aufgerüstete“ Variante von G47 $\Delta$ -basiertem oHSV herzustellen, in deren Genom cDNA für sekretierbares TRAIL (sTRAIL) unter Kontrolle des IE4/5-immediate-early-Promoters von HSV inkorporiert ist (oHSV-TRAIL). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl oHSV-resistente als auch TRAIL-resistente GBM-Tumorzelllinien sehr gut auf die Behandlung mit oHSV-TRAIL ansprechen [28]. Um die oHSV-Therapie mittels MSC-Transportvehikeln auf ein breites Spektrum von GBM-Tumorzelllinien anwenden zu können, wurde als nächstes untersucht, ob oHSV-TRAIL-geladene MSC für die Therapie von sowohl oHSV- als auch TRAIL-resistenten GBM-Tumorzelllinien geeignet sind. Freisetzung von oHSV-TRAIL aus infizierten MSC zeigte eine exponentielle Amplifikation während der ersten 36 Stunden nach Infektion und erreichte ein Plateau nach 48 Stunden (Abb. 15A). Ähnlich wie bei MSC-oHSV-mCh wurde auch bei MSC-oHSV-TRAIL eine Abnahme der Zellüberlebensfähigkeit über einen Zeitraum von 120 Stunden beobachtet (Abb. 15B). Serielle ELISA-Messungen der sTRAIL-Konzentration in Kulturmedium bestätigten, dass MSC-oHSV-TRAIL zu kontinuierlicher Sekretion von sTRAIL in der Lage sind (Abb. 15C). Verglichen mit MSC-oHSV-mCh und MSC-TRAIL, führten Mischkulturversuche mit MSC-oHSV-TRAIL zum Zelltod bei GBM-Zelllinien, die sowohl

**(Fortsetzung Seite 33)**





**Abbildung 14: Virusproduktion und Sicherheit von MSC-oHSV-mCh *in vivo*.** (A-C) Mäuse mit Gli36vIII-GFI-Tumoren wurden mit MSC-oHSV-mCh behandelt und Virusproduktion von MSC-oHSV-mCh wurde mittels LacZ-Färbungen im Verlauf gemessen. **A)** Microphotographien mit X-gal-Anfärbung der Tumormasse zu verschiedenen Zeitpunkten. **B)** Quantifizierung der X-gal-Anfärbung an Tag 1, 2 und 3 als Maß für Virusproduktion *in vivo*. Daten + SD. Dargestellt sind Mittelwert von zwei Replikaten innerhalb eines Experiments. **(C)** Hirnschnittbilder von an Tag 12 geopfertten Mäusen wurden mit LacZ (als Maß für oHSV-Infektion), NeuN (neuronaler Marker) oder GFAP (astrozytärer Marker) angefärbt. Das auf diese Weise abgrenzbare physiologische Hirnparenchym war nicht von oHSV-Infektion betroffen. Skalengröße: **(A)** 100  $\mu$ m, **(C)** 100  $\mu$ m (oben) bzw. 50  $\mu$ m (unten). T: Tumor. B: Gehirn. **[1]**

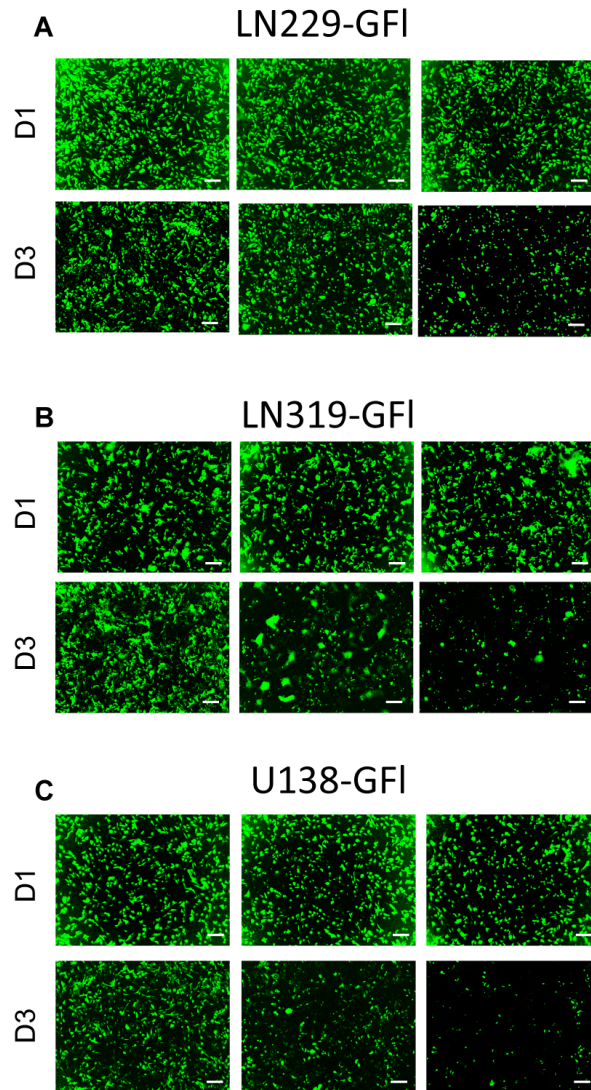


**Abbildung 15: Therapeutische Wirkung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) geladen mit einer onkolytischen, sTRAIL-kodierenden Herpes-Simplex-Virus-Variante in oHSV- und TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien in vitro.** MSC wurden mit oHSV-TRAIL infiziert und Virusamplifizierung sowie MSC-Überleben im Verlauf beobachtet. **A)** Kurvendiagramm zeigt Virusamplifizierung von MSC-oHSV-TRAIL im Verlauf. **B)** Zellüberleben von MSC-oHSV-TRAIL dargestellt als Balkendiagramm. **C)** ELISA-Ergebnisse zeigen sTRAIL-Sekretion von MSC-oHSV-TRAIL im Verlauf. **D)** und **E)** Mischkultur von MSC, MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL mit verschiedenen voll- oder semi-TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien (LN229, LN319, U138, U251), die jeweils das Fusionsmarkerproteinen GFP-Fluc exprimieren. Balkendiagramme mit Tumorzell-Überleben an Tag 3 (**D**) sowie Caspase-3/7-Aktivierung in GBM-Zelllinien an Tag 2 (**E**) zeigen erhöhte Antitumoraktivität in der MSC-oHSV-TRAIL-Gruppe. **F)** Western-Blot-Analyse von TRAIL-resistenten LN229-Zelllysaten, die nach 20 oder 40 Stunden Inkubation mit MSC, MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL gesammelt wurden. Daten  $\pm$  SD. \*P < 0.05 vs Kontrollen (zweiseitiger t-Test). **[1]**

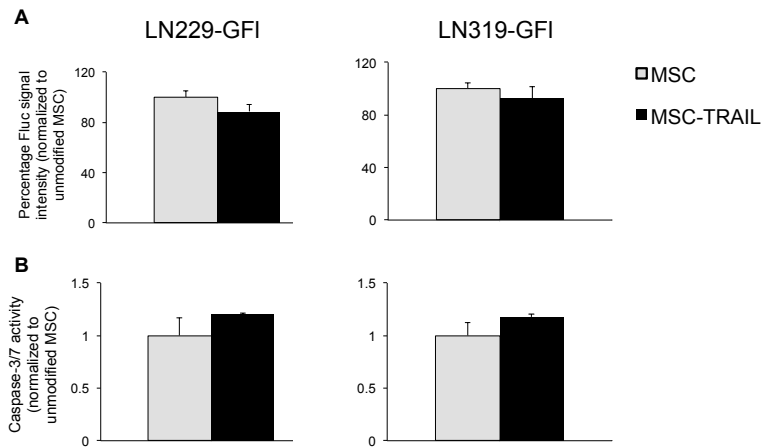


unempfindlich auf TRAIL reagieren als auch stärkere Resistenzen gegen oHSV-vermittelte Onkolyse besitzen [28] (Abb. 15D; Abb. 16; A-C, Abb. 17A). Dabei wurde der über MSC-oHSV-TRAIL ausgelöste GBM-Zelltod über Aktivierung von Caspase-3/7 vermittelt (Abb. 15E; Abb. 17B). Western-Blot-Analyse des Proteinlysats von LN229 GBM-Zellen, das aus Transwell-Inserts im Rahmen von Mischkulturversuchen gewonnen wurde, zeigte eine wesentlich stärkere Erhöhung in gespaltener Caspase-8, gespaltener Caspase-9 und gespaltenem PARP in der MSC-oHSV-TRAIL Gruppe verglichen mit den Kontrollen (Abb. 14F). Diese Ergebnisse zeigen, dass MSC, geladen mit einer aufgerüsteten oHSV-Variante, die sekretierbares TRAIL kodiert, in der Lage sind, oHSV-TRAIL effektiv zu amplifizieren und außerdem Apoptose-induzierten Zelltod in ansonsten sowohl oHSV- als auch TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien auslösen können. [1]

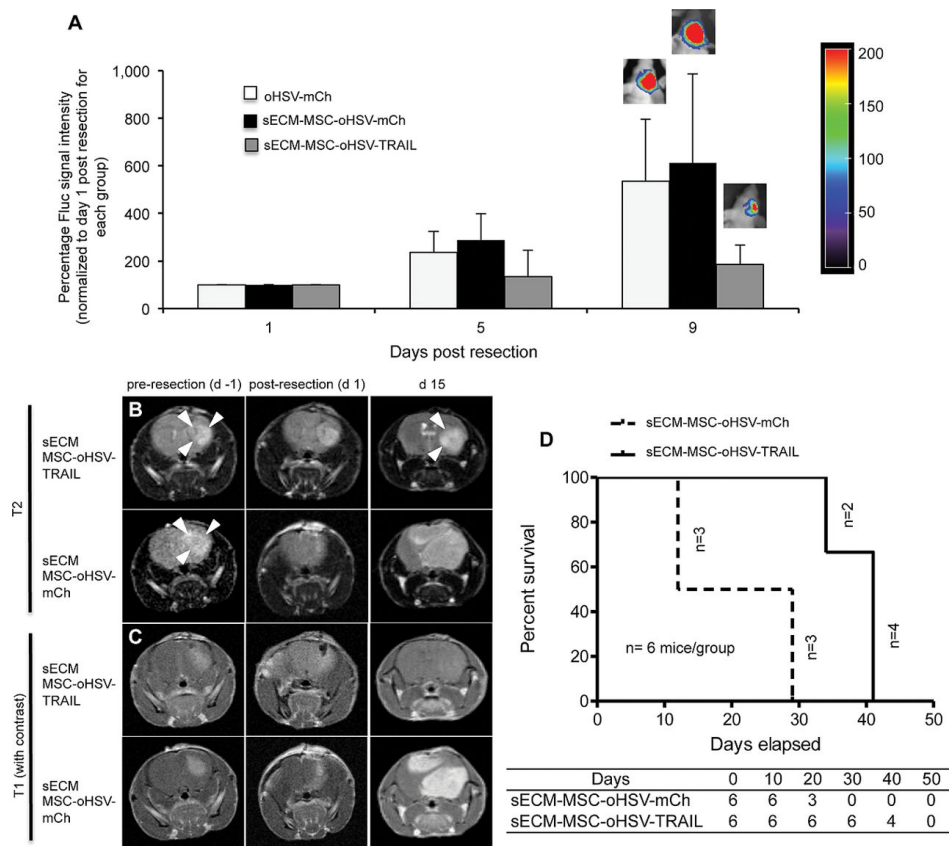
Um die Wirksamkeit von MSC-oHSV-TRAIL in vivo unter Verwendung eines klinisch relevanten GBM-Tumorresektionsmodells zu testen, wurden Mäuse mit ausgewachsenen LN229-GFI-Tumoren einer GBM-Tumorresektionsbehandlung unterzogen, gefolgt von intracavitären Injektionen von jeweils sECM-umhüllten MSC, MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL. Im Gegensatz zu den Kontrollen, konnte in der sECM-MSC-oHSV-TRAIL Behandlungsgruppe eine Unterdrückung der Tumorrezidivbildung beobachtet werden (Abb. 18A). T2-gewichtete MR-Aufnahmen zeigten am Tag nach der Tumorresektion lokal eine Signalstärkeerhöhung im Bereich der sECM-MSC-oHSV-TRAIL-Injektion, die für ca. 2 Wochen anhielt (Abb. 18B). T1-gewichtete MR-Aufnahmen mit Kontrastmittel bestätigten im Verlauf die andauernde Tumorregression in der sECM-MSC-TRAIL-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 18C). Entsprechend war in dieser Gruppe eine statistisch signifikante Erhöhung des mittleren Maus-Überlebens (41 Tage) verglichen mit der sECM-MSC-oHSV-mCh-Gruppe zu beobachten (Abb. 18D). Diese Ergebnisse zeigen, dass MSC als effektive zelluläre Trägervehikel für den Antransport von, mit proapoptotischen Molekülen aufgerüstete, oHSV-Varianten dienen können und, nach Einbettung in sECM, in der Lage sind, in einem klinisch relevanten GBM-Tumorresektionsmodell resistente GBM-Tumoren wirkungsvoll zu behandeln, was sich in einem statistisch signifikanten Überlebensvorteil niederschlägt. [1] (Fortsetzung Seite 37)



**Abbildung 16: Wirkung von MSC-oHSV-TRAIL in sowohl oHSV- als auch TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien in vitro.** Mischkulturversuche von MSC (links), MSC-oHSV-mCh (mitte) oder MSC-oHSV-TRAIL (rechts) mit TRAIL-resistenten LN229-GFI (**A**), LN319-GFI (**B**) und U138-GFI (**C**). Microphotographien zeigen Tumorzellüberleben (GFP-positive Zellen) an Tag 1 und 3. Experiment in Triplets durchgeführt. Skalengröße: 200  $\mu$ m. [1]



**Abbildung 17: Wirkung von MSC-TRAIL in TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien *in vitro*.** Mischkulturversuche von MSC oder MSC-TRAIL mit den TRAIL-resistenten GBM-Zelllinien LN229 und LN319, die zur Expression von GFP-Fluc modifiziert wurden. Balkendiagramme, die Tumorzellüberleben an Tag 3 (**A**) sowie Caspase-3/7-Aktivierung in GBM-Zellen an Tag 2 (**B**) darstellen, zeigen, dass MSC-TRAIL nicht in der Lage sind, Caspase-vermittelten Tumorzelltod in den entsprechenden GBM-Zelllinien auszulösen. Daten + SD. Experiment in Triplets durchgeführt. **[1]**



**Abbildung 18: Therapeutische Wirkung von mesenchymalen Stammzellen (MSC), die mit einer sTRAIL-aufgerüsteten Variante von onkolytischen Herpes Simplex Virus (oHSV-TRAIL) beladen und in synthetische Extrazellulärmatrix (sECM) eingebettet wurden, bei in vivo Glioblastomtumoren (GBM), die sowohl gegen oHSV als auch sTRAIL Resistenzen besitzen. A-D) Mäuse mit etablierten LN229-GFI (green-fluorescent-protein firefly-luciferase) GBM-Tumoren wurden einer chirurgischen Tumorresektion unterzogen und daraufhin mit intracavitären Injektion von sECM-umhüllten MSC, MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL behandelt. A) Balkendiagramm zeigt Biolumineszenz-Signalstärke im zeitlichen Verlauf und veranschaulicht verstärkte Unterdrückung des Tumorwachstums in der sECM-MSC-oHSV-TRAIL Gruppe verglichen mit sECM-MSC und sECM-MSC-oHSV-mCh Gruppen. Außerdem dargestellt sind repräsentative, überlagerte Biolumineszenzaufnahmen jeweils einer Maus der entsprechenden Gruppe an Tag 9. Daten + SD. B) und C) Repräsentative serielle MR-Aufnahmen zeigen Tumorregression nach sECM-MSC-oHSV-TRAIL Behandlung (1. und 3. Reihe) sowie Tumorrezidivbildung nach sECM-MSC-oHSV-mCh-Behandlung (2. und 4. Reihe). D) Kaplan-Meier-Kurven von Mäusen, die mit sECM-umhüllten MSC-oHSV-mCh oder MSC-oHSV-TRAIL behandelt wurden (n=6 Mäuse pro Gruppe).  $P < 0.001$  ( $\chi^2$ -Kontingenztest), sECM-MSC-oHSV-TRAIL versus sECM-MSC-oHSV-mCh. [1]**

#### **4. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Ausarbeitung eines neuartigen Tumorresektionsmodells sowie der Entwicklung neuer GBM-Lokaltherapien mittels zellulärer Transportvehikel für onkolytischen Herpes Simplex Virus, die in einem klinisch relevanten Tumorresektionsszenario getestet wurden.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es mittels molekularer Bildgebungstechniken möglich ist, GBM-Tumoren in Mäusen hochpräzise zu reseziieren und die verschiedenen Stufen der klinisch beobachteten Stadien bestehend aus GBM-Progression, -Resektion und Rezidivbildung in Echtzeit auf nicht-invasive Weise im Tiermodell genau nachzuvollziehen. Intraoperative Fluoreszenzbildgebung erlaubte es dabei, den GBM-Tumor exakt zu lokalisieren sowie das Ausmaß und die Güte der anschließenden Resektion zu quantifizieren. Multimodale, nicht-invasive Bildgebungsverfahren sowie post-mortale Immunhistochemieanalysen erlaubten es, die Tumorumfangentwicklung nach Resektion nachzuverfolgen und zeigten Unterschiede im Wachstumsverhalten von resezierten und nicht-resezierten GBM-Tumoren. [2]

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich MSC gut als zelluläre Transportvehikel für verschiedene oHSV-Varianten eignen, eine ausreichend lange Überlebensdauer besitzen und in der Lage sind, Virus effektiv zu amplifizieren sowie in vivo eine Dynamik der ausgedehnten Tumordestruktion in Gang setzen können, die mittels mehrfarbiger, hochauflösender Fluoreszenzanalysen detailliert nachvollzogen werden konnte. Außerdem zeigten sECM-umhüllte MSC-oHSV in GBM-Resektionsmodellen, aufgrund prolongierter Virusaktivität im Vergleich zu direkter Injektion hochkonzentrierter, freier Viruspartikel, eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit und verlängertes Maus-Überleben. Schließlich konnte gezeigt werden, dass es mithilfe dieser Techniken möglich ist, in einem Szenario, das die klinische Realität eines Tumorresektionsszenarios sowie multiresistenter GBM-Tumoren nachahmt, mittels aufgerüsteter oHSV-Varianten GBM-Tumoren wirksam zu therapieren. [1]

##### **4.1 GBM-Tumorresektionsmodell als translationaler Forschungsansatz**

Die Herausforderung in der Behandlung der als äußerst aggressiv und invasiv geltenden GBM-Tumoren wird wohl am besten dadurch veranschaulicht, dass in einer altbekannten klinischen Studie selbst eine Hemisphärektomie es nicht ermöglichte, Langzeit-Überleben von Patienten um mehr als zwei Jahre zu verlängern [50]. Auch wenn die GBM-Tumorresektion durchaus von Nutzen sein kann [6, 51], so ist es nach wie vor umstritten, ob eine derartige Operation tatsächlich auch immer das Langzeit-Überleben bei Patienten verlängert [52-55]. [2]

Trotzdem bleibt die neurochirurgische Tumorresektion ein zentraler Bestandteil des Standardtherapieverfahrens für GBM-Patienten. Jedoch gibt es bis dato quasi kein gängiges GBM-Tiermodell, das diesen chirurgischen Eingriff auf klinisch relevante Art und Weise

inkorporiert; vielmehr werden derzeit neue Therapien meist lediglich an einer einzigen, soliden intrakraniellen Xenotransplantat-Läsion getestet [8, 56]. Dennoch gibt es eine limitierte Anzahl von Studien, die die Entwicklung eines solchen Modells versucht haben [13-15]. Jedoch gelang eine gezielte Tumorsektion in diesen Modellen nicht, da sie sich lediglich an grober Gewebemorphologie unter Weißlicht orientieren konnten. In der vorliegenden Arbeit konnten wir dagegen zeigen, dass dank prä-operativer Fluoreszenzaufnahmen die groben Tumorgrenzen bereits durch die intakte Schädeldecke hindurch abgrenzbar waren und auf diese Weise eine präzise Kraniotomie erlaubten. Darüberhinaus ermöglichte die intraoperative GFP-Fluoreszenzbildgebung während des Eingriffs die exakte Identifizierung von Tumorresten sowie eine hochgenaue Resektion von weit über 90% des GBM-Tumors. Außerdem konnte eine enge Korrelation des 5-ALA- und GFP-Signals während allen Phasen des operativen Eingriffs beobachtet werden. 5-ALA ist dabei eine der am häufigsten eingesetzten fluoreszierenden Markerverbindungen in der Neurochirurgie und mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahrens, ist es nun möglich, diese wichtige neurochirurgische Operationstechnik mit relativ geringem Aufwand in vorklinische Tiermodellstudien zu inkorporieren. Diese Technik gewinnt in Tiermodellstudien mit Kleintieren wie etwa Mäusen noch zusätzliche Relevanz, da Abgrenzung des Tumors und präzise Resektion bei räumlichen Dimensionen auf einer derart kleinen Skala umso herausfordernder und mittels herkömmlicher chirurgischer Methoden meist kaum zu bewerkstelligen sind. [2]

#### **4.2 Möglichkeiten durch Multimodale Bildgebungsverfahren**

Die durch molekulare Bildgebung ermöglichte Quantifizierung und Beobachtung einzelner Zellverbände und Tumorreste in Echtzeit stellt ein fast unverzichtbares Verfahren zur Testung neuartiger GBM-Therapeutika und Überwachung verschiedenster Aspekte der GBM-Tumorprogression bzw. -regredienz in kleinen Tiermodelln dar [45, 57-59]. Post-operative MR- und BL-Bildgebungsverfahren zeigten in dieser Arbeit eine 96- bzw. 92-prozentige GBM-Tumormasseentfernung direkt nach Tumorsektion an. Mittels serieller MR-Bildgebung konnten die entsprechenden Tumorreste dargestellt und außerdem gezeigt werden, dass das Tumolvolumen in den ersten 8 Tagen nach Resektion bereits wieder auf den 50-fachen und zwei Wochen später sogar auf den 200-fachen Wert angestiegen war. BLI-Aufnahmen konnten die MR-Ergebnisse tendenziell bestätigen und ließen die Darstellung multipler Regionen mit potentiellen Tumorresten zu, die 8 Tage postoperativ auf das 10-fache und zwei Wochen später auf das 25-fache an Signalintensität angestiegen waren. Zusätzlich zu der Tatsache, dass MR-Bildgebung als klinisches Standardverfahren in entsprechenden Tierversuchen nicht fehlen sollte, können MR-Aufnahmen zusätzlichen Aufschluss über Tumorstruktur sowie dreidimensionale Ausdehnung des Tumors geben. Wenn derzeit auch nicht von klinischer Relevanz, so ist BLI in vorklinischen Studien doch ein

ideales Verfahren zur schnellen, voll quantifizierbaren Bildgebung und außerdem wesentlich kostengünstiger. Die Kombination dieser beiden Bildgebungstechniken mit hochauflösender Fluoreszenzbildgebung ermöglicht so ein komplementäres multimodales Bildgebungssystem, das in der Lage ist, komplexe bzw. mehrere Fragestellungen auf einmal zu beantworten. Nachdem nun Genauigkeit und Durchführbarkeit dieser Herangehensweise in der vorliegenden Arbeit validiert werden konnten, wäre ein nächstes Ziel, GBM-Tumoren zu resektieren, die tiefer im Hirnparenchym, etwa in der Region der Basalganglien implantiert wurden um eine tiefere, besser von der Oberfläche abgrenzbare Resektionshöhle zu erzeugen, die eine noch realistischere Darstellung der klinischen Gegebenheiten darstellt.

[2]

#### **4.3 MSC als zelluläre Transportvehikel**

Um jene Probleme anzugehen, die in bisherigen klinischen Studien zur oHSV-Therapie von GBM wahrscheinlich dazu beitrugen, dass Ergebnisse hinter den Erwartungen zurück blieben, entwickelten wir eine zellbasierte Strategie zum Transport von oHSV, die speziell auf die Herausforderungen eines klinischen GBM-Tumorresektionsszenarios zugeschnitten ist. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass sowohl neuronale (NSC) als auch mesenchymale Stammzellen (MSC), im Sinne einer zellbasierten GBM-Therapie, in der Lage sind, sich in der Nähe von intrakraniellen neoplastischen Läsionen anzureichern, um dort gezielt therapeutische Proteine zu sezernieren und so hocheffizient GBM-Tumoren bekämpfen können [43, 60, 61]. Die Nutzung von MSC als Transportvehikel hat gegenüber NSC den entscheidenden Vorteil, dass sie einfach aus Patientenblut isoliert und in Zellkultur gehalten werden können und außerdem über einen relativ aktiven Metabolismus verfügen [43, 62]. Mithilfe neuartiger, diagnostischer oHSV-Varianten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MSC als zelluläre Trägervehikel einen effizienten Antransport von oHSV ermöglichen. Dabei zeigten die vorgestellten Ergebnisse, dass der maßgebliche Anteil an Tumorinfektion und Virusverbreitung in den ersten 48 Stunden nach MSC-oHSV-Implantation stattfand, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass es sich dabei um ein kritisches, wohlmöglich therapieentscheidendes Zeitfenster handelt. Die Behandlung mit MSC-oHSV war anderen Therapievarianten dabei eindeutig überlegen. Dies könnte begründet sein in der ganz unterschiedlichen Dynamik von Virusproduktion und Ausschüttung in situ, besserer Ausbreitung und vor allem Schutz vor Neutralisation und Auswaschung nach Injektion des Therapeutikums in die Resektionshöhle. [1]

#### **4.4 Intracavitäre Lokaltherapieverfahren mittels MSC-oHSV**

Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Einbettung von Stammzellen in resorbierbare sECM ein vielversprechender Ansatz zur Anwendung therapeutischer Stammzellen in der GBM-Therapie nach Tumorresektion darstellt [14]. Für die Mehrzahl der in vivo Studien in

der vorliegenden Arbeit wurde als GBM-Zelllinie Gli36vIII-GFI verwendet, welche einerseits ein wesentlich aggressiveres Wachstums als fast alle anderen bekannten GBM-Zelllinien aufweist, gleichzeitig aber eine relativ geringe Virusamplifikation als z.B. U87-GFI gewährleistet [28]. Dennoch gelang es, Gli36vIII-GFI in vivo mittels sECM-umhüllten MSC-oHSV zuverlässig und erfolgreich zu behandeln. Mit Hilfe einer neuartigen, diagnostischen oHSV-Variante (oHSV-Fluc) und in Echtzeit durchführbarer Biolumineszenzbildgebungsverfahren um Firefly-Luciferase-Aktivität nachzuverfolgen, konnte gezeigt werden, dass sECM-umhüllte, oHSV-geladene MSC nach Transplantation in die Tumorsektionshöhle zu einer wesentlich länger andauernden Virusaktivität führen, als die konventionelle Injektion von konzentrierten, freien Viruspartikeln. Folge dieser durch sECM-umhüllte MSC vermittelten Viruspersistenz war eine Tumoregredienz bzw. verlangsamtes Tumorstadium und letztlich eine signifikante Überlebenszeitverlängerung der behandelten Tiere verglichen mit der konventionellen oHSV-Behandlungsmethode. [1]

#### **4.5 Therapie resistenter GBM-Tumoren**

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die oHSV-Sensibilität unter verschiedenen GBM-Zelllinien variiert und einige wenige Zelllinien sogar nahezu resistent gegenüber oHSV-vermittelter Onkolyse zu sein scheinen [28]. Dies legt die Vermutung nahe, dass Zellpopulationen von klinischen GBM-Tumoren ein sehr heterogenes Ansprechen auf oHSV zeigen könnten. Dementsprechend wichtig ist es, oHSV-Therapiestrategien zu entwickeln, die solch ein breites Spektrum an unterschiedlichen oHSV-Ansprechraten abdecken. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob sich MSC als Transportvehikel für oHSV-TRAIL nutzen lassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass MSC in der Lage sind, oHSV-TRAIL zu amplifizieren und freizusetzen, wobei sie gleichzeitig, über Sezernierung von sTRAIL, Caspase-vermittelte Apoptose in GBM-Zelllinien auslösen, die ansonsten nicht auf oHSV-vermittelte Onkolyse ansprechen und ebenso ausgeprägte TRAIL-Resistenz aufweisen. [1]

#### **4.6 Limitationen der Studie und zukünftige Forschungsziele**

Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit sind in Ihrer Aussagekraft jedoch auch limitiert. Die von uns verwendeten und entwickelten Modelle basieren nach wie vor auf konventionellen GBM-Zelllinien, die sowohl phänotypisch als auch genotypisch nicht unbedingt die tatsächliche Beschaffenheit von tatsächlichen GBM-Tumoren wiedergeben [63]. Zukünftige Arbeiten sollten untersuchen, ob oHSV-geladene MSC ihre therapeutische Wirkung auch in solchen Tiermodellen behalten, die auf sog. tumorinitiierenden GBM-Zellen, die direkt aus Patientenmaterial abgeleitet wurden, basieren und das klinische Bild der Erkrankung samt disseminierter Tumordinvasion besser widerspiegeln [64]. Auch wenn in bisherigen Studien keine Immunogenität von transplantierten MSC nachgewiesen werden konnte [65], so wäre



es doch ideal, entweder autologe MSC für die zukünftige Therapie von Patienten zu nutzen oder aber zu untersuchen, ob sich auch induziert-pluripotente Stammzellen als Transportvehikel für die oHSV-Therapie nutzen lassen [66]. Ein vorstellbarer Prozess wäre, dass in Zukunft, nach neurochirurgischer Entfernung der Haupttumormasse, patienteneigene reprogrammierte Zellen bzw. MSC mit verschiedenen oHSV-Varianten, die an das jeweilige Profil des Tumors angepasst sind, beladen werden und nach Einbettung in sECM in die Tumorsektionshöhle transplantiert werden. **[1]**

Wie bereits erwähnt, war es ein grundlegendes Anliegen dieser Arbeit und Voraussetzung für die darauf aufbauenden Studien, ein klinisch relevantes Tumorsektionsmodell samt zugehörigen multimodalen Bildgebungsverfahren für Tiermodelle zu entwickeln. Nachdem nun Genauigkeit und Durchführbarkeit dieser Herangehensweise in der vorliegenden Arbeit validiert werden konnten, wäre ein nächstes Ziel, GBM-Tumoren zu reseziern, die tiefer im Hirnparenchym, etwa in der Region der Basalganglien implantiert wurden um eine tiefere, besser von der Oberfläche abgegrenzte Resektionshöhle zu erzeugen, die eine noch realistischere Darstellung der klinischen Gegebenheiten darstellt. **[2]**

Zur Entwicklung des verwendeten Tumorsektionsmodells nutzten wir mit U87-GFP-Fluc eine humane GBM-Zelllinie, die die Bildung eines soliden und relativ einfach resezierbaren Tumors zuließ. In diesem Modell konnten wir beobachten, dass rezidivierende U87-GFP-Fluc-Tumoren eine höhere Wachstumsrate und entsprechend stärkere Anfärbung durch Ki67 zeigten. Auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus von verstärkten Wachstumsraten in rezidivierenden GBM-Tumoren unklar ist, so könnte die Fensterung der Schädeldecke natürlich einen Einfluss gehabt haben. Daher wäre es sinnvoll, in einer nächsten Studie Wachstumsraten von resezierten und nicht-resezierten GBM-Tumoren zu untersuchen, bei der in der entsprechenden Kontrollgruppe ebenfalls eine kraniale Fensterung durchgeführt wird. Außerdem wäre es vorstellbar, neue MR- und PET-Bildgebungstechniken in zukünftige Studien zu integrieren, die es erlauben, die Tumormasse genauer abzugrenzen und mittels Visualisierung verschiedener Parameter wie Tumormetabolismus, Gewebedurchblutung und Hypoxiezonen sowie Medikamentenverteilung mehr Einsicht in die molekulare Signatur des entsprechenden Tumors zu erhalten [67]. Solcherlei Studien könnten die Translation der Ergebnisse aus GBM-Tumorsektions-Tiermodellstudien in die klinische Realität erheblich erleichtern. **[2]**

Zusammenfassend demonstrieren die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse die Entwicklung präklinischer GBM-Tumorsektionsmodelle unter Verwendung optischer sowie MR-tomografischer Verfahren mit der Möglichkeit vielfältige Parameter vor, während und nach dem operativen Eingriff zu kontrollieren. Auf dieser Grundlage können nun viel

genauere Studien zur Untersuchung neuer Therapeutika bzw. Technologien durchgeführt werden, die eine wesentlich einfachere Translation präklinischer Forschungsergebnisse in die Klinik und somit die Entwicklung neuer Therapieverfahren für GBM-Patienten ermöglichen. [2]

Außerdem demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse die Durchführbarkeit und Effektivität von zellbasierten Transportstrategien für onkolytische Viren in einem klinischen Tumorresektionsszenario, wodurch Probleme überwunden werden können, die durch direkte Injektion von freien Viruspartikeln in die Tumorresektionshöhle in bisherigen klinischen Studien entstanden sein könnten. Entsprechend haben die Ergebnisse dieser Arbeit direkte Konsequenzen für das Design zukünftiger klinischer Studien mit onkolytischen Viren in der GBM-Therapie. Da außerdem verschiedene oHSV-Varianten für die Therapie einer Reihe von anderen Krebsarten in der Erprobung sind [36, 68, 69], haben die hier präsentierten Ergebnisse auch Einfluss auf die Entwicklung zellbasierter Transportvehikelsysteme für oHSV in anderen soliden Tumoren wie Leber-, Prostata-, Ovarial-, Brust- und Lungenkarzinomen. [1]

## 5. Literaturverzeichnis und Anmerkungen

Die vorliegende Arbeit basiert auf und entnimmt umfangreiche Zitate aus den beiden Originalpublikationen [1-2] des Autors, die aus den hier präsentierten Forschungsergebnissen hervorgegangen sind. Der Eigenanteil des Autors an den jeweiligen Publikationen ist unter 5.1 aufgeführt.

1. **Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Tamura K, Hingtgen S, Redjal N, Wakimoto H, Shah K. Stem cells loaded with multimechanistic oncolytic herpes simplex virus variants for brain tumor therapy. J Natl Cancer Inst, 2014. 106(6): p. dju090.**
2. **Hingtgen S, Figueiredo JL, Farrar C, Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Bhere D, Shah K. Real-time multi-modality imaging of glioblastoma tumor resection and recurrence. J Neurooncol, 2013. 111(2): p. 153-61.**
3. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. Expert Opin Investig Drugs, 2009. 18(8): p. 1061-83.
4. Asthagiri AR, Pouratian N, Sherman J, Ahmed G, Shaffrey ME. Advances in brain tumor surgery. Neurol Clin, 2007. 25(4): p. 975-1003, viii-ix.
5. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg, 2001. 95(2): p. 190-8.
6. Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blömer U. Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. Surg Neurol, 2005. 63(2): p. 162-9; discussion 169.

7. Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(18): p. 5288-97.
8. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro*, 2011. 3(3): p. e00063.
9. Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci*, 2008. 7(3): p. 283-9.
10. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 2006. 7(5): p. 392-401.
11. Quant EC, Wen PY. Response assessment in neuro-oncology. *Curr Oncol Rep*, 2011. 13(1): p. 50-6.
12. Mehta AI, Kanaly CW, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH. Monitoring radiographic brain tumor progression. *Toxins (Basel)*, 2011. 3(3): p. 191-200.
13. Akbar U, Jones T, Winestone J, Michael M, Shukla A, Sun Y, Duntsch C. Delivery of temozolomide to the tumor bed via biodegradable gel matrices in a novel model of intracranial glioma with resection. *J Neurooncol*, 2009. 94(2): p. 203-12.
14. Kauer TM, Figueiredo JL, Hingtgen S, Shah K. Encapsulated therapeutic stem cells implanted in the tumor resection cavity induce cell death in gliomas. *Nat Neurosci*, 2012. 15(2): p. 197-204.
15. Bello L, Giussani C, Carrabba G, Pluderi M, Lucini V, Pannacci M, Caronzolo D, Tomei G, Villani R, Scaglione F, Carroll RS, Bikfalvi A. Suppression of malignant glioma recurrence in a newly developed animal model by endogenous inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(11): p. 3539-48.
16. Johnson DR, Chang SM. Recent medical management of glioblastoma. *Adv Exp Med Biol*, 2012. 746: p. 26-40.
17. Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. 12(5): p. 635-42.
18. Barr JG, Grundy PL. The effects of the NICE Technology Appraisal 121 (gliadel and temozolomide) on survival in high-grade glioma. *Br J Neurosurg*, 2012. 26(6): p. 818-22.
19. Aghi M, Martuza RL. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene*, 2005. 24(52): p. 7802-16.
20. 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): p. 101-17.
21. Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 2000. 7(10): p. 867-74.
22. Wakimoto H, Kesari S, Farrell CJ, Curry WT Jr, Zaupa C, Aghi M, Kuroda T, Stemmer-Rachamimov A, Shah K, Liu TC, Jeyaretna DS, Debasitis J, Pruszk J, Martuza RL, Rabkin SD. Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors. *Cancer Res*, 2009. 69(8): p. 3472-81.
23. Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther*, 2002. 9(12): p. 967-78.
24. Hoffmann D, Wildner O. Comparison of herpes simplex virus- and conditionally replicative adenovirus-based vectors for glioblastoma treatment. *Cancer Gene Ther*, 2007. 14(7): p. 627-39.
25. Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(11): p. 6396-401.
26. Epstein AL, Marconi P, Argnani R, Manservigi R. HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2005. 5(5): p. 445-58.

27. Nakamori M, Fu X, Meng F, Jin A, Tao L, Bast RC Jr, Zhang X. Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(7): p. 2727-33.
28. Tamura K, Wakimoto H, Agarwal AS, Rabkin SD, Bhere D, Martuza RL, Kuroda T, Kasmieh R, Shah K. Multimechanistic tumor targeted oncolytic virus overcomes resistance in brain tumors. *Mol Ther*, 2013. 21(1): p. 68-77.
29. Markert JM, Liechty PG, Wang W, Gaston S, Braz E, Karrasch M, Nabors LB, Markiewicz M, Lakeman AD, Palmer CA, Parker JN, Whitley RJ, Gillespie GY. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther*, 2009. 17(1): p. 199-207.
30. Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther*, 2004. 11(22): p. 1648-58.
31. Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther*, 2000. 7(10): p. 859-66.
32. Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther*, 2002. 9(6): p. 398-406.
33. Mohyeldin A, Chiocca EA. Gene and viral therapy for glioblastoma: a review of clinical trials and future directions. *Cancer J*, 2012. 18(1): p. 82-8.
34. Kaur B, Chiocca EA, Cripe TP. Oncolytic HSV-1 virotherapy: clinical experience and opportunities for progress. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012. 13(9): p. 1842-51.
35. García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, Martínez-Quintanilla J, Arriero Mdel M, Lassaletta A, Madero L, Ramírez M. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther*, 2010. 17(7): p. 476-83.
36. Coukos G, Makrigiannakis A, Kang EH, Caparelli D, Benjamin I, Kaiser LR, Rubin SC, Albelda SM, Molnar-Kimber KL. Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 1999. 5(6): p. 1523-37.
37. Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(3): p. 755-66.
38. Raykov Z, Balboni G, Aprahamian M, Rommelaere J. Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *Int J Cancer*, 2004. 109(5): p. 742-9.
39. Jevremovic D, Gulati R, Hennig I, Diaz RM, Cole C, Kleppe L, Cosset FL, Simari RD, Vile RG. Use of blood outgrowth endothelial cells as virus-producing vectors for gene delivery to tumors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(2): p. H494-500.
40. Crittenden M, Gough M, Chester J, Kottke T, Thompson J, Ruchatz A, Clackson T, Cosset FL, Chong H, Diaz RM, Harrington K, Alvarez Vallina L, Vile R. Pharmacologically regulated production of targeted retrovirus from T cells for systemic antitumor gene therapy. *Cancer Res*, 2003. 63(12): p. 3173-80.
41. Tyler MA, Ulasov IV, Sonabend AM, Nandi S, Han Y, Marler S, Roth J, Lesniak MS. Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus in vivo. *Gene Ther*, 2009. 16(2): p. 262-78.
42. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, Bogler O, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res*, 2009. 69(23): p. 8932-40.
43. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, van de Water JA, Mohapatra G, Figueiredo JL, Martuza RL, Weissleder R, Shah K. Assessment of therapeutic

- efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(12): p. 4822-7.
44. Martinez-Quintanilla J, Bhere D, Heidari P, He D, Mahmood U, Shah K. Therapeutic efficacy and fate of bimodal engineered stem cells in malignant brain tumors. *Stem Cells*, 2013. 31(8): p. 1706-14.
  45. Shah K, Hingtgen S, Kasmieh R, Figueiredo JL, Garcia-Garcia E, Martinez-Serrano A, Breakefield X, Weissleder R. Bimodal viral vectors and in vivo imaging reveal the fate of human neural stem cells in experimental glioma model. *J Neurosci*, 2008. 28(17): p. 4406-13.
  46. Cheema TA, Wakimoto H, Fecci PE, Ning J, Kuroda T, Jeyaretna DS, Martuza RL, Rabkin SD. Multifaceted oncolytic virus therapy for glioblastoma in an immunocompetent cancer stem cell model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(29): p. 12006-11.
  47. Kock N, Kasmieh R, Weissleder R, Shah K. Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia*, 2007. 9(5): p. 435-42.
  48. Nieder C, Grosu AL, Molls M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev*, 2000. 26(6): p. 397-409.
  49. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VC. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus*, 2006. 20(4): p. E5.
  50. Hillier WF Jr. Total left cerebral hemispherectomy for malignant glioma. *Neurology*, 1954. 4(9): p. 718-21.
  51. Kanaly CW, Ding D, Mehta AI, Waller AF, Crocker I, Desjardins A, Reardon DA, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH. A novel method for volumetric MRI response assessment of enhancing brain tumors. *PLoS One*, 2011. 6(1): p. e16031.
  52. Nazzaro JM, Neuwelt EA. The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high-grade astrocytomas in adults. *J Neurosurg*, 1990. 73(3): p. 331-44.
  53. Quigley MR, Maroon JC. The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery*, 1991. 29(3): p. 385-8; discussion 388-9.
  54. Hess KR. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurooncol*, 1999. 42(3): p. 227-31.
  55. Metcalfe SE, Grant R. Biopsy versus resection for malignant glioma. *Cochrane Database Syst Rev*, 2001(3): p. CD002034.
  56. Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1551(1): p. M19-27.
  57. Hingtgen SD, Kasmieh R, van de Water J, Weissleder R, Shah K. A novel molecule integrating therapeutic and diagnostic activities reveals multiple aspects of stem cell-based therapy. *Stem Cells*, 2010. 28(4): p. 832-41.
  58. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. 7(7): p. 591-607.
  59. Heckl S, Pipkorn R, Nägele T, Vogel U, Küker W, Voight K. Molecular imaging: Bridging the gap between neuroradiology and neurohistology. *Histol Histopathol*, 2004. 19(2): p. 651-68.
  60. Shah K, Bureau E, Kim DE, Yang K, Tang Y, Weissleder R, Breakefield XO. Glioma therapy and real-time imaging of neural precursor cell migration and tumor regression. *Ann Neurol*, 2005. 57(1): p. 34-41.
  61. Corsten MF, Shah K. Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare. *Lancet Oncol*, 2008. 9(4): p. 376-84.
  62. Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem Cells*, 2003. 21(4): p. 389-404.
  63. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 2006. 9(5): p. 391-403.

64. Wakimoto H, Mohapatra G, Kanai R, Curry WT Jr, Yip S, Nitta M, Patel AP, Barnard ZR, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Martuza RL, Rabkin SD. Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol*, 2012. 14(2): p. 132-44.
65. Shah, K. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. 64(8): p. 739-48.
66. Somoza RA, Rubio FJ. Cell therapy using induced pluripotent stem cells or somatic stem cells: this is the question. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012. 7(3): p. 191-6.
67. Taghva A, Khalessi AA, Kim PE, Liu CY, Apuzzo ML. From atom to brain: applications of molecular imaging to neurosurgery. *World Neurosurg*, 2010. 73(5): p. 477-85.
68. Li J, Zeng W, Huang Y, Zhang Q, Hu P, Rabkin SD, Liu R. Treatment of breast cancer stem cells with oncolytic herpes simplex virus. *Cancer Gene Ther*, 2012. 19(10): p. 707-14.
69. Castelo-Branco P, Passer BJ, Buhrman JS, Antoszczyk S, Marinelli M, Zaupa C, Rabkin SD, Martuza RL. Oncolytic herpes simplex virus armed with xenogeneic homologue of prostatic acid phosphatase enhances antitumor efficacy in prostate cancer. *Gene Ther*, 2010. 17(6): p. 805-10.

## 5.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthias Dübgen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Stammzellen als Transportvehikel für multimechanistische Varianten von onkolytischem Herpes Simplex Virus in der Hirntumorthherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Matthias Dübgen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Tamura K, Hingtgen S, Redjal N, Wakimoto H, Shah K. Stem cells loaded with multimechanistic oncolytic herpes simplex virus variants for brain tumor therapy. J Natl Cancer Inst, 2014. 106(6): p. dju090.

Beitrag im Einzelnen: Konzeption und Studiendesign, Datenerhebung und –zusammenstellung, Datenanalyse und -interpretation sowie Verfassung des Manuskripts.

**Publikation 2:** Hingtgen S, Figueiredo JL, Farrar C, Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Bhere D, Shah K. Real-time multi-modality imaging of glioblastoma tumor resection and recurrence. J Neurooncol, 2013. 111(2): p. 153-61.

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung und –zusammenstellung, Einbindung in sämtliche Tiermodellstudien.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

## 5.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



### 5.3 Publikationsliste

1. Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Tamura K, Hingtgen S, Redjal N, Wakimoto H, Shah K. Stem cells loaded with multimechanistic oncolytic herpes simplex virus variants for brain tumor therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(6): p. dju090.
2. Hingtgen S, Fiueiredo JL, Farrar C, Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Bhere D, Shah K. Real-time multi-modality imaging of glioblastoma tumor resection and recurrence. *J Neurooncol*, 2013. 111(2): p. 153-61.